



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

DETECCIÓN DE *Staphylococcus aureus* ORSA/MRSA
EN QUESOS FRESCOS ARTESANALES COMERCIALIZADOS EN
MERCADOS POPULARES EN EL VALLE DE TOLUCA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA:
LIC. EN G. EDAENA PAMELA DIAZ GALINDO

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, Enero 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

DETECCIÓN DE *Staphylococcus aureus* ORSA/MRSA
EN QUESOS FRESCOS ARTESANALES COMERCIALIZADOS EN
MERCADOS POPULARES EN EL VALLE DE TOLUCA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA

LIC. EN G. EDAENA PAMELA DIAZ GALINDO

COMITÉ DE TUTORES

DIRECTOR DE TESIS

DR. VALENTE VELAZQUEZ ORDOÑEZ

ASESORES

Dra en C ADRIANA CARMEN GUTIERREZ CASTILLO

M. en C. BENJAMÍN VALLADARES CARRANZA

COLABORADORES

Dra. PATRICIA CERVANTES ACOSTA

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, Enero 2016

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada con el número de registro de becario 543391, para cursar los estudios de Maestría en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales.
- Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por la beca de titulación otorgada.
- A la beca de Apoyos Complementarios para Mujeres Indígenas Becarias CONACyT 2014.
- Al proyecto de Investigación: Variación genética de aislamientos de *S. aureus* MRSA obtenidos de vacas lecheras en unidades de producción familiar Clave 3848/2013CHT.
- Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México, por las facilidades otorgadas en la realización de este trabajo.
- A mis asesores Dr. Valente Velázquez Ordoñez, Mtro. Benjamín Valladares Carranza y a la Dra. Adriana del Carmen Gutiérrez Castillo por el apoyo y tiempo que brindaron para elaboración de esta tesis.
- Al Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales por las facilidades y capacitación para usar las instalaciones y el equipo en las determinaciones fisicoquímicas.
- Al laboratorio de Ciencias Ambientales de los Servicios Externos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México pero especialmente al Químico Sergio Maya y al Técnico Roberto por la capacitación para la realización de las pruebas de humedad, cenizas y cloruro de Sodio

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

A Dios por darme la vida y guiar mi camino.

A mi mamá por educarme con amor, paciencia y haberme formado como persona.

A mi papá por enseñarme las facetas de la vida.

A mi hermana Lily por acompañarme en muchas aventuras buenas y malas y ser siempre mi cómplice.

A Hernando por financiar y facilitar el muestreo y procesamiento de datos de la tesis pero especialmente por estar conmigo siempre.

A mis compañeros de CIESA: Víctor, Vladimir, Fernando, Wael, Juan Carlos (Qfb) Selene porque la estancia en los laboratorios y fuera de ellos fue más agradable en su compañía.

Pero sobre todo a mi jefa de laboratorio Ana María Gamma por todos los conocimientos y técnicas de laboratorio que me enseñó.

A mis compañeros del ICAR: Dalia, Isra y Felipe por ser tan buenas personitas y enseñarme las técnicas y a usar los equipos, además de la ayuda que me brindaron en mi estancia.

DEDICATORIAS

Este trabajo se lo dedico de manera especial a mi familia

El conocimiento es poder. La información es libertadora.

La educación es la premisa del progreso, en toda sociedad,

en toda Familia.

Kofi Annan

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES	ii
AGRADECIMIENTOS ESPECIALES	iii
DEDICATORIAS.....	iv
INDICE DE CUADROS.....	viii
INDICE DE FIGURAS.....	ix
INDICE DE GRÁFICAS Y DIAGRAMAS.....	x
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	2
1. Biología de <i>Staphylococcus aureus</i>	2
Factores de virulencia.....	4
Patogenicidad.....	7
2. <i>Staphylococcus aureus</i> EN ALIMENTOS.....	8
3. <i>Biofilm</i> en <i>Staphylococcus aureus</i>	10
4. <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente (MRSA).....	12
Resistencia a β -láctamicos	14
Casete cromosómico estafilocócico <i>mec</i>	16
MRSA en el mundo.....	19
MRSA en animales de compañía y especies marinas	22
MRSA en alimentos.....	22
5. QUESO FRESCO	25
Sistemas de producción lechera en México.....	25
Queso	26
Producción de queso en México	26
Quesos genuinos mexicanos.....	29
Clasificación de los quesos mexicanos genuinos	29
Queso fresco	30
Calidad de los quesos.....	33
Contaminación de queso por <i>Staphylococcus aureus</i>	33
III. JUSTIFICACIÓN	36
IV. HIPÓTESIS.....	37
V. OBJETIVOS	38
Objetivos generales	38

Objetivos específicos	38
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	39
ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS	39
Determinación de humedad en queso fresco	39
Determinación de materia seca en queso fresco	39
Determinación de cenizas en queso fresco	39
Determinación de cloruro de sodio (NaCl) en queso fresco	39
Determinación de grasa en queso	39
Determinación de proteínas en queso fresco	40
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS	41
Cuenta total en placa de <i>Staphylococcus aureus</i>	41
Aislamiento e identificación bacteriológica de los aislamientos de <i>Staphylococcus aureus</i>	42
Conservación de aislamientos	42
CARACTERIZACIÓN DEL ANTIBIOTIPO DE <i>Staphylococcus aureus</i> RESISTENTE A LA METICILINA	43
Sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>Staphylococcus aureus</i>	43
DETECCIÓN DE AISLAMIENTOS DE MRSA, MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	44
Extracción de ADN bacteriano	44
Cuantificación del ADN	44
Detección de los genes <i>femB</i> y <i>mecA</i> por PCR multiplex	44
Visualización de los amplicones	45
Biotipificación de los aislamientos de <i>Staphylococcus aureus</i>	46
Identificación fenotípica de <i>biofilm</i> en rojo Congo	47
VII. LIMITE DE TIEMPO Y ESPACIO	48
VIII. RESULTADOS	49
IX. DISCUSIÓN	86
X. CONCLUSIONES	93
XI. LITERATURA CITADA	94
XII. ANEXOS	103
Anexo 1: CUESTIONARIO PARA COMERCIANTES DE QUESOS FRESCOS EN MERCADOS POPULARES DEL MUNICIPIO DE TOLUCA	103
ANEXO 2: DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN QUESO FRESCO	104
Anexo 3: DETERMINACIÓN DE CENIZAS EN QUESO FRESCO	104
ANEXO 4: DETERMINACIÓN DE NaCl EN QUESO FRESCO	105

ANEXO 5: DETERMINACIÓN DE GRASA EN QUESO FRESCO	106
ANEXO 6: DETERMINACIÓN DE PROTEINA EN QUESO FRESCO.....	107
Anexo 7: MÉTODO McFARLAND.....	108
Anexo 8: NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-115-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE <i>Staphylococcus aureus</i> EN ALIMENTOS.....	109
Anexo 9: NMX-F-083-1986. ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS. FOODS. MOISTURE IN FOOD PRODUCTS DETERMINATION. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS.....	120
Anexo 12: DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL	126
Anexo 13: NMX-F-100-1984. ALIMENTOS. LÁCTEOS. DETERMINACIÓN DE GRASA BUTÍRICA EN QUESOS. FOODS. LACTEOUS. CHEESE BUTTER FAT DETERMINATION. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS.....	128
ANEXO 14: PROCEDIMIENTO PARA EXTRACCIÓN DE ADN	131

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Características de <i>Staphylococcus aureus</i>	3
Cuadro 2: Factores de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	3
Cuadro 3: Factores de Virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	4
Cuadro 4: Fases del desarrollo de <i>biofilm</i> en estafilococos	12
Cuadro 5: Clasificación de MRSA	20
Cuadro 6: Secuencias de los iniciadores utilizados en la PCR y tamaños de los productos de los productos esperados	44
Cuadro 7: Morfología de crecimiento en agar Soya Trypticaseína y cristal Violeta	46
Cuadro 8: Biotipos de <i>Staphylococcus aureus</i>	46
Cuadro 9: Procedencia del queso fresco en mercados populares	49
Cuadro 10: Procedencia del queso fresco en mercados populares	50
Cuadro 11: Caracterización del queso fresco que se comercializa en mercados populares del municipio de Toluca	51
Cuadro 12: Valores de parámetros fisicoquímicos en los quesos frescos por municipio	52
Cuadro 13: Valores de pH en los quesos frescos mostrados por municipio	53
Cuadro 14: Valores de humedad en los quesos frescos mostrados por municipio	54
Cuadro 15: Valores de materia seca en los quesos frescos mostrados por municipio.	55
Cuadro 16: Valores de cenizas en los quesos frescos mostrados por municipio	55
Cuadro 17: Valores de NaCl en los quesos frescos mostrados por municipio	56
Cuadro 18: Valores de proteína en los quesos frescos mostrados por municipio	57
Cuadro 19: Valores de grasa en los quesos frescos mostrados por municipio	58
Cuadro 20: Valores de peso en los quesos frescos mostrados por municipio	59
Cuadro 21: Distribución geográfica de los aislamientos de <i>Staphylococcus aureus</i>	61
Cuadro 22: Sensibilidad <i>in vitro</i> de aislamientos de <i>Staphylococcus aureus</i> a diferentes antibióticos.	61
Cuadro 23: Biotipos de aislamientos de <i>S. aureus</i>	63

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Factores de virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	7
Figura 2: Fases del desarrollo de <i>biofilm</i> en estafilococos	11
Figura 3: Mecanismo de resistencia a β -lactámicos en <i>S. aureus</i>	15
Figura 4: Estructura del casete estafilocócico cromosomal (<i>SCCmec</i>).	16
Figura 5: Organización genómica de <i>SCCmec</i> I al V y variantes	18
Figura 6: Prevalencia mundial de MRSA mostrado por país	19
Figura 7: Presentación esquemática de las fuentes potenciales de <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA), contaminación a nivel de la granja, rastros, lácteos y venta al por menor.	24
Figura 8: Identificación bacteriológica de <i>S. aureus</i> por métodos microbiológicos y bioquímicos	42
Figura 9: Procedencia de los quesos en mercados y tianguis en Toluca	50
Figura 10: PCR del gen <i>mecA</i> y <i>femB</i> de <i>S.aureus</i>	63
Figura 11: Crecimiento de aislamientos de <i>S. aureus</i> en agar TSA y Cristal violeta y prueba de coagulasa en plasma de bovino.....	64
Figura 12: <i>biofilm</i> en aislamientos de <i>S. aureus</i> crecimiento en agar Rojo Congo.	64

INDICE DE GRÁFICAS Y DIAGRAMAS

Gráfica 1: Frecuencia en el número de vendedores de queso fresco	51
Gráfica 2: Condiciones de venta del queso fresco	60
Gráfica 3: Sensibilidad <i>in vitro</i> de aislamientos de <i>Staphylococcus aureus</i> a diferentes antibióticos.....	62
Diagrama 1: Proceso de producción de queso fresco en la región central México	32

ABREVIATURAS

A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMC	Amoxicilina/ácido clavulánico
AMP	Ampicilina
C	Citosina
CA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina de adquisición comunitaria
CAZ	Ceftazidima
CFC	Cefalotina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CRX	Cefuroxima
CTX	Cefotaxima
dNTPs	Desoxinucleótidos
ERI	Eritromicina
FOX	Cefoxicina
G	Guanina
GEN	Gentamicina
HA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina de adquisición hospitalaria
Kb	Kilo bases
LA-MRSA	<i>Staphylococcus resistente</i> a la meticilina asociado al ganado
M	Molar
MH	Mueller-Hinton (medio de cultivo)

mL	Mililitro
mM	Minimolar
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
MSA	Mannitol Salt agar(medio de cultivo)
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a meticilina
ORF	Open reading frame (marco de lectura abierto)
OXA	Oxacilina
Pb	Pares de bases
PBP	Penicillin Binding Protein (proteína de unión a la penicilina)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PEN	Penicilina
PVL	Panton-Valentine Leukocidin (Leucocidina de Panton-Valentine)
SCCmec	Casete Cromosómico Estafilocócico del gen mecA
T	Timina
TET	Tetraciclina
TSST	Toxina del Síndrome de Shock Tóxico
TUT	Trimetroprim-Sulfametoxazol
gr.	Gramos

RESUMEN

DETECCIÓN DE *Staphylococcus aureus* ORSA/MRSA EN QUESOS FRESCOS ARTESANALES COMERCIALIZADOS EN MERCADOS POPULARES EN EL VALLE DE TOLUCA

Díaz Galindo, Edaena Pamela; Velázquez Ordoñez, Valente; Gutiérrez Castillo, Adriana del Carmen, Valladares Carranza; Benjamín.

Staphylococcus aureus es considerado la tercer causa más importante entre los patógenos transmitidos por alimentos y rápidamente ha adquirido resistencia a los antibióticos por lo que la portación asintomática en humanos y animales lo convierte en un serio problema cuando es transferido a los alimentos. El queso es un alimento listo para consumir que tiene una importante calidad nutricional y es un vehículo de crecimiento eficiente para transmitir enfermedades bacterianas cuando son consumidos sin pasteurización lo que ha llevado a que *S. aureus* sea frecuentemente aislado en estos productos. Los objetivos de este trabajo fueron 1) Determinar la presencia *S. aureus* por resistente a la meticilina (MRSA), la sensibilidad *in vitro* de los aislamientos, la detección del gen *mecA* y *femB* que codifican resistencia a antibióticos, el origen presuntivo mediante la técnica de biotipificación y la presencia de *biofilm*; y 2) determinar las características fisicoquímicas del queso fresco que se comercializa en el municipio de Toluca, Estado de México; así como el origen, formas de comercialización y condiciones de venta dada la importancia regional y económica del sistema de producción lechera y de la quesería artesanal en la zona. Se realizó un estudio transversal y muestreo por conveniencia, se adquirieron 64 piezas de quesos frescos en mercados itinerantes (tianguis) y fijos durante el periodo de agosto-octubre de 2014. El pH y la temperatura de los quesos se determinaron en el punto de venta, posteriormente mediante métodos oficiales se determinó el contenido de humedad, materia seca, cenizas, grasa, proteína y NaCl. La procedencia de los quesos se estableció a partir de la fuente de suministro en cuatro regiones: (A) Valle de Toluca; (B), otros municipios del Estado de México; (C) origen desconocido y (D) otros estados del país. Después de la realización de las pruebas bioquímicas se obtuvieron 17 aislamientos de *Staphylococcus aureus*. El patrón de sensibilidad *in vitro* mostró un alto porcentaje de resistencia a los β -lactámicos, se observaron altos porcentajes de resistencia en Penicilina (17/100%), ampicilina (16/94%), ceftazidima (16/94%), cefotaxima (10/58.8%) y amoxicilina/ácido clavulanico (9/53%). Sin embargo los aislamientos también mostraron sensibilidad a antibióticos como cefalotina

(16/94%), tetraciclina (16/94%), trimetoprim-sulfametoxazol (16/94%), gentamicina (14/82.3%), oxacilina (13/76%), cefoxitina (15/88.2%), cefuroxima (12/70.5%), eritromicina (9/53%) respectivamente. Los 17 aislamientos de *S. aureus* se confirmaron al ser positivos al gen *femB* y no se detectó el gen *mecA* por PCR por lo que fueron considerados como *Staphylococcus aureus* sensibles a la meticilina (MSSA). La biotipificación mostró que 4(23.5%) fueron del ecovar humano, 2(11.8%) fueron del ecovar aves de corral, 1(5.9%) pertenecieron al ecovar ovino, y 10(58.8%) no tuvieron hospedero específico; finalmente 8 (47%) presentaron la coloración característica por la técnica de Rojo Congo. Se observó que la presentación del queso en su forma circular fue la misma en todos los puntos de venta con un rango de peso de 100 a 250 gr., los rangos para los parámetros fisicoquímicos fueron pH (4.84-6.07), humedad (42.71-66.66%), materia seca (1.68-3.39%), cenizas (2.65-5.24%), grasa (12-32%), proteína (16.81-26.62%) y NaCl (0.29-1.44%). Los resultados de esta investigación establecen la necesidad mejorar las políticas de higiene por las autoridades, asimismo para promover el uso racional de los antibióticos para evitar la aparición y propagación de cepas resistentes hacia quienes los manipulan y consumen, causando gran impacto en la salud pública. El queso fresco que se comercializa en la Ciudad de Toluca, puede ser considerado como un queso artesanal propio de la región, que debe de ser preservado como un interés en la gastronomía mexicana, además de la importancia de mejorar las condiciones de calidad e inocuidad en la comercialización.

Palabras clave: Queso fresco, *Staphylococcus aureus*, resistencia a meticilina, caracterización fisicoquímica.

Summary

Detection of *Staphylococcus aureus* ORSA/MRSA in fresh artisan cheeses sold in popular markets in the valley of Toluca

Díaz Galindo, Edaena Pamela; Velázquez Ordóñez, Valente; Gutiérrez Castillo, Adriana del Carmen, Valladares Carranza; Benjamín.

Staphylococcus aureus is considered the third most important cause among foodborne pathogens and has quickly acquired resistance to antibiotics by what the asymptomatic transmission by humans and animals makes it a serious problem when is transferred to food. Cheese is a ready-to-eat food that has an important nutritional quality and also is an efficient growth vehicle for transmitting bacterial diseases when consumed without pasteurization which led to the presence of *S. aureus* which is frequently isolated from these products. The study objectives were 1) Determine the presence *S. aureus* resistant to methicillin (MRSA), *in vitro* susceptibility of the isolates, detection of the *mecA* and *femB* genes that encode resistance to antibiotics, the presumptive origin using the biotyping technique and the biofilm presence; and, 2) Determine the physicochemical characteristics of fresh cheese that is commercialized in the municipality of Toluca, Mexico; as well as information on the milk industry and its link to the artisan cheese production as a traditional food and its regional economic importance were provided. A cross-sectional study was conducted by convenience; were sampled 64 pieces of fresh cheese purchased on fixed and itinerant markets (flea markets) during a period from August to October 2014 Temperature and pH data of the cheeses were determined at the point sale. Temperature and pH of the cheeses were determined at the point of sale, later by official methods moisture content, dry matter, ash, fat, protein and NaCl were determined. Cheese origin was established based on of the supply source in four regions: (a) Toluca valley; (b), other municipalities of the State of Mexico; (c) unknown origin and (d) other states of the country. After biochemical tests completion, 17 isolates of *Staphylococcus aureus* were obtained. *In vitro* susceptibility pattern showed a high resistance percentage to the β -lactamics, there were high resistance percentages to penicillin (17/100%), ampicillin (16/94%), ceftazidime (16/94%), cefotaxime (10/58.8%), and amoxicillin/acid clavulanico (9/53%). However the isolates also showed sensitivity to antibiotics as cephalotin (16/94%), tetracycline (16/94%), trimethoprim-sulfamethoxazole (16/94%), gentamicin (14/82.3%), oxacillin (13/76%), cefoxitin (15/18.2%), cefuroxime (12/70.5%), erythromycin (9/53%) respectively. Seventeen isolates of *S. aureus*

were confirmed to be positive by PCR for *femB* gene not *mecA* gene so they were considered as *Staphylococcus aureus* sensitive to methicillin (MSSA). The biotyping showed that 4 (23.5%) were human ecovar, 2 (11.8%) were poultry ecovar, 1 (5.9%) belonged to sheep ecovar, and 10 (58.8%) had no specific host; finally 8 (47%) presented the coloration feature by Congo Red technique. It was observed that the presentation of the sampled cheeses were of circular shape at all points of sale with a weight range of 100-250 g., the ranges for the physicochemical parameters were pH (4.84-6.07), moisture (42.71-66.66%), dry matter (1.68-3.39%), ash (2.65-5.24%), fat (12-32%), protein (16.81-26.62%) and NaCl (0.29-1.44). The results of this research established the need to improve the hygiene policies by authorities, also to promote the rational use of antibiotics to prevent the emergence and spread of resistant strains toward those who manipulate and consume, causing great impact in public health. The fresh cheese sold in the city of Toluca, can be considered an own artisan cheese of the region that should be preserved as an interest in Mexican cuisine, in addition to the importance of improving the conditions of quality and safety in marketing.

Key words: fresh cheese, *Staphylococcus aureus*, resistance to methicillin, Physiochemical characterization.

I. INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) es un habitante común de la microflora natural de la piel y mucosa en humanos y animales, y también está presente en el ambiente (Yeşim y Haluk, 2012; Kamal *et al.*, 2013). El hombre es señalado como el reservorio principal y se ha señalado al epitelio escamoso húmedo en la mucosa del tabique adyacente al orificio nasal como el principal sitio de colonización en los individuos portadores (Sollid *et al.*, 2014). En la población adulta puede encontrarse en partes del cuerpo como las axilas (8%), pecho/abdomen (15%), perineo (22%), intestino (17-31%), vagina (5%), la portación faríngea es altamente variable (4-64%), además es posible encontrarlo en el tracto genital y gastrointestinal, cabello, en ocasiones la ropa (Sollid *et al.*, 2014; André *et al.*, 2008; Sandel y McKillip, 2004; Medved'ová *et al.*, 2009; Bustos Martínez *et al.*, 2006), también en manos (Ferreira *et al.*, 2014), garganta, ingle (Leonard y Markey, 2008), y recto (Wendlandt *et al.*, 2013).

La prevalencia varía entre poblaciones, edad, enfermedades subyacentes, raza, ciertos comportamientos y condiciones de vida y la mayoría de las infecciones son causadas por cepas pertenecientes a la flora del propio paciente (Valsangiacomo *et al.*, 2000).

En México muestras de 1234 personas sanas mostraron que *S. aureus* es más frecuentemente aislada de la garganta (46.5%) que en la nariz (37.1%) y entre individuos colonizados el 38% fueron exclusivamente portadores en la garganta (Sollid *et al.*, 2014). Portadores asintomáticos tienen un rol importante en el mantenimiento y propagación de este microorganismo, especialmente personas en actividades profesionales relacionadas con la salud pública o el procesamiento de alimentos (André *et al.*, 2008).

Los animales también son un origen importante de *S. aureus* pues muchas veces están colonizados masivamente por el microorganismo; en el caso de los rumiantes es frecuentemente asociada con mastitis clínica y subclínica; además se considera que es el patógeno más común de la glándula mamaria de la vaca, lo cual es una preocupación de salud pública ya que se puede traducir en la contaminación de los alimentos lácteos antes de su tratamiento o durante el procesamiento (Medved'ová *et al.*, 2009; Sasidharan *et al.*, 2011).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

1. Biología de *Staphylococcus aureus*

La primera denominación de *Staphylococcus* fue mencionada por Alexander Ogston en sus trabajos publicados entre 1879 y 1882, y les dio el nombre de estafilococo (del griego: *staphyle*, racimo de uvas y *coccus* de un grano de baya) debido al aspecto que presentan al ser observados en el microscopio (Adams y Moss, 2002).

El género *Staphylococcus* pertenece la familia *Micrococcaceae*; del cual se conocen 33 especies de *Staphylococcus*, 16 de las cuales se localizan en los humanos formando parte de la microbiota de la piel y mucosas y otras sólo se encuentran en otros mamíferos y aves; son considerados anaerobios/aerobios facultativos, son bacterias esféricas Gram-positivas generalmente positivas a la prueba de catalasa, según la especie y dependiendo del tipo de cultivo, las células bacterianas tienen un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , el género *Staphylococcus* se clasifica por la prueba de coagulasa en tubo como *Staphylococcus* coagulasa positivos y negativos, poseen citocromo y menaquinona en la cadena respiratoria, *Staphylococcus aureus* es el agente de mayor importancia clínica y sanitario entre los estafilococos (Sandel y McKillip, 2004; Cervantes-García *et al.*, 2014).

Staphylococcus aureus (*S. aureus*), es una bacteria no móvil, Gram positiva, no formadora de esporas, anaerobia facultativa, que fermenta la mayoría de los azúcares excepto rafinosa y salicina produciendo ácido láctico durante la fermentación (Khakpoor y Safarmashael, 2011). La división celular tiene lugar en más de un plano por lo que las células forman agrupaciones irregulares que simulan racimos de uvas, aunque también pueden encontrarse como células únicas, en pares, tétradas, en cadenas cortas (Adams y Moss, 2002, Bustos Martínez *et al.*, 2006; Cervantes-García *et al.*, 2014)). Es un mesófilo con un intervalo de crecimiento entre 7 y 48 °C y una temperatura óptima de 35-40 °C, crece a valores de pH de 4.8-9.3, la escala de producción de enterotoxina es más reducida produciéndose a pH inferior a 8,0 como se observa en el cuadro 1 (Adams y Moss, 2002, Mai *et al.*, 2010).

Tienen un contenido de G+C en la composición del DNA de 30 a 40 mol%, poseen una pared celular típica que contiene peptidoglucano y ácidos teicoicos, sensibles a las β -lactamasas, a las tetraciclinas, a los macrólidos, a las lincosamidas, a la novobiocina y al cloranfenicol pero son resistentes a la polimixina y al polieno (Jablonski y Bohach, 2000).

Cuadro 1: Características de *Staphylococcus aureus*.

Característica	<i>S. aureus</i>
Coagulasa	+
Nucleasa termoestable	+
Factor de agregación	+
Pigmento amarillo	+
Actividad hemolítica	+
Fosfatasa	+
Lisostafina	Sensible
Hialuronidasa	+
Fermentación de manitol	+
Resistencia a la novobiocina	-

Fuente: Jablonski y Bohach, 2000

Una característica importante de este microorganismo es su osmotolerancia que permite el crecimiento en un medio que contenga el equivalente de 5-75% (3,5 M) de NaCl e incluso algunas cepas pueden crecer en concentraciones de 20%. Soporta una actividad acuosa (a_w) reducida (0,83), en la que tiene un tiempo de recuperación de 300 minutos y la producción de la enterotoxina a 0,86 como se muestra en el cuadro 2 (Adams y Moss, 2002). Posee resistencia genética a los metales pesados y a los agentes antimicrobianos utilizados en medicina clínica (Jablonski y Bohach, 2000).

Cuadro 2: Factores de crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

Factor	Crecimiento	
	Óptimo	Intervalo
Temperatura °C	35-37	7-48
pH	6,0-7,0	4,0-9,8
NaCl	0,5-4%	0-20%
Actividad del agua a_w	0,98>0,99	0,83>0,99

Fuente: Adams y Moss, 2002

La infección exitosa en humanos y animales depende de los factores de virulencia producidos por *S. aureus* (Fluit, 2012). La amplia gama de síndromes clínicos resulta de una variedad de componentes extracelulares (Petinaki y Spiliopoulou, 2012), como se muestran en el cuadro 3. Estos pueden promover la adhesión a los componentes de la matriz extracelular del hospedero y combatir el sistema inmune, además de la invasividad y resistencia a antibióticos que presenta (Khakpoor y Safarmashael, 2011). Los factores de virulencia se clasifican en 3 categorías: (1) factores involucrados en la adherencia de la célula hospedero o matriz celular como las proteínas de unión a fibrinógeno, fibronectina, colágeno y coagulasa; (2) factores involucrados en la evasión de las defensas del hospedero como las enterotoxinas estafilocócicas, la toxina 1 del síndrome de choque tóxico (TSST), proteína A, lipasas y polisacáridos capsulares tipos 1, 5 y 8; (3) factores involucrados en la invasión de la célula hospedera y penetración de los tejidos como α toxina, β , γ , y δ hemolisinas (Velázquez-Meza, 2005) y de manera gráfica se muestran en la figura 1.

Factores de virulencia.

Cuadro 3: Factores de Virulencia de *Staphylococcus aureus*.

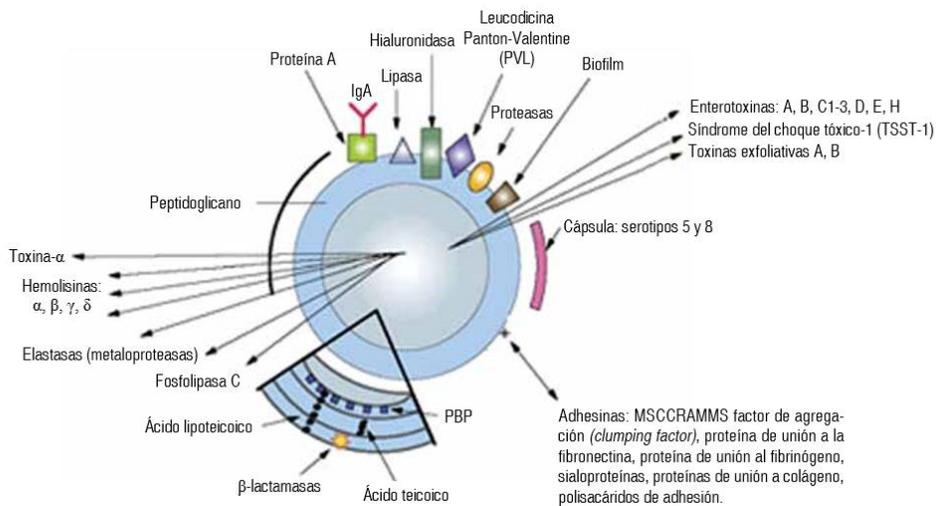
Factor de Virulencia	Función
Polisacáridos capsulares	Confieren resistencia a la fagocitosis por neutrófilos polimorfonucleares bovinos, considerada como la principal línea de defensa de la glándula mamaria frente a los patógenos invasores.
Proteína de unión a fibrinógeno (<i>clumping factor</i>)	Receptor de fibrinógeno de su superficie celular, denominado factor de agregación (<i>clumping factor</i>). El <i>clumping factor</i> debe su nombre a que la interacción con el fibrinógeno plasmático conduce a una aglomeración instantánea de las células bacterianas.
Toxina α	Es una proteína tóxica para un amplio rango de células de mamífero, particularmente eritrocitos; su función principal es convertir el tejido del hospedero en nutrientes para la bacteria que la expresa. Se integra a la membrana de las células blanco, forma heptámeros cilíndricos que son capaces de lisar a las células eucariontes. Los poros que produce permiten la entrada y salida de iones y moléculas pequeñas que eventualmente producen la muerte de las células nucleadas y la lisis osmótica de los eritrocitos. La formación de poros también produce efectos secundarios que promueven el desarrollo de secuelas patológicas, que incluyen la activación de endonucleasas, exocitosis de plaquetas y liberación de citosinas y mediadores inflamatorios. La producción de tromboxano y protacilinas activa los mecanismos de vasoconstricción. Al romper la integridad celular aumenta la permeabilidad vascular. El efecto final en el hospedero es el edema pulmonar o síndrome de la dificultad respiratoria. La toxina α es dermonecrótica y letal para ciertos animales.
Toxina β	Es una exoproteína hemolítica que hidroliza la esfingomielina presente en la membrana plasmática, lo cual resulta en un incremento de la permeabilidad con pérdida progresiva de la carga de la superficie celular

Coagulasa	<p>Causa la formación de una capa de fibrina alrededor del absceso estafilocócico, localiza la infección y protege a la bacteria de la fagocitosis. Existe en dos formas:</p> <p>Forma unida (también llamada factor de aglomeración): La coagulasa unida a la pared celular del estafilococo se une a la protrombina de este complejo, transforma el fibrinógeno en fibrina insoluble y provoca la aglomeración de los estafilococos. Facilita el desarrollo de sepsis y abscesos.</p> <p>Forma libre: La coagulasa libre reacciona con el factor reactivo de la coagulasa, presente en el plasma, dando lugar a un complejo análogo a la trombina que reacciona con el fibrinógeno forma el coágulo de fibrina.</p>
Enterotoxinas estafilocócicas	<p>Forman parte del grupo de toxinas conocidas como superantígenos toxinas pirogénicas. Se conoce una amplia variedad de éstas toxinas: en secuencia alfabética de SEA a SEE, de SEG a J, SEK, SEL, SEP, SEM y SEO.</p> <p>Cuando se consumen alimentos contaminados con <i>S. aureus</i>, las enterotoxinas estafilocócicas (SEs) causan gastroenteritis, estimulan el peristaltismo intestinal y ejercen un efecto sobre el sistema nervioso central, que se manifiesta por vómitos, los cuales acompañan a la enfermedad gastrointestinal.</p>
Toxina 1 Síndrome del Shock tóxico	<p>Suprime la quimiotaxis de los neutrófilos, induce la función supresora de los linfocitos T y bloquea el sistema reticuloendotelial. La toxina actúa como superantígeno estimulando la liberación de varias citosinas, prostaglandinas y leucotrienos, los cuales producen los signos y síntomas del síndrome. A bajas concentraciones produce la extravasación de las células endoteliales y a altas concentraciones tiene un efecto citotóxico.</p> <p>Los síntomas son: fiebre alta, dolor de cabeza, vómito, diarrea, mialgias y rash eritematoso. Otros síntomas incluyen meningitis, faringitis, conjuntivitis, vaginitis, edema, altralgia, irritabilidad, fatiga y dolor abdominal. En adultos puede producir el síndrome de la dificultad respiratoria, coagulación intravascular y falla renal. También puede ser menstrual (por coincidir con el periodo menstrual), y está asociado con el uso de tampones, o bien no ser menstrual en cuyo caso puede producir abscesos, celulitis, bursitis, infecciones posparto, procedimientos posquirúrgicos e infecciones vaginales.</p>
Leucocidina de Panton-Valentine	<p>Ocurre en menos de 5% de las cepas de <i>S. aureus</i></p> <p>La leucocidina es citotóxica para los monocitos, macrófagos y leucocitos poliformonucleares de humano. Es una proteína que forma poros en la membrana plasmática de los leucocitos, lo cual provoca un aumento en la permeabilidad y eventualmente provoca la lisis de la célula. La lisis de los leucocitos produce la liberación de los mediadores de la inflamación con una consecuente respuesta inflamatoria grave.</p> <p>Se asocia con forunculosis, neumonía hemorrágica severa o ambas en adultos jóvenes y niños, así como infecciones en la piel relacionadas con cepas MRSA adquiridas en la comunidad.</p>
Hemolisina α	<p>Es considerada el prototipo de las citotoxinas formadora de poros, es citolítica para un gran número de células: monocitos, eritrocitos, linfocitos, plaquetas y células endoteliales. Intervienen en el desarrollo del edema y daño tisular como consecuencia del cambio de permeabilidad inducidos en las células endoteliales con los consiguientes cambios en el balance iónico.</p>

	Es una toxina es dermonecrótica y neurotóxica.
Hemolisina β	Tiene una actividad de fosfolipasa C, es específica para la esfingomielina y lisofosfatidilcolina, se cree que le da selectividad a la bacteria.
Hemolisina γ	Afecta a neutrófilos, macrófagos y a una gran variedad de eritrocitos de mamíferos. Se cree tiene efecto en la inducción de la inflamación.
Hemolisina δ	Causa daño en un gran número de células de mamíferos. El 97% de las cepas de <i>S. aureus</i> produce esta hemolisina. Esta toxina es capaz de hidrolizar los eritrocitos y membranas celulares, así como estructuras subcelulares rodeadas por una membrana como esferoplastos y protoplastos. Tiene una actividad dermonecrótica y se ha propuesto que actúa como un surfactante disgregando la membrana celular. Es dermonecrótica, causa lisis de diferentes tipos de células
Catalasa	Inactiva el peróxido de hidrógeno tóxico y radicales libres formados por el sistema mieloperoxidasa dentro de las células fagocíticas del hospedero después de la ingestión del microorganismo.
Ácidos teicoicos	Representan más del 50% del peso seco purificado de la pared. Constituidos por polímeros de ribitol fosfato entrecruzados con ácido N-acetilglucosamina, son específicos de especie, pueden estar unidos covalentemente al peptidoglicano de la pared celular y ligados a los lípidos de la membrana citoplasmática, juegan un papel importante en el metabolismo de la pared celular, su función es mediar la unión a las superficies de las mucosas mediante uniones específicas a la fibronectina además de la capacidad de inducir la producción de anticuerpos.
Ácidos lipoteicoicos	Unidos a la membrana plasmática, contienen fosfatos de poliglicerol, además de unirse a un diacilglicerol que sirve como anclaje a la membrana plasmática. Están involucrados en la inflamación y en la liberación de citosinas por los macrófagos y otras moléculas del sistema inmune.
Catalasa	Enzima que degrada el peróxido de hidrógeno dándole protección al microorganismo contra la fagocitosis
Hialuronidasa	Degrada el ácido hialurónico de la matriz del tejido conjuntivo facilitando la diseminación de la infección.
Toxinas exfoliativas o epidermolíticas	La prevalencia de estas cepas productoras varía geográficamente. Se han identificado dos serotipos: A y B (ETA y ETB), ambas pueden producir el síndrome de la piel escaldada. La toxina exfoliativa A es termoestable, se codifica por un fago, mientras que la toxina B es termolábil y es codificada por plásmidos. Actúan destruyendo los desmosomas del estrato granuloso de la epidermis, sin producir citólisis o inflamación, por lo que en la capa de la epidermis afectada no se encuentran leucocitos ni estafilococos, tienen actividad de proteasa serina, lo que desencadena la exfoliación.

Fuente: Camussone y Calvinho (2013); Bustos Martínez *et al.*, (2006); Cervantes-García *et al.*, (2014).

Figura 1: Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*.



Fuente: Cervantes-García *et al.*, (2014)

Patogenicidad

S. aureus es uno de los microorganismos que se aísla con mayor frecuencia en las infecciones hospitalarias y comunitarias, es uno de los patógenos nosocomiales de mayor importancia (Cervantes-García *et al.*, 2014). Causa varias enfermedades en humanos, es muy resistente y capaz de sobrevivir durante mucho tiempo en estado seco, su supervivencia es facilitada por la materia orgánica que acompaña al microorganismo en una lesión inflamatoria (Jablonski y Bohach, 2000). La patogénesis de *S. aureus* es un complejo proceso regulado, que envuelve una diversa gama de determinantes coordinadamente expresados en diferentes etapas de la infección, representando aproximadamente 100 factores de virulencia por lo que distintas redes de genes de virulencia son probablemente activadas en respuesta de las señales del hospedero (Stefani y Goglio, 2010).

La transmisión es a través de transferencia interpersonal por aerosoles o por contacto directo (Cervantes-García *et al.*, 2014), este último es el modo primario de transmisión de este microorganismo, usualmente contacto de piel con piel y varios factores del hospedero pueden predisponer a los individuos a la infección, incluyendo la pérdida de la barrera normal de la piel por trauma o cirugía donde la bacteria puede acceder al tejido cercano provocando daño local o infecciones de amplio espectro, además la presencia de enfermedades subyacentes como diabetes o VIH, y defectos en la función de los neutrófilos, aunado a estos factores, la presión antibiótica, estancias largas en unidades de cuidados intensivos, presión de la colonización, nivel de higiene de manos, medidas de tratamiento de aislamientos y contaminación ambiental han sido consideradas como factores

importantes en la adquisición y transmisión en las unidades de cuidados intensivos (Stefani y Goglio, 2010; Bustos Martínez *et al.*, 2006). El patógeno puede sobrepasar en cualquier momento los mecanismos fagocíticos locales y acceder a canales linfáticos y al torrente sanguíneo dando origen a una bacteremia estafilocócica (complicación severa que puede conducir a una infección metastásica y de mal pronóstico) (Cervantes-García *et al.*, 2014). Esta bacteria puede sobrevivir intracelularmente y esto podría ser un medio perfecto de escapar de los fagocitos y de los antibióticos (Fluit, 2012).

Según Sandel y McKillip (2004) ciertas condiciones podrían predisponer a los individuos a infecciones graves que incluyen las siguientes:

- Lesiones en la piel (quemaduras, incisiones quirúrgicas)
- Presencia de cuerpos extraños (suturas, líneas intravenosas, dispositivos protésicos)
- Infecciones con otros agentes (virus)
- Enfermedad crónica subyacente

Bajo estas condiciones, y aunado a que es un patógeno común asociado con múltiples procesos infecciosos, desde infecciones de la piel y tejidos blandos (impétigo, furúnculos, carbunco, síndrome de la piel escaldada por estafilococos), enfermedades respiratorias infecciosas, enteritis, hasta enfermedades sistémicas potencialmente mortales (Sandel y McKillip, 2004), como sepsis, osteomielitis, neumonía, endocarditis y meningitis. (Sasidharan *et al.*, 2011; Crago *et al.*, 2012, Kawada y Komatsuzawa, 2012). También causa infecciones en el sistema nervioso central, infecciones del tracto urinario y es la causa principal de infecciones nosocomiales, provoca intoxicación alimentaria estafilocócica, síndrome del Shock Tóxico (TSS), septicemia, fiebres (Bustos Martínez *et al.*, 2006; Rosengren *et al.*, 2010), lesiones necróticas, abscesos, bacteremia (Kamal *et al.*, 2013), fiebre escarlata estafilocócica (Khakpoor y Safarmashael, 2011), hidrosadenitis, celulitis fascitis, paroniquia, pericarditis, artritis séptica y bursitis, piomiositis, empiema subdural y absceso epiduralmedular o craneal (Cervantes-Gacía *et al.*, 2014).

2. *Staphylococcus aureus* EN ALIMENTOS

S. aureus es considerado la tercer causa más importante en el mundo entre los patógenos transmitidos por alimentos (Normanno *et al.*, 2005). Y rápidamente ha adquirido resistencia a los antibióticos y su portación de manera asintomática en humanos y animales lo convierte en un serio problema cuando es transferido a los alimentos (Rivera-Salazar *et al.*, 2011; Vanegas *et al.*, 2008).

El elevado número de individuos portadores con colonización de fosas nasales implica su presencia en la piel, por lo que constituyen el origen principal de la diseminación a otros individuos y a los alimentos. La presencia de la bacteria indica que la contaminación es introducida por contacto directo por manipuladores que tienen lesiones cutáneas infectadas y/o fragmentos de la piel, indirectamente a través del equipo y utensilios, o por medio de los núcleos de las gotitas del tracto respiratorio al toser o al estornudar (Jablonski y Bohach, 2000; Adams y Moss, 2002; Sandel y McKillip, 2004).

Alimentos que son sometidos a contaminación post-procesamiento representan un importante peligro a la salud porque los microbios que normalmente podrían competir con *S. aureus* han sido eliminados, además el abuso de temperatura (temperatura inadecuada de almacenamiento), permite el crecimiento de los estafilococos en grandes números, que una vez introducidos se multiplican rápidamente a temperaturas ambiente (Sandel y McKillip, 2004).

Además de los síntomas patógenos, cepas toxigénicas de transmisión alimentaria multiplicadas en el alimento a un nivel de 10^5 - 10^6 ufc/g generan enterotoxinas (SEs) termoestables responsables de intoxicaciones alimentarias (Kamal *et al.*, 2013), de las que se han reportado 18 SEs, sin embargo las clásicas A, B, C y D han sido implicadas predominantemente en brotes de origen alimentario (Mai *et al.*, 2010). El consumo de alimentos contaminados causa severas enfermedades que incluye gastroenteritis, náusea, vómito, diarrea y dolor abdominal dentro del intervalo de 1-6 horas después del consumo de alimentos contaminados (Crago *et al.*, 2012).

Desde el punto de vista de seguridad en alimentos, durante la producción cada producto que es manipulado es una fuente potencial de contaminación y la falta de apropiadas medidas higiénicas incrementa el riesgo de contaminación estafilocócica en el material crudo (Medved'ová *et al.*, 2009).

Este patógeno puede ser transmitido a los humanos a través de leche sin pasteurizar y productos lácteos que hace que las infecciones relacionadas con los alimentos sean difíciles de tratar (Sasidharan *et al.*, 2011). La contaminación puede ocurrir directamente de animales productores infectados o pueden resultar de higiene deficiente durante el proceso de producción o en la venta al por menor (Yeşim y Haluk, 2012). Otros factores que pueden estar asociados a la contaminación son el inadecuado manejo del proceso de pasteurización y el uso de leche cruda por el pequeño productor, el equipo de ordeño, el ambiente, las ubres y piel de animales lecheros son posibles fuentes de contaminación de la leche a granel e incidentalmente el almacenamiento a altas temperaturas ambientales permiten el crecimiento de la bacteria (André *et al.*, 2008). Asimismo la manipulación inapropiada de productos alimenticios así como la colonización del ganado o

trabajadores agrícolas ha sido descrito como mecanismos de contaminación de alimentos (Crago *et al.*, 2012). El entendimiento apropiado y el conocimiento extensivo sobre las rutas de contaminación de *S. aureus* es importante para el control efectivo de los brotes de enfermedad relacionadas (Mai *et al.*, 2010).

3. Biofilm en *Staphylococcus aureus*

Los *biofilms* son definidos como una comunidad de células bacterianas incrustadas en una matriz de polímeros orgánicos extracelulares, proteínas y ADN extracelular y la combinación de esos componentes; es una potente estrategia de evasión del sistema inmune a través del bloqueo físico y de los componentes del sistema inmune secretadas (Fluit, 2012), se encuentran adheridas a superficies vivas e inertes, a un sustrato o entre sí y son más resistentes al estrés ambiental que sus homólogos planctónicos (Rode *et al.*, 2007; Da Silva *et al.*, 2012; Rossi *et al.*, 2014). Estas células exhiben un fenotipo alterado en cuanto a su crecimiento, expresión génica y producción de proteínas, además el crecimiento está limitado por la disponibilidad de paso de los nutrientes para las bacterias a través del *biofilm*, así como los factores ambientales como el pH, la perfusión de oxígeno, las fuentes de carbono y la osmolaridad (Bustos Martínez *et al.*, 2006).

La importancia del *biofilm* es reconocida en el contexto médico y veterinario debido a que muestran elevada resistencia a antibióticos y desinfectantes; también contribuyen a la evasión de defensas inmunológicas así como a la dificultad para erradicar el patógeno resultando a menudo en infecciones crónicas y persistentes (Khoramian *et al.*, 2015). Sirve para adherirse y colonizar nuevos sitios, además de protegerlos de la fagocitosis y de los antibióticos, prolonga la infección y la colonización, así como la diseminación en el cuerpo humano está presente en cepas de hospitales y comunidad (Cervantes-García *et al.*, 2014). La transferencia genética puede ser facilitada en *biofilms* a través de una mejor interacción donador-receptor, además promueve la estabilidad de los plásmidos y puede aumentar la gama de elementos genéticos móviles de los hospederos transferidos horizontalmente (Rossi *et al.*, 2014).

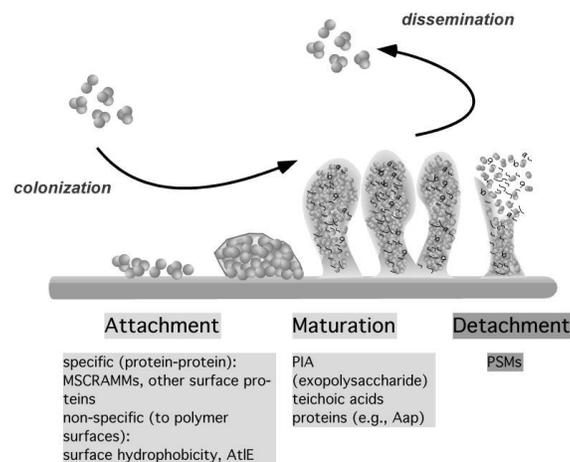
Superficies de acero inoxidable, plástico, vidrio, goma y polipropileno, tuberías, juntas de goma y superficies de trabajo pueden ser contaminadas ya sea por bacterias que bajo ciertas condiciones se adhieren iniciando el crecimiento y llevando a la formación del *biofilm* (Da Silva *et al.*, 2012; Otto M., 2008). La unión de las bacterias a las superficies de contacto de los productos alimenticios es un riesgo potencial para la salud del consumidor debido a que los *biofilms* pueden contener tanto microorganismos de deterioro como de microorganismos patogénicos. La exposición de patógenos a superficies puede tener lugar ya sea por contacto directo con materiales contaminados (materiales crudos o productos

alimentarios), o indirectamente a través de la microflora transportada por aire llevan a productos que podrían llegar a ser inseguros (Di Ciccio *et al.*, 2015). Además si la contaminación cruzada se produce después de un procedimiento bactericida lleva a graves problemas higiénicos y pérdidas económicas debido al deterioro en los alimentos (Rode *et al.*, 2007; Da Silva *et al.*, 2012).

La formación del *biofilm* es un proceso dinámico y están envueltos diferentes mecanismos en la adherencia y maduración, *S. aureus* produce polisacáridos y uno de los principales constituyentes de la matriz es el poli-N-acetilglucosamina (PNAG) y el polisacárido de adhesina intracelular (PIA). PIA y PNAG es codificada por el operon *ica* de adhesión intracelular que comprenden los genes *icaADCB* (Rode *et al.*, 2007). Los ácidos teicoicos, las proteínas bacterianas (proteína estafilocócica de superficie), el clumping factor A, proteínas asociadas a *biofilm* y el ADN extracelular contribuyen a la estructura (Bustos Martínez *et al.*, 2006). Se ha encontrado que el operon de adhesión intracelular (*ica*) es esencial para el control de la producción del *biofilm*, el locus *ica*, consistente en los genes *icaADBC*, codifica proteínas mediante la síntesis de la molécula de adhesión del polisacárido intercelular (Khoramian *et al.*, 2015).

La formación del *biofilm* comprende dos etapas que implican una unión inicial y una fase maduración posterior, una fase final de desprendimiento (dispersión) implica el desprendimiento de las células individuales o grupos de células por diversos mecanismos y se cree que es crucial para la diseminación de la bacteria (Otto M., 2008).

Figura 2: Fases del desarrollo de *biofilm* en estafilococos.



Fuente: Otto M., (2008)

Cuadro 4: Fases del desarrollo de *biofilm* en estafilococos.

Fases del desarrollo de <i>biofilm</i> en estafilococos.		
Adherencia	Maduración del <i>biofilm</i>	Separación
Los <i>biofilm</i> se forman por la unión inicial a una superficie, que puede ocurrir en los tejidos o después de cubrir una superficie abiótica por proteínas de la matriz en el cuerpo humano (interacción específica proteína-proteína) o directamente a una superficie abiótica (no específica).	<p>Se compone de dos fases:</p> <p>1) Agregación intercelular: Que se puede lograr por una variedad de moléculas como las proteínas adhesivas o exopolímeros; y 2) las fuerzas de estructuración conducen a la apariencia típica tridimensional de <i>biofilm</i> maduro con sus torres celulares en forma de hongo.</p> <p>Fuerzas de adhesión: Agregación</p> <p>En los estafilococos la molécula principal responsable de la adhesión intercelular es el polisacárido adhesina intercelular (PIA), llamado también poli-N-acetilglucosamina (PNAG), este polímero junto con los ácidos teicoicos y proteínas forma la mayor parte de lo que se denomina "<i>slime</i>", la matriz extracelular que protege al <i>biofilm</i> bacteriano.</p> <p>Se cree que PIA funciona como el adhesivo que se adhiere a las células entre si debido a la interacción electrostática, los ácidos teicoicos podrían representar a las moléculas cargadas negativamente que interactúan con PIA en la superficie celular. La biosíntesis de PIA se logra mediante los productos del gen locus <i>ica</i> que comprende una transferasa N-acetilglucosamina (<i>icaA</i> e <i>icaD</i>), una diacetilasa PIA (<i>icaB</i>), PIA exportador putativo (<i>icaC</i>) y un gen regulador (<i>icaR</i>). La expresión del gen locus <i>ica</i> está regulada por varios factores ambientales y proteínas reguladoras.</p> <p>Fuerzas disruptivas: Estructuración del <i>biofilm</i>: Un <i>biofilm</i> maduro tiene una estructura tridimensional específica que consiste en "torres" u "hongos" entre los cuales hay canales llenos de líquido que se cree que tienen una función vital en la entrega de nutrientes a las células en las capas más profundas del <i>biofilm</i>.</p>	<p>Cuando el <i>biofilm</i> alcanza una masa crítica, llega a un equilibrio dinámico en el cual las cepas más externas escapan de aquel y colonizan otras superficies. El desprendimiento es crucial para la difusión de las bacterias a otros sitios de colonización y puede ocurrir por el desprendimiento de células individuales o grupos de células más grandes.</p>

Fuente: Otto M. (2008); Bustos Martínez *et al.*, (2006)

4. *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA).

S. aureus es un patógeno importante a nivel mundial que causa severas infecciones tanto en personas sanas como en inmunocomprometidas. Oxacilina y meticilina se utilizaron por primera vez en la clínica a principios de 1960 y 6 meses después de que la meticilina fue vendida en Octubre de 1960 aparecieron cepas resistentes, colectivamente llamados *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA), y tres aislamientos meticilina-resistentes fueron reportados después del análisis de 5000 aislamientos clínicos, en 1967, MRSA multirresistentes fueron reportadas de Suiza, Francia, Dinamarca, Inglaterra, Australia e India (Grundmann *et al.*, 2006). En 1982 aparecen cepas epidémicas de MRSA multiresistentes con capacidad especial para colonizar pacientes y personal y para causar brotes de infección generalizada; es un patógeno zoonótico multiresistente (Ferreira *et al.*, 2014).

Cepas de MRSA son capaces de evolucionar rápidamente e inducir nuevos problemas clínicos (Stefani y Goglio, 2010).

El aumento de casos de infecciones es una preocupación para la salud pública ya que está asociado con el incremento de morbilidad y mortalidad; además del exceso de uso de recursos sanitarios comparado con infecciones causadas por cepas no resistentes (Guzmán-Blanco *et al.*, 2009), además del incremento del costo puede causar el fracaso en de la terapia, y causar diseminación de resistencia a antibióticos tanto a patógenos humanos como a patógenos animales (Flórez y Mayo, 2015).

El número de bacterias que son resistentes a antimicrobianos está aumentando rápidamente debido uso generalizado de agentes antimicrobianos en agricultura, ganadería y enfermedades humanas en combinación con medidas insuficientes de control de infecciones, son causas la actual pandemia de la resistencia antimicrobiana de patógenos humanos (Pesavento *et al.*, 2007; Kluytmans, 2010).

El surgimiento de MRSA está relacionada con terapia antimicrobiana prolongada, cirugías, hospitalización prolongada, tratamiento en unidades de cuidado intensivo próximas a pacientes infectadas o colonizadas con MRSA: la piel es frecuentemente colonizada por *S. aureus*, en portadores nasales y se considera que la transmisión ocurre principalmente por medio de las manos (Leonard y Markey, 2008). La prevalencia de MRSA en humanos depende en gran parte de la región, sitio de infección y si la infección comenzó nosocomial o en la comunidad (Pesavento *et al.*, 2007). La portación nasal varía de acuerdo a la población estudiada, estudios demuestran que es más alta en niños que en adultos (Leonard y Markey, 2008), algunos individuos son colonizados transitoriamente y algunos son persistentemente (Kluytmans, 2010).

MRSA está distribuida mundialmente y constituye una preocupación principal en salud humana por su epidemiología compleja y su habilidad para adquirir nuevos mecanismos de resistencia a antibióticos (Oniciuc *et al.*, 2015). MRSA expresa resistencia a múltiples antibióticos como a las tetraciclinas, ácido fusídico, fluoroquinolonas, macrólidos, lincosamidas, aminoglicosidos y glicopeptidos (Petinaki y Spiliopoulou, 2012), así como al cloranfenicol (Hwa, 2006).

El surgimiento de *S. aureus* multiresistentes representa una respuesta secuencial a la presión selectiva impuesta por la terapia antimicrobiana; la acumulación y la diseminación de la resistencia es producto del intercambio de determinantes de resistencia preexistente portados ADN exógeno móvil constituido por transposones, bacteriófagos, islas de patogenicidad (Velázquez-Meza, 2005; Cervantes-García *et al.*, 2014), integrones, secuencias de inserción y plásmidos; estos últimos son altamente transferibles entre especies bacterianas emparentadas o no genéticamente causando la diseminación de genes de resistencia entre poblaciones

bacterianas (Rivera-Salazar *et al.*, 2011). La transferencia de genes entre varios miembros de especies de estafilococos es un evento frecuente que le permite la adaptación a entornos cambiantes del hospedero ya que *S. aureus* es capaz de adaptarse a una amplia gama de condiciones ambientales y rápidamente se convierte resistente a prácticamente todos los antibióticos (Visciano *et al.*, 2014). Estos elementos genéticos extracromosomales móviles contienen determinantes específicos responsables del desarrollo de la enfermedad y resistencia a múltiples antibióticos; el intercambio de genes es la clave de *S. aureus* en la evolución, la “plasticidad” genética que presenta es una explicación su éxito para colonizar y provocar el desarrollo de enfermedades (Cervantes-García *et al.*, 2014).

El acrónimo MRSA (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*), es generalmente utilizado en vez de ORSA por su papel histórico, cuando la resistencia fue descrita por primera vez, meticilina fue utilizado para tratar infecciones causadas por *S. aureus*. Sin embargo oxacilina que se encuentra dentro de la misma clase de antibióticos que la meticilina fue elegida como agente de elección para pruebas de estafilococos a principios de 1990 (Prère *et al.*, 2006).

La resistencia en bacterias de granjas puede contribuir a los altos niveles de resistencia en infecciones humanas en dos formas principales: podrían causar directamente la infección en humanos y esta infección podría ser resistente a antibióticos y la segunda; podrían colonizar el intestino (y potencialmente otros sitios como las fosas nasales), sin causar una infección y transmitir copias de sus genes de resistencia (horizontalmente) a bacterias que ya viven en el intestino humano. Las bacterias adaptadas al humano reciben los genes de resistencia y pueden subsecuentemente causar una infección si se meten en la parte equivocada del cuerpo, de esta manera el patógeno tendrá origen humano pero la resistencia será originada del uso de los antibióticos en la granja (Visciano *et al.*, 2014).

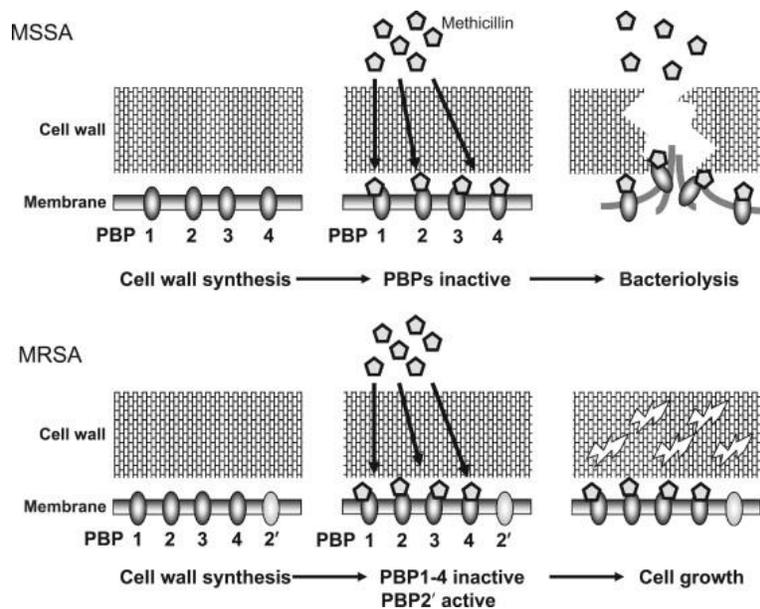
Resistencia a β -láctamicos

Genes que expresan resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus* pueden ser en ADN plasmídico o cromosómico, resistencia a la meticilina es cromosomal por lo que su difusión es más lenta pero continua (Pesavento *et al.*, 2007). Resistencia a la meticilina está asociada con la adquisición de una isla de resistencia llamada *SCCmec*, un fragmento de ADN exógeno, de tamaño variable, que está ausente en las cepas de cepas meticilina sensible (Stefani y Goglio, 2010).

El elemento central de la resistencia a la meticilina es la adquisición horizontal del gen *mecA*, el cual se introduce en un elemento genético móvil grande, conocido como casete cromosomal estafilocócico *mec* (“*staphylococcal cassette chromosome mec* *SSCmec*) en una cepa de *Staphylococcus aureus* meticilina-susceptible. (Grundmann *et al.*, 2006; Bustos Martínez *et al.*, 2006).

Este cassette no es endógeno de la bacteria y se encuentra integrado en el cromosoma, el gen *mecA* codifica para una proteína de unión a la penicilina (PBP) de 78 kDa, llamada PBP2a (Bustos Martínez *et al.*, 2006). PBP2a es una transpeptidasa que, asistido por el dominio de la transglicosilada PBP2 nativo de *S. aureus* se hace cargo de la función de la biosíntesis de las paredes celulares que es de otra manera bloqueado en presencia de antibióticos β -lactámicos (Grundmann *et al.*, 2006). PBP2' (2a) es la molécula clave que confiere resistencia contra β -lactámicos, es la proteína de la unión a la penicilina, *S. aureus* meticilina susceptible (MSSA) posee 4 PBP's conocidas como PBP1-4. En MSSA todas las PBP's son inactivadas en presencia de β -lactámicos, que conduce a la muerte celular que es causada por la inhibición de la reacción de la transpeptidasa, uno de los pasos finales de la biosíntesis de la pared celular. (Kawada y Komatsuzawa, 2012). En Contraste, MRSA sobrevive en presencia de β -lactámicos porque una PBP2' extra que es específica para MRSA tiene una baja afinidad para la meticilina y todos los antibióticos β -lactámicos que se han desarrollado incluyendo las isoxazoil penicilina (Ejemplo: la oxacilina). La proteína PBP2a conserva su actividad en presencia de β -lactámicos permitiendo continuar con la síntesis de peptidoglicano para la pared célula aun cuando las PBP normales estén inhibidas por los antibióticos (Bustos Martínez *et al.*, 2006; Kawada y Komatsuzawa, 2012).

Figura 3: Mecanismo de resistencia a β -lactámicos en *S. aureus*.



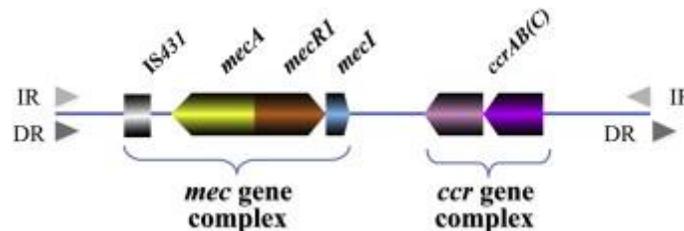
En las MSSA, todas las PBP se inactivan en presencia de β -lactámicos, lo que lleva a la muerte celular. MRSA sobrevive en presencia de β -lactámicos porque un PBP que es específico para MRSA llamada PBP2', tiene una baja afinidad por β -lactámicos y conservan su actividad en presencia de esta clase de antibióticos. Fuente: Kawada y Komatsuzawa, (2012).

Factor *fem* o factor *aux* (auxiliar), son genes cromosomales distintos del *mec*, necesarios para la completa expresión de resistencia, destacan *fem A,B,C,D, E y F* mapeados en diferentes sitios (Gil, 2000). Los genes *femA* y *femB* han demostrado codificar proteínas que afectan considerablemente el nivel de resistencia a la meticilina además de ser sugeridos como específicos para *S. aureus*, el gen *femB* está localizado lejos del gen *mecA* en el cromosoma y codifica una proteína de 47 kDa (Kobayashi *et al.*, 1994).

Casete cromosómico estafilocócico *mec*

El elemento está compuesto por el complejo genético *mec* codificando el gen *mecA* de resistencia a la meticilina y sus genes reguladores (*mecR1* y *mecI*), y el complejo genético *ccr* codificando el casete cromosoma-recombinasa (CCR), que media la integración así como su escisión precisa en el cromosoma estafilocócico; SCC es un vehículo en especies estafilocócicas para intercambiar genes que son útiles para su adaptación a nichos con diversas condiciones ambientales incluyendo presión antibiótica (Hiramatsu *et al.*, 2014).

Figura 4: Estructura del casete estafilocócico cromosomal (SCC*mec*).



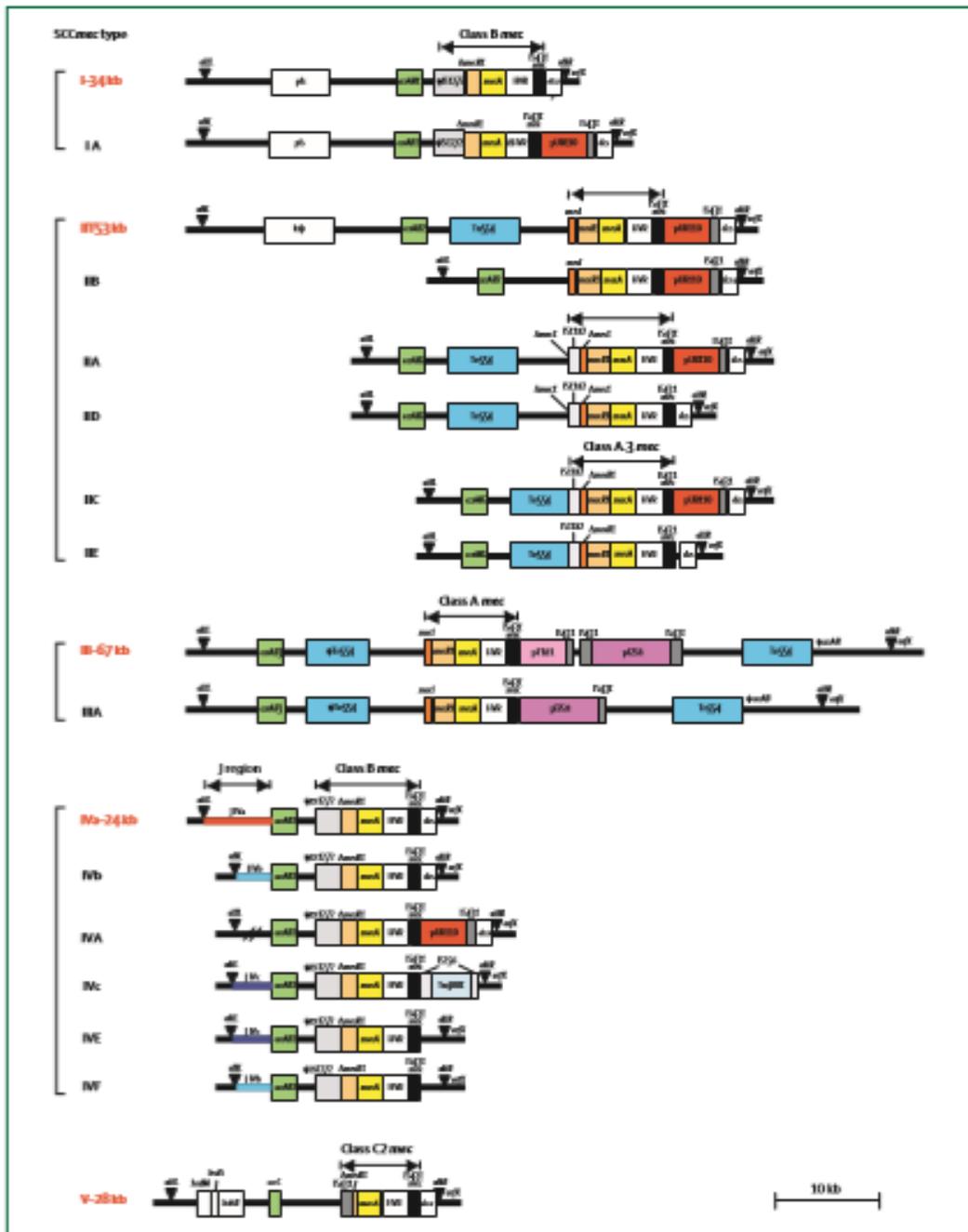
Se compone de dos complejos de genes esenciales, uno de ellos es el complejo *gen-mec* que codifica la resistencia a la meticilina (gen *mecA*) y sus reguladores (*mecI* y *mecR1*), y el otro es el complejo *gen-CCR* que codifica el movimiento, (integración y escisión precisa para formar el cromosoma) de la totalidad de la totalidad del elemento SCC. IR repetición invertida; DR repetición directa. Fuente: Hiramatsu *et al.*, (2014).

SCC*mec* es una isla genómica (Gisland), que se inserta en el cromosoma al final del extremo 3' de un marco de lectura abierta de función desconocida ("open Reading frame", ORF), denominado *orfX*, en un sitio único (*attB_{scc}*), situado cerca del origen de la replicación de *S. aureus*, por lo tanto se replicara en una etapa más temprana, que podría tener una importancia estratégica para la transcripción inmediata de los genes de resistencia a antibióticos importados. Para su movilización (escisión e integración), en el cromosoma SCC*mec* contiene genes específicos designados recombinasas casete cromosoma (*ccrA/ccrB* o *ccrC*) (Grundmann *et al.*, 2006; Bustos Martínez *et al.*, 2006).

Cepas de MRSA son caracterizadas por fenotipo de resistencia múltiple como consecuencia de una acumulación y organización en la región *SCCmec* de determinantes de resistencia a través del tiempo, esta región actúa como un sitio de integración de plásmidos, transposones y secuencias de inserción. Tipos de *SCCmec* e inserción y supresión de otros elementos genéticos móviles podrían estar relacionados en la modulación del comportamiento epidémico de cepas de MRSA de similar antecedentes genéticos independientemente del uso de antibióticos (Stefani y Goglio, 2010).

Se conocen 12 tipos de *SCCmec* que se diferencian por la estructura de su *ccrA-B* y complejos *mecA* (Wu *et al.*, 2015), y algunas variantes de acuerdo con la combinación de los complejos *mec* y genes *ccr* que contienen. Además los elementos *SCCmec* difieren entre sí en los genes de resistencia a antibióticos no β -lactámicos que poseen; los tipos *SCCmec* I, IV y V no contienen otros genes de resistencia adicionales al *mecA*, con la excepción de las variantes IA, IVA y IVC, los tipos *SCCmec* II y III contienen muchos genes de resistencia a antibióticos y metales pesados, en plásmidos o transposones como se muestra en la figura 5 (Grundmann *et al.*, 2006). Los tipos II y IV se encuentran circulando en cepas de MRSA en México.

Figura 5: Organización genómica de SCCmec I al V y variantes.

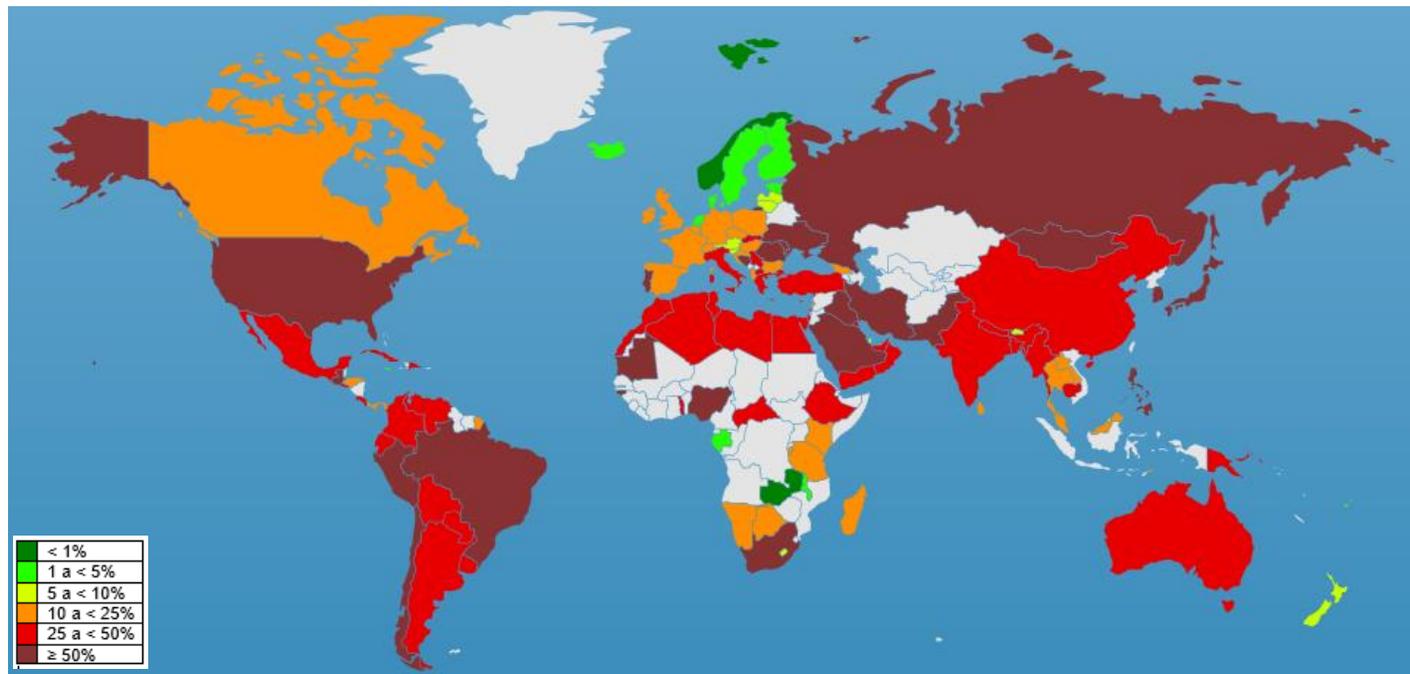


Fuente: Grundmann *et al*, (2006).

MRSA en el mundo

Staphylococcus aureus resistente a la meticilina, es hoy en día el patógeno más comúnmente identificado en varias partes del mundo, incluyendo Europa, América, África, Medio Oriente y Asia (Ippolito *et al.*, 2010). MRSA se ha difundido ampliamente entre países y en todos los continentes; >50% de los aislamientos de *S. aureus* muestran resistencia a meticilina en EUA, en países de Europa (Guzmán-Blanco *et al.*, 2009). Los porcentajes de prevalencia varían de país y continente y dependen de varios factores como la fuente de muestreo, el origen geográfico, la sensibilidad de los métodos de identificación y la cantidad de muestras (Shanehbandi *et al.*, 2014).

Figura 6: Prevalencia mundial de MRSA mostrado por país.



Fuente: Guzmán-Blanco *et al.*, (2009); Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC) (2013); Antimicrobial resistance Global Report on Surveillance (2014); Grundmann *et al.*, (2006).

Cuadro 5: Clasificación de MRSA.

MRSA ADQUIRIDO EN HOSPITAL (HA-MRSA)	MRSA ADQUIRIDO EN LA COMUNIDAD (CA-MRSA)	MRSA ASOCIADO AL GANADO (LA-MRSA)
<p>Es la causa número uno de infecciones en hospitales.</p> <p>La primera cepa fue aislada en 1961 en Londres, Reino Unido.</p> <p>Cepas involucradas solo en infecciones nosocomiales.</p> <p>La mayoría de las infecciones se manifiestan como complicaciones de procedimientos del cuidado de la salud, los pacientes son colonizados y e infectados durante la hospitalización o en estancias en centros de Salud a largo plazo; después de una operación o después del contacto con una persona que tienen una infección o es portador asintomático de MRSA.</p> <p>Incrementado especialmente en pacientes hospitalizados con severas infecciones de tejidos blandos, infecciones de torrente sanguíneo y neumonía; también está presente en infecciones de sitio quirúrgico como: neurológicas, ortopédicas, cardíacas, vasculares y obstétricas/ginecológicas.</p>	<p>Fuera de ambientes hospitalarios.</p> <p>En 1990 aparecieron las infecciones por CA-MRSA y estas infecciones fueron asociadas con linajes genéticamente distintos de MRSA.</p> <p>Emergió en individuos sanos sin enlaces a ámbitos hospitalarios y sin factores de riesgo previos, se diseminan de persona a persona en hogares</p> <p>Particularmente virulento, más susceptibles a otra clase de antibióticos que a los β-lactámicos, sus genotipos no son los mismos que los aislamientos de hospitales locales, más propensos a codificar un putativo factor de virulencia llamado leucocidina Pantón Valentine y produce toxinas exfoliativas.</p>	<p>En 1970 se reportó por primera vez infecciones en animales por MRSA, cuando la bacteria fue aislada de leche de vacas lecheras con mastitis en Bélgica. Los riesgos potenciales para la prevalencia de LA-MRSA son el tratamiento de antibióticos, la duración del tratamiento y la higiene de la granja, así como el contacto animal intensivo.</p> <p>Se ha mostrado la relación directa entre el uso de antibióticos en animales y la transferencia de organismos resistentes a antimicrobianos a humanos.</p> <p>Detectado en animales productores de alimentos; puercos, ganado vacuno, pollos, caballos y animales de compañía.</p> <p>Causa necrosis, condronecrosis bacteriana, que causa debilidad en las piernas/cojera, septicemia, enfermedad</p>

<p>La infección aumenta la morbilidad, el riesgo de mortalidad y costos. Esas infecciones también causan daños psicológica y financieramente.</p> <p>El costo social se acumula ya sea directamente por los gastos causados por la extensión de la estancia en el hospital, diagnóstico adicional o procedimientos terapéuticos o indirectamente mediante la pérdida de la productividad, discapacidad a largo plazo y un exceso de mortalidad. Otras repercusiones financieras incluyen los costos de contención de los brotes o los hábitos de prescripción de antibióticos empíricos deliberados o involuntarios.</p> <p>Las cepas HA-MRSA tienden a ser multiresistentes, generalmente producen enterotoxinas y síndrome del shock tóxico. Portan <i>SCCmec</i> I, II, III y VIII.</p> <p>La prevalencia varía entre instituciones de salud y áreas geográficas.</p>	<p>Pequeño cassette estafilocócico metilina resistente <i>mec</i> (<i>SCCmec</i>) tipos IV, V, VI, y VII.</p> <p>Lo común de estos grupos es el alta intensidad de contacto físico que podría contribuir a la transmisión; se ha aislado de poblaciones indígenas, indigentes, hombres que tienen sexo con otros hombres, reclusos, militares reclutados, niños en guarderías y atletas competitivos, también se ha aislado de niños y adultos con lesiones en la piel y tejidos blandos, artritis séptica, bacteremia, síndrome del shock tóxico, fascitis necrosante y neumonía necrosante.</p>	<p>supurativa, mastitis, artritis e infección del tracto urinario</p> <p>Varía de acuerdo a algunos factores, incluyendo el país, tipo de granja y edad de los animales</p> <p>Produce toxinas extracelulares, enterotoxinas, Síndrome de Shock Tóxico, adhesinas, proteasas, capsula, porta <i>SCCmec</i> III, V, IV, II</p> <p>Es el patógeno más común que causa infecciones intramamarias en vacas lecheras.; se ha aislado de especies diferentes de animales en las que se incluyen, caballos, ovejas, cerdos, vacas lecheras, terneros y gallinas.</p> <p>Transmisión de MRSA de puercos a granjeros, ganado a granjeros y entre pollos y granjeros</p>
--	---	--

Fuente: Guzmán-Blanco *et al.*, (2009); Grundmann *et al.*, (2006); Petinaki y Spiliopoulou (2012); Luini *et al.*, (2015); Pesavento *et al.*, (2007); Ferreira *et al.*, (2014); Traversa *et al.*, (2015); Stefani y Goglio, (2010); Rodríguez-Lázaro *et al.*, (2015); Fluit (2010); Leonard y Markey, (2008).

MRSA en animales de compañía y especies marinas

La presencia de MRSA en animales de compañía como caballos, perros y gatos se debe principalmente a la transmisión de un reservorio humano de la misma manera que aquellos destinados a la producción de alimentos (Kluytmans, 2010), además es capaz de colonizar el pelaje de perros sanos (Leonard y Markey, 2008). Perros y gatos son capaces de intercambiar patógenos resistentes con humanos, reforzando el hecho de que la transmisión humano-animal y animal-humano es posible, también se ha encontrado en animales marinos como focas, delfines, morsas en el que se establece la posibilidad de transmisión por agua, colonización transitoria de los mamíferos y la necesidad de aplicar medidas de control de infección (Petinaki y Spiliopoulou, 2012).

Las maneras en que MRSA puede ser transmitida a animales son a través de contacto directo con los animales, contaminación ambiental y comiendo o manipulando alimentos contaminados; individuos que están en contacto directo con animales de la granja que portan MRSA tienen un alto riesgo de adquirir (Petinaki y Spiliopoulou, 2012).

MRSA en alimentos

El uso de antimicrobianos en la producción de alimentos de origen animal contribuye a que organismos resistentes y genes de resistencia se puedan transmitir de animales a humanos por contacto directo o a través de la cadena alimenticia y la virulencia del microorganismo implicado puede conducir a enfermedades humanas más difíciles de tratar debido a la presencia de resistencia antimicrobiana, además las bacterias resistentes ingeridas pueden transferir sus genes de resistencia a las bacterias de la flora del comensal humano (Kluytmans, 2010).

El peligro que representan manipuladores en la transmisión de alimentos contaminados es muy reconocido y su rol es crucial en la determinación del estatus higiénico del producto final, la manipulación deficiente incrementa la posibilidad de la contaminación transmitida de estafilococos enterotoxigenicos o multiresistentes ya que la transferencia de genes puede ocurrir durante la fabricación de alimentos debido a que *Staphylococcus aureus* es altamente prevalente en alimentos y ambientes de producción de alimentos, y MRSA podría seguir el mismo patrón de transmisión (Ferreira *et al.*, 2014).

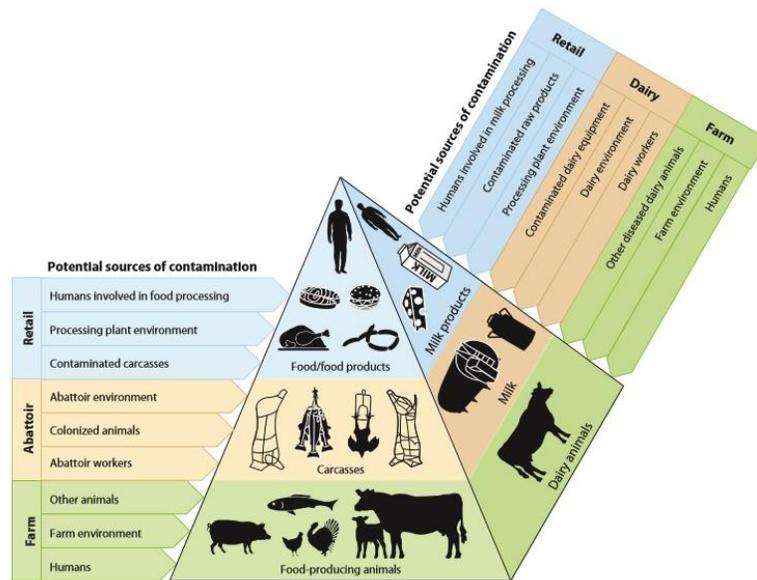
Animales y cadenas de alimentos son una ruta potencial para la transmisión de microorganismos entre los animales productores de alimentos incluyendo fauna silvestre y humanos y viceversa (Traversa *et al.*, 2015). En la población en general y en individuos inmunocomprometidos la transferencia de bacterias resistentes a antibióticos al tracto gastrointestinal es de manera muy eficiente; y es un sitio donde puede ocurrir la transferencia de genes desde bacterias resistentes a susceptibles, entre bacterias no patógenas y bacterias patógenas o oportunistas; la transferencia

puede ser de tres maneras; mediante residuos de antibióticos en alimentos, a través de patógenos resistentes transferidas por alimentos o por la ingestión de partes resistentes de la microflora original y la transferencia de la resistencia a los microorganismos patógenos (Pesavento *et al.*, 2007; Flórez y Mayo, 2015).

Se ha identificado MRSA en productos cárnicos vendidos al menudeo, leche cruda, productos lácteos, pescado crudo y listo para consumir (Ferreira *et al.*, 2014), carne vendida al menudeo, en Suiza y Japón con prevalencias de 23 y 65%, durante el sacrificio se puede producir la contaminación de los animales portadores a las canales, en ese sentido, la Agencia Holandesa de seguridad alimentaria realizó un muestreo en alimentos vendidos al menudeo donde MRSA se aisló de 264 (11.9%), de 2217 muestras analizadas (Kluytmans, 2010). La presencia de MRSA asociado a alimentos es de gran preocupación debido al potencial que tiene para su diseminación en la población, debido a que pueden ser una ruta exitosa para la transmisión de linajes de MRSA y su prevalencia varía ampliamente dependiendo del animal y del país de origen (Oniciuc *et al.*, 2015), los aislamientos de MRSA portan el tipo *SCCmec IVc* y *PVL* genes (Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2015).

Hay diferentes maneras en que los alimentos de origen animal pueden ser contaminados con MRSA como se muestra en la figura 7. MRSA ya presente en o sobre el animal puede contaminar las canales durante el proceso de sacrificio en la disección de cadáveres o evisceración y puede ser transferido al medio ambiente del matadero (durante el desplume de pollos y pavos o depilación de los cerdos), representando una fuente de contaminación para otros canales y trabajadores de los rastros. Personal colonizado que interviene en el proceso de masacre también pueden transferir MRSA a los canales; también puede ser transferido directamente de los seres humanos y herramientas contaminadas durante el posterior procesamiento de los alimentos (Wendlandt *et al.*, 2013). La higiene de manos (lavar con jabón y agua o usando un desinfectante de manos a base de alcohol), ha sido considerada una de las medidas de control de infecciones más importantes para su prevención (Ferreira *et al.*, 2014).

Figura 7: Presentación esquemática de las fuentes potenciales de *Staphylococcus aureus* (MRSA), contaminación a nivel de la granja, rastros, lácteos y venta al por menor.



Fuente: Wendlandt *et al.*, (2013)

Alimentos fermentados como el queso, en el cual crecen varios tipos de bacterias en altas densidades celulares juegan papeles clave en la transmisión de resistencia a antibióticos entre benéficos/comensales y bacterias patógenas debido a que comunidades complejas de bacterias componen la microbiota natural del queso, además de una serie de microorganismos ambientales se desarrollan y cambian en alimentos fermentados a través del tiempo particularmente en aquellos quesos a partir de leche cruda que no tienen un cultivo iniciador y los quesos hechos con leche cruda han sido reportados con altas cargas de genes resistentes a antibióticos (Flórez y Mayo, 2015).

5. QUESO FRESCO

Sistemas de producción lechera en México

Según el SIAP (2007), en México existen cuatro sistemas productivos de leche: El especializado, el semiespecializado, el de doble propósito y el familiar (o de traspatio).

Especializado: Cuenta con ganado de la raza Holstein y en menor medida Jersey y Pardo Suizo Americano, posee tecnología altamente especializada para la producción láctea; el sistema de manejo del ganado es predominantemente estabulado, la dieta del ganado se basa en forrajes de corte y alimentos balanceados, la ordeña está mecanizada y los volúmenes producidos se destinan principalmente a las plantas pasteurizadoras y transformadoras.

Semiespecializado: En la base genética de este sistema predomina la raza Holstein y Pardo Suizo, sin llegar a los niveles de producción y lactancia del sistema especializado. El ganado se mantiene en condiciones de semiestabulación, se desarrolla en pequeñas extensiones de terreno. Las instalaciones están acondicionadas o adaptadas para la explotación del ganado. La ordeña se realiza en forma manual, con ordeñadoras individuales o de pocas unidades. En su mayor parte carece de equipo propio para el enfriamiento y conservación de la leche, por lo que se considera un nivel medio de incorporación tecnológica en infraestructura y equipo. Existe cierto tipo de control productivo y programas en reproducción que incluye inseminación artificial.

Doble propósito: Utiliza razas Cebuinas y sus cruza, se caracteriza porque el ganado es para producción de carne y leche. El manejo de los animales se efectúa en forma extensiva y su alimentación se basa en el pastoreo con un mínimo de suplementación alimenticia y ocasionalmente con el empleo de subproductos agrícolas. Cuenta con instalaciones adaptadas y la ordeña se realiza en forma manual.

Familiar (o de Traspatio): Este sistema representa la tradición ganadera de nuestro país. La explotación del ganado se limita a áreas pequeñas, cuando se ubican cerca de las viviendas se les denomina de "traspatio". Los animales son preferentemente de las razas Holstein y en menor proporción Suizo Americano y cruza; se le puede encontrar estabulado o semiestabulado; la alimentación se basa en el pastoreo o en el suministro de forrajes y esquilmos provenientes de los cultivos que produce el mismo productor. La producción de leche se considera de buena calidad (SIAP, 2007). Gran parte de los productores no cuentan con equipo de enfriamiento y presenta deficiencias de control sanitario en la producción, los productores no reciben capacitación y tienen acceso limitado al crédito y la tecnología. Este sistema de producción requiere de una fuerte reconversión en las formas de producir que

atañen a la calidad y a la productividad no solo de leche, sino también de sus derivados (Villegas, 2004).

Queso

Según la NOM-243-SSA1-2010, queso “es el producto elaborado de la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida de la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior, por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos y que por su proceso pueden ser: fresco, madurado o procesado y quesos de suero”.

Asimismo hace la clasificación de los quesos en 4 categorías:

Queso fresco: Además de cumplir con la descripción general de queso se caracterizan por su alto contenido de humedad, y por no tener corteza o tener corteza muy fina, con o sin adición de aditivos e ingredientes opcionales.

Quesos madurados: De pasta dura, semidura o blanda y pueden tener o no corteza; son sometidos a un proceso de maduración mediante adición de microorganismos, bajo condiciones controladas de tiempo, temperatura y humedad, para provocar en ellos cambios bioquímicos y físicos característicos del producto del que se trate, lo que le permite prolongar su vida de anaquel, los cuales pueden o no requerir condiciones de refrigeración.

Quesos procesados: Elaborados con mezclas de quesos, fusión y emulsión con sales fundentes, aditivos para alimentos permitidos e ingredientes opcionales, sometidos a proceso térmico de 70°C durante 30 segundos o someterse a cualquier otra combinación equivalente o mayor de tiempo y temperatura, lo que le permite prolongar su vida de anaquel.

Quesos de suero: Obtenidos a partir del suero de leche entera, semidescremada, o descremada pasteurizada de vaca, cabra u oveja, el cual es coagulado por calentamiento en medio ácido para favorecer la obtención de la cuajada, la que es salada, drenada, moldeada, empacada y etiquetada y posteriormente refrigerada para su conservación.

Producción de queso en México

En México el queso se ha elaborado desde los tiempos de la Colonia, cuando los conquistadores españoles trajeron a la Nueva España los primeros rebaños de cabras, ovejas y ejemplares de ganado criollo, sin embargo la agroindustria quesera presenta registros sólo en algunas regiones a partir de la década de los años treinta no obstante el queso se elaboraba y se comercializaba desde antaño a nivel familiar

o artesanal (Villegas, 2004). Desde la introducción del queso al país, estos productos fueron modificados, moldeados y adaptados a las condiciones y a nuestros gustos; con sus sabores, aromas y texturas se incorporaron a la gastronomía nacional en donde se encuentran como ingrediente principal en un gran número de platillos logrando ser reconocido como patrimonio cultural (Grass-Ramírez y Cesín-Vargas, 2014). En nuestro país predomina el consumo de quesos frescos, mismos que forman parte de una enorme variedad de platillos que constituyen nuestro legado gastronómico (Ramírez-López y Vélez-Ruíz, 2012). La relevancia de los quesos mexicanos genuinos no se evidencia en panorama actual ya que mientras algunos han incrementado su producción, otros presentan un proceso gradual de desaparición que se manifiesta en una menor producción e inferior participación en el mercado (Grass-Ramírez y Cesín-Vargas, 2014).

La transformación de la leche en queso involucra una importancia económica y social múltiple pues permite guardar la leche en forma natural, con el objetivo de transportarla a centros de consumo para su fácil comercialización, o bien para conservar los sólidos de la leche en aquellas zonas de condiciones ambientales hostiles a la preservación, como es el trópico, las zonas calurosas y secas, además constituye una forma de comercializar la leche en regiones donde no existe el hábito de consumo de leche fluida (Cervantes *et al.*, 2008).

La quesería artesanal se considera como una importante generadora de valor agregado al sistema de producción de leche en México, reviste gran importancia al elaborar un alimento valioso de bondades nutricionales, de gran diversidad composicional y sensorial para los consumidores, además del valor económico que representa la actividad procesadora al generar un valor agregado a la leche y su capacidad para generar, ampliar y mantener el empleo de un gran número de trabajadores sobre todo del medio rural; ofrece oportunidades a pequeños y medianos productores de leche que no encuentran espacio en las cadenas industriales, también aportan estabilidad al precio de la leche en periodos de estacionalidad, mejora los ingresos familiares en los territorios en donde se producen, lo cual estimula el interés y la permanencia en la actividad quesera (Villegas, 2004; Cervantes *et al.*, 2008; Grass-Ramírez y Cesín-Vargas, 2014).

Los quesos tradicionales también se definen a partir de criterios relacionados con la tecnología, la forma y el tamaño o denominación, por lo que los quesos mantienen un profundo vínculo territorial, la conservación del saber-hacer y las particularidades que le otorga la leche, así como el clima en el proceso de fermentación y maduración de las cuajadas, otorgan oportunidades para explorar procesos de calificación y certificación de estos productos (Grass-Ramírez y Cesín-Vargas, 2014).

La agroindustria quesera transforma la materia prima más perecedera debido a su alta concentración de microorganismos (mayor a 100 000 células/ml), a su riqueza

en nutrientes y a su elevado porcentaje en agua (mayor a 85%), actividad que se realiza en horas posteriores a partir de la ordeña (6 horas si es bronca y menos de 24 si es enfriada y pasteurizada). La producción es influenciada por la estacionalidad es decir; a escasez y a excedentes de leche influyendo en la capacidad utilizada en las plantas, en la mano de obra y en el mercado de productores, es una actividad pesada debido a que labora paralelamente a la actividad productora de la leche, y es más notable en empresas pequeñas, que no poseen métodos de conservación de la leche fluida (Cervantes *et al.*, 2008).

Se define a la quesería en tres estratos según el volumen de leche que procesa diariamente:

- Pequeña: Volúmenes menores de 2000 lt/día
- Mediana: Entre 2000 y 20000 lt/día
- Gran industria: Volumen mayor a 20 000 lt/día

La producción artesanal se realiza en unidades de producción pequeñas y generalmente mal planeadas, requiere mucha mano de obra que maneja métodos operativos empíricos, producto de la práctica y repetición que carecen de conocimientos de base científica, escasa maquinaria, utensilios mínimos e indispensables para la transformación de la leche (ollas o tinas para cuajar, mesas de madera o metal para moldear y amasar, quemadores de gas, liras o palas de madera para cortar la cuajada, cubetas, enseres menores y en el menor de los casos termómetro, densitómetro o balanza), la complejidad de la tecnología está en función del queso que se va a elaborar, los procesos no son estandarizados, maneja bajos volúmenes de producción operando al margen de la normatividad técnica y sanitaria que deberían cumplir, viven en el rezago tecnológico en cuanto a sus elementos materiales, componentes tecnológicos como el manejo de la información (contabilidad), organización para la producción y comercialización, estrategias de mercado y calidad. (Villegas, 2004; Cervantes *et al.*, 2008).

La desigualdad en el ingreso y en la cultura entre la población de la República Mexicana podría explicar los “nichos” en el mercado nacional del queso, la elaboración de queso constituye la salida principal para muchos pequeños y medianos productores de leche (al venderla o industrializarla ellos mismos), ante la baja rentabilidad de su actividad, originada por el incremento de los insumos para la producción y el bajo margen de la apropiación en la cadena agroindustrial leche/derivados lácteos, la mayoría de los quesos que son elaborados a nivel artesanal circulan en un ámbito comercial regional, a veces muy estrecho de unos cuantos municipios (Villegas, 2004).

Los quesos mexicanos genuinos contribuyen a la preservación de la seguridad y soberanía alimentaria del país al reducir la dependencia de este tipo de productos,

contribuyen a la preservación del saber-hacer y la gastronomía regional, proveen productos lácteos a sectores de la población de bajos ingresos que sin este tipo de productos estarían obligados a consumir sucedáneos de menor calidad nutricional (Grass-Ramírez y Cesín-Vargas, 2014).

Quesos genuinos mexicanos

Los quesos genuinos, entre ellos los artesanales con base en leche cruda, son los que históricamente se elaboraron primero, dominaron por 30 siglos y tuvieron que esperar el desarrollo de la tecnología, incluyendo el uso de la descremadora, la pasteurización, la refrigeración y de cultivos lácticos seleccionados para dar paso a los quesos de leche pasteurizada (Villegas, 2004). La mayor parte de los quesos mexicanos genuinos se comenzaron a elaborar en ranchos y rancherías para aprovechar los excedentes de leche generados durante el periodo de lluvias, debido a esto, la acumulación de la producción y la ausencia de canales de comercialización estimularon el autoconsumo: queso fresco en temporada de lluvias y queso añejo en estiaje (Grass-Ramírez y Cesín-Vargas, 2014).

También son llamados quesos auténticos y/o quesos naturales, algunas variedades de queso se consumen frescos (menos de dos semanas), sin un proceso de afinamiento, la diversidad se debe a un gran número de características, como tipo de leche, tipo de pasta, consistencia de la pasta, métodos de elaboración, tamaño, forma y empaque (Villegas, 2004). Los quesos mexicanos artesanales tienen un gran potencial como desencadenadores de desarrollo económico en zonas rurales. Su importancia gastronómica y cultural es incuestionable, sin embargo, poco se sabe de ellos (Solís-Méndez *et al.*, 2012).

En México se elaboran más de 30 tipos diferentes de queso, la mayor parte artesanales y de difusión regional donde la información se basa solamente en datos proporcionados por establecimientos sujetos a registro censal (Villegas, 2004). La legislación de control sanitario en México solo aplica a empresas establecidas por lo que para las empresas pequeñas y familiares no hay un estricto control sobre la higiene con la que se producen estos alimentos; en su mayoría los quesos se elaboran sin pasteurizar y tienen una vida de anaquel de 3 a 4 días, tienen como mercado los tianguis donde se hace la entrega el día en que se efectúa (sin refrigeración), no hay un inventario de los quesos que se comercializan sin registro del fabricante y se considera que el porcentaje es de hasta el 50% de los quesos que son comercializados en el país (Picos y Torres, 2006).

Clasificación de los quesos mexicanos genuinos

Para Cervantes *et al.* (2008), los quesos nacionales pueden clasificarse siguiendo varios criterios: Según su formato (peso y tamaño), tipo de pasta, consistencia y grado de maduración entre otros.

Por su forma predominan los cilindros aplanados (queso chihuahua, el de aro, de sal, sierra, de hoja y de rueda), los de diámetro-talón (altura) (queso Cotija), los de prisma rectangular (queso adobera, chihuahua, el crema, tropical, el de poro) y otras formas como el panela (tronconica), el guaje (basto), el Oaxaca, el trenzado y el bola de Ocosingo. Por tamaño y peso oscila desde los pequeños Oaxaca (quesillos), de unos cuantos gramos para botana y golosina, hasta los de varios kilogramos (queso Cotija). Por el tipo de pasta pueden ser blandos (queso panela), semiduros (chihuahua, chapingo), duros (sierra y adobera), untables (requesón), tajables (sierra, adobera), rallables (queso de sal añejo), de pasta ligeramente cocida (el chihuahua), de pasta lavada (tipo manchego mexicano), de pasta filada (el Oaxaca, trenzado y el guaje) y están los exóticos como el caso de los chongos y el jocoque. Según el grado de maduración pueden clasificarse en frescos (la mayor parte), ligeramente madurados (poro, chihuahua, tipo manchego) y madurados (el cotija de la sierra de Jalisco, y los rancheros añejos secos). Por su área de difusión están los que se producen en varios estados del país y que se comercializan en otros lugares cercanos o lejanos, los que tienen alcance comercial regional y los que se producen en áreas restringidas del país y se comercializan localmente entre los que se encuentra el queso ranchero de aro u otro formato elaborados y vendidos en el entorno inmediato.

Sin embargo Picos y Torres (2006), los clasifican de la siguiente manera:

Quesos frescos sin prensar: Dentro de esta categoría están el queso fresco, panela y canasto se elaboran con leche pasteurizada a una temperatura de 70 a 78°C, a la cuajada obtenida se le agrega sal y no es prensada, se deja escurrir en el molde durante la noche y al día siguiente se empaqueta y sale a la venta.

Quesos frescos prensados: Se incluyen el queso fresco, ranchero o de rancho, se elaboran con leche pasteurizada a una temperatura de 80 a 90°C y el producto es prensado y se empaqueta.

Queso fresco fundido: Quesos Oaxaca, quesillo, adobera, asadero y tetilla, son elaborados artesanalmente sin la adición de cultivos lácticos. La acidificación se lleva a cabo de manera natural de la leche cruda por la adición de leche ácida o por la adición directa de ácido (acético o clorhídrico). La cuajada se deja en reposo hasta que tiene el “punto” de fundido. Este queso tiene una vida de anaquel de 3 a 5 días pues pierde la textura en anaquel y el sabor es irregular en cada lote.

Queso fresco

El queso ranchero artesanal pertenece a la categoría de los quesos frescos de América Latina conocidos también como quesos de estilo hispano en el que hay variedad de estilos de quesos frescos, cada uno con diferencias sutiles (Solís-Méndez *et al.*, 2012). El queso fresco mexicano se considera como el queso hispano más popular en los EE.UU y México, es un queso obtenido por la coagulación con

cuajo, elaborado a partir de leche descremada o semidescremada tiene un ligero sabor lácteo, con notas entre dulce y salado; este tipo de queso tiene una humedad entre 46-47%, 18-29% de grasa, 17-21% de proteína, sal de 1-3% y un pH>6.1 (Ramírez-López y Vélez-Ruíz, 2012).

Su nombre se asocia al molde que le da forma: un aro de lámina galvanizada, de plástico o de madera. El término “molido” se asocia a uno de sus pasos de elaboración en el que la cuajada se muele a mano al mismo tiempo que se sala; el de “ranchero” porque al seguir un proceso de fabricación tan sencillo es posible elaborarlo con utensilios muy rústicos en los ranchos o pequeñas poblaciones donde existe leche, presenta una escasa estandarización en materia prima y proceso (Cervantes *et al.*, 2008).

El queso ranchero es un auténtico queso mexicano hecho con leche cruda o bronca; de vaca, de cabra o una mezcla de ambas en un proceso artesanal, también es conocido como queso de aro, queso molido o ranchero, es probablemente el más difundido del país pues en su elaboración no se requieren profundos conocimientos técnicos, es un cilindro de escasa altura, con un peso que oscila entre los 200 gr. hasta un kilogramo siendo el de formato pequeño el más frecuente por ser accesible al consumidor. Es de consistencia blanda, quebradiza y sin envejecer. Tiene una vida útil corta desde unas horas hasta 7 días. El proceso de elaboración no ha cambiado en décadas, los queseros utilizan herramientas rudimentarias e instrumentos de cocina básica, no se utilizan tecnologías y equipos modernos en su elaboración. Los queseros confían sólo en sus conocimientos, ya que normalmente no están abiertos a la innovación y son reacios a cambiar o modificar su proceso de producción que resulta en una calidad variable del queso que depende del proceso empleado por cada quesero. Se vende en mercados públicos y ambulantes (Cervantes *et al.*, 2008; Solis-Méndez *et al.*, 2012).

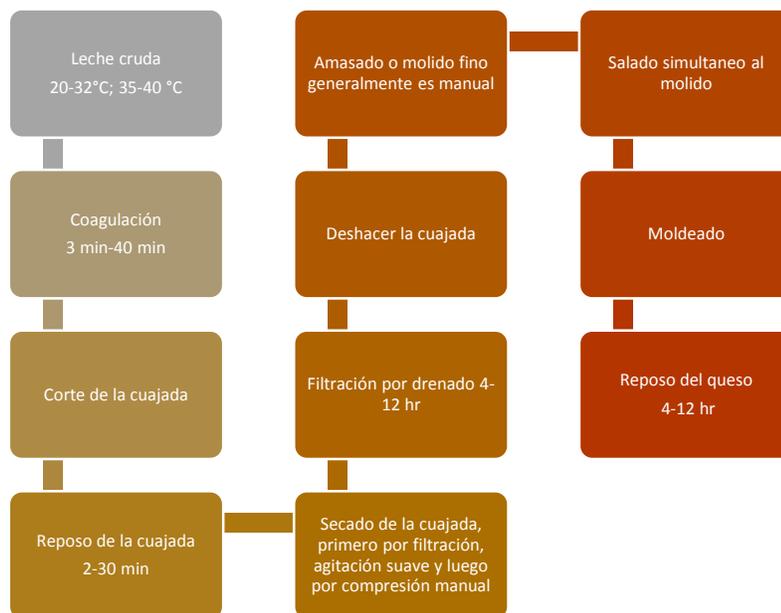
Se emplean fragmentos de cuajar (seco) de bovino o caprino, “extractos” de cuajo rustico a base de suero acido-salado, cuajo de pastilla o cuajo líquido de varias enzimas. La cuajada se corta de distintas maneras: con cuchillo, con pala de madera o con la mano (se dice que se quiebra o se bate). Se desuera aglomerándola manualmente o con la ayuda de una malla fina (Cervantes *et al.*, 2008).

Es altamente perecedero debido a su elaboración con leche cruda y elevado contenido de agua (45-55%). La composición es heterogénea debido a la materia prima y al método de elaboración (Cervantes *et al.*, 2008). Los quesos frescos tienen un sabor suave debido a la calidad bacteriológica, higiene de la leche, tipo de flora presente en la leche pasteurizada y condiciones higiénicas del proceso; otros factores que intervienen en el sabor son el tipo de coagulación de la leche (por precipitación o coagulación de la proteína) y la cantidad de sal adicionada, la vida de anaquel depende de la flora bacteriana dominante pues al no contener cultivos

lácticos en la mayoría de los casos el sabor que adquiere el queso durante la vida de anaquel depende del tipo de microorganismos que contenga (Picos y Torres, 2006).

Tienen una vida de anaquel de 3 a 5 días al ser elaborados sin una tecnología definida y sin pasteurizar mientras que los quesos elaborados con leche pasteurizada y buenas prácticas de manufactura tienen una duración de hasta 40 días. Los quesos frescos que son cultivados y acidificados tienen una vida de anaquel de 60 días, cada quesero tiene su “técnica o toque personal” pero no es un procedimiento con un proceso estándar; se utilizan procedimientos rústicos y característicos de la región (Picos y Torres, 2006).

Diagrama 1: Proceso de producción de queso fresco en la región central México.



Fuente: Solís-Méndez *et al.*, (2012); Cervantes *et al.*, (2008).

La producción de queso fresco en el Valle de Toluca surgió a la orilla de la laguna de Lerma, en tierras conocidas como Atenco propiedad de Hernán Cortés y que gracias al aprovechamiento de los humedales y pastos nativos en la temporada de lluvias para la alimentación de su ganado el cual contribuyó con derivados lácteos como: mantequilla, quesos molidos en metate, requesón y queso fresco, además la incorporación de este último a la gastronomía es documentado como ingrediente en los chiles en nogada sustituyendo a la crema (Romero *et al.*, 2010).

El queso artesanal que se comercializa en la ciudad de Toluca no está diferenciado, por lo que es susceptible de ser opacado por la imitación, calidad e higiene y producto no empacado usualmente no son consideradas importante en algunos

consumidores, debido a su menor precio y accesibilidad económica en centros de abasto (González *et al.*, 2007).

Calidad de los quesos

La calidad de los quesos es muy importante siendo factores decisivos el empleo de la leche cruda proveniente de animales sanos y de calidad o pasteurizada, las condiciones sanitarias de elaboración y almacenamiento, la maduración, uso de empaques, manejo antes del empaque y durante su comercialización y el tiempo transcurrido para ser consumido determinan la calidad final por lo que en procesos de calidad deficiente los productos son contaminados por microorganismos alterantes, dañando su estabilidad o bien con patógenos resultando un riesgo potencial para la salud del consumidor que no es la misma para todas las variedades de queso (Castro, 2007).

El número de quesos elaborados con leche pasteurizada es muy limitado, pues la mayoría se elabora con leche cruda o bronca, generalmente por la pequeña y mediana industria con el empleo de métodos artesanales y rústicos, carentes en su mayoría por un control de calidad por lo que el producto final muestra heterogeneidad composicional y organoléptica además de una limitada conservación, además altas cargas de microorganismos sanitariamente objetables como los coliformes y los patógenos (*Staphylococcus*, *Salmonella*, cepas patógenas de *Enterococos* y de *E. coli*) y las pequeñas y medianas queserías que operan con tecnología artesanal rehúyen de cualquier relación con instituciones de gobierno porque están acostumbradas a operar en la marginalidad, sin grandes compromisos de tipo fiscal, laboral y sanitario y en caso de hacerlo lo hacen a medias o evadiendo las disposiciones reglamentarias oficiales ante el solapamiento, complacencia o impotencia de las autoridades respectivas (Villegas, 2004).

Contaminación de queso por *Staphylococcus aureus*

En los países subdesarrollados *S. aureus* juega un papel importante como agente causal de mastitis subclínica y es un problema persistente en las unidades de producción debido a que se transmiten fácilmente en el rebaño durante el ordeño debido a la falta de implementación de buenas prácticas de ordeño relacionadas con la ausencia de programas de control y prevención de la mastitis y vacas lecheras con mastitis subclínica por *S.aureus* son los principales reservorios y pueden contaminar la leche al ser excretada en leche a un nivel hasta 8 log₁₀ ufc ml⁻¹, o por contaminación fecal durante el ordeño y también otros productos lácteos por lo que *S. aureus* es frecuentemente asociado con quesos de leche cruda o sin especificar (Fagundes *et al.*, 2010; André *et al.*, 2008, Medved'ová *et al.*, 2009; Kousta *et. al.*, 2010). Las medidas de control de mastitis van que incluyen desde

higiene durante el ordeño a uso de agentes antimicrobianos, sin embargo la resistencia de *S. aureus* a antibióticos tiene dos efectos relevantes; primero la reducción en las tasas de cura después del tratamiento y la segunda es el impacto potencial de transmisión de bacterias resistentes a humanos por la cadena alimentaria (Visciano *et al.*, 2014).

La prevalencia de patógenos en leche cruda es influenciada por numerosos factores, como el tamaño de la granja, número de animales en la granja, higiene, prácticas de manejo, localización geográfica, estación aunque también tipos de muestras evaluadas, diferencias en métodos de detección y variación en el muestreo; leche cruda contaminada con patógenos transmitidos por alimentos e introducidos en plantas procesadoras de lácteos constituye un riesgo a la salud humana si se usa sin pasteurizar para la producción de algunos tipos de quesos o en caso de contaminación cruzada con patógenos (Kousta *et al.*, 2010).

Los quesos son productos alimenticios listos para comer que no se someten a ningún tratamiento adicional que asegure su inocuidad antes de su consumo (Kousta *et al.*, 2010), poseen una extraordinaria calidad nutricional, pero también es un medio de crecimiento y vehículo eficiente para transmitir enfermedades bacterianas cuando son consumidos sin pasteurización (Khakpoor y Safarmashael, 2011). La contaminación de leche y productos lácteos surge en diferentes etapas de la cadena alimentaria, las principales vehículos de contaminación a nivel de granja es la piel de los animales, superficies mucosas, glándulas infectadas, diseminación de vaca a vaca a través del equipo de ordeño, prácticas de ordeño, ordeñadores han sido reportados ser fómites en la diseminación, instalaciones, agua y el ambiente, el crecimiento bacteriano también puede ocurrir durante el almacenamiento de la leche bajo abuso de temperatura o en los primeros pasos de la fabricación del queso si el microorganismo no es inhibido por las bacterias ácido lácticas (Spanu *et al.*, 2012; Rosengren *et al.*, 2010; Fagundes *et al.*, 2010; Kousta *et al.*, 2010).

Durante la producción de queso la contaminación puede ser procedente del cultivo iniciador, especialmente en el caso de un lento o insuficiente acidificación, *S. aureus* puede ser también encontrado en los productos finales, sin embargo, el insuficiente desarrollo de precauciones higiénicas podría conducir a la contaminación de la leche tratada térmicamente, por lo que es posible encontrar *S. aureus* en quesos hechos con leche pasteurizada o leche cruda (Medved'ová *et al.*, 2009). La presencia de la bacteria en los quesos artesanales está relacionada con la concentración inicial de la bacteria en la leche cruda y prácticas empleadas en la elaboración de los quesos a nivel de las fincas pueden contribuir al aumento de la población del patógeno (Valero-Leal *et al.*, 2012).

Equipo contaminado (bombas, tanques y tuberías), es generalmente causado por el mal lavado del equipo, La conservación y limpieza de los moldes, equipo y utensilios, el control de la fauna e higiene de los trabajadores son determinantes en la calidad de los quesos (Picos y Torres, 2006). Las bacterias en los quesos pueden sobrevivir fuera del producto, equipo e instalaciones de almacenamiento (Kousta *et al.*, 2010).

Para evitar contaminación de la leche cruda en la granja, buenas prácticas en la granja, manejo de animales y de residuos, tratamiento de agua, buenas condiciones higiénicas durante el ordeño y control de la mastitis son pasos esenciales para prevenir la acumulación, sobrevivencia y transmisión de patógenos; mientras que durante el procesamiento de quesos el riesgo de bacterias patógenas es eliminada por la pasteurización de la leche cruda, el tiempo de maduración, y la temperatura de conservación controlada junto con propiedades intrínsecas como el pH, actividad del agua (a_w) y la presencia de componentes antimicrobianos producidos por el cultivo iniciador constituye un sistema de obstáculos (Kousta *et al.*, 2010).

III. JUSTIFICACIÓN

La legislación en México tiene problemas de aplicación, debido a la venta de productos lácteos en los “mercados sobre ruedas” que no están en un domicilio registrado. Los quesos y productos lácteos se comercializan a temperatura ambiente y en muchas ocasiones no se tienen etiquetas con la información del fabricante y en caso de la existencia de intoxicaciones o infecciones de origen lácteo no es posible identificar el origen. Aunado a ello son escasas las empresas artesanales que satisfacen los requerimientos del Código Sanitario en cuanto a la producción, presentación, manejo y conservación del producto. La mayoría de los quesos genuinos esta fuera de la ley sanitaria por elaborarse con leche cruda o bronca y por ser frescos la mayoría de ellos por lo que requiere información sobre la presencia de patógenos durante la fabricación y maduración del queso con énfasis en la supervivencia de patógenos reconocidos como peligrosos para el hombre como lo es *Staphylococcus aureus*.

El conocimiento de la calidad básica y deseable sanitaria del queso fresco elaborado de manera artesanal permitirá emprender acciones concretas para mejorar la calidad y hacerla congruente con las Normas Oficiales Mexicanas. El conocimiento de la calidad de los quesos con leche cruda y su mejoramiento podría conducir a una mayor difusión e impulso del producto que pudiera prestigiarse y venderse por calidad, lo que repercutiría en una mayor actividad productiva al aumentar la demanda e ingresos económicos para la agroindustria artesanal tanto de leche como de quesos genuinos lo que contribuiría a la preservación del patrimonio alimentario del país.

IV. HIPÓTESIS

Los quesos frescos que se comercializan en el municipio de Toluca son quesos genuinos del Valle de Toluca que pueden ser portadores de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) lo que constituye un riesgo a la salud pública.

V. OBJETIVOS

Objetivos generales

1. Caracterizar el queso fresco comercializado en mercados populares del municipio de Toluca.
2. Determinar la presencia de *Staphylococcus aureus* MRSA/ORSA en quesos elaborados de manera artesanal y comercializados en mercados populares del Municipio de Toluca.

Objetivos específicos

- 1^a) Identificar las zonas de producción de quesos que convergen en los mercados populares.
- 1^b) Caracterizar los quesos frescos que se comercializan en los mercados populares del municipio de Toluca (humedad, materia seca, cenizas, proteínas y grasa).
- 1^c) Documentar las condiciones de venta de los quesos frescos artesanales.
- 2^a) Identificar los aislamientos de *S. aureus* por pruebas fenotípicas bacteriológicas y por PCR mediante la detección del gen *femB*.
- 2^b) Determinar la sensibilidad *in vitro* de *S. aureus* a diferentes antibióticos.
- 2^c) Identificar por PCR el gen *mecA* en los aislamientos de *S. aureus*.
- 2^d) Identificar el origen presuntivo de los aislamientos mediante el método de Biotipo de Devriese.
- 2^e) Identificar aislamientos de *S. aureus* productores de *biofilm* por métodos fenotípicos utilizando la técnica de Rojo Congo.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS

Determinación de humedad en queso fresco

Para la determinación de la humedad en el queso se utilizó la NMX-F-083-1986, en donde se utilizó una muestra de 5 gr. y se mantuvo en una estufa de secado a una temperatura de $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 4 horas y se repitió el proceso hasta obtener un peso constante (Anexo 2 y 9).

Determinación de materia seca en queso fresco

La materia seca se determinó por diferencia de peso, restando el peso de la materia húmeda al peso de la muestra seca.

Determinación de cenizas en queso fresco

La determinación de cenizas en queso fresco se llevó a cabo utilizando el procedimiento descrito en la NMX-F-094-1984, partiendo de las muestras de humedad y se incineraron a una temperatura de 550°C por 4 horas (Anexo 3 y 10).

Determinación de cloruro de sodio (NaCl) en queso fresco

Para la determinación de NaCl en queso fresco se utilizó la NMX-F-360-S-1981, se disolvieron las cenizas en ácido nítrico 6 N, se filtraron en papel filtro Watman No. 5, se lavaron y se recibieron en un matraz Erlenmeyer de 250 cm^3 con agua; a la muestra preparada se le agregó una solución de nitrato de plata con un ligero exceso conocido. Posteriormente a la combinación de los filtrados y lavados se adicionó 5 cm^3 del indicador sulfato de férrico amónico y pocos cm^3 de ácido nítrico. Se tituló el exceso de plata con una solución de tiocianato de amonio de 0.1 N hasta la aparición de un color café claro permanente y detectable (anexo 4 y 11).

Determinación de grasa en queso

Para la determinación de la grasa en el queso se utilizó el método Gerber-Van Gulik como se describe en la NMX-F-100-1984. Este método se basa en la digestión parcial de los componentes del queso; excepto la grasa, en ácido sulfúrico. Emplea alcohol isoamílico para ayudar a disminuir la tensión en la interface entre la grasa y la mezcla en reacción, lo que facilita el ascenso de los glóbulos pequeños de grasa por centrifugación. El alcohol isoamílico reacciona con el ácido sulfúrico formando un éster que es completamente soluble en dicho ácido.

Se pesó en la copa fijada al tapón $1 \text{ g} \pm 0.001 \text{ g}$ de queso, se metió la copa con la muestra dentro del butirómetro. Por la abertura superior, se agregó en el butirómetro 12 cm^3 de ácido sulfúrico hasta recubrir el queso, se tapó la abertura y se colocó en baño de agua a 338 K (65°C) por 30 minutos, se agitó 2 o 3 veces durante ese lapso para disolver todas las partículas. Posteriormente se agregó 1 cm^3 de alcohol isoamílico y se agitó. Se terminó de llenar el butirómetro con ácido sulfúrico hasta que el volumen llegó aproximadamente tres cuartas partes de la columna graduada. Se tapó la abertura superior y volvió a meter al baño de agua por 5 minutos. Se mezcló antes de centrifugar a 1,200 r.p.m., durante 5 minutos. Se metió el butirómetro al baño de agua y se dejó ahí 10 minutos. Finalmente se hizo la lectura llevando la base de la columna de grasa exactamente al cero por medio de presión en el tapón del butirómetro (Anexo 5 y 12).

Determinación de proteínas en queso fresco

El contenido de proteína cruda se obtuvo considerando el promedio de nitrógeno presente en la muestra y se utilizó el método Kjeldahl descrito en la norma NMX-F-098-1976. Se pesó en balanza analítica 0.25 g de muestra, se envolvió la muestra en el papel para evitar la pérdida de muestra y colocó en un tubo para digestión, se agregó 1 pastilla catalizadora y 12 ml de ácido sulfúrico concentrado; luego se metió el tubo en el digestor previamente calentado (a 420°C), durante 30 minutos. Posteriormente se sacó el tubo del digestor y se dejó enfriar de 20 a 30 minutos. Se agregó al tubo 60 ml de agua destilada y 50 ml de hidróxido de sodio al 40% y se colocó en el destilador. Aparte en un matraz Erlenmeyer agregó 30 ml de ácido bórico al 4% y 6 gotas de indicador verde de bromocresol rojo de metilo; donde se recibió el destilado durante 5 minutos. Finalmente se sacó el matraz del digestor y se tituló con ácido clorhídrico 0.1 N (de verde a rosa claro) (Anexo 6 y 13).

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Se recolectaron muestras utilizando las Normas Oficiales Mexicanas, NOM-109-SSA1-1994 Procedimiento para la Toma, Manejo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico y la NOM-110-SSA1-1994 Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico, según la cual las muestras se compraron y se colocaron en bolsas estériles; posteriormente se colocaron en una hielera y se mantuvieron a una temperatura de 4°C hasta su análisis microbiológico. Asimismo en el punto de venta se tomaron los parámetros de pH y temperatura (°C), se aplicaron cuestionarios a los comerciantes y se registró las condiciones de venta (Anexo 1).

Para el análisis microbiológico se utilizó la Norma oficial mexicana NOM-115-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la determinación de *staphylococcus aureus* en alimentos, en donde 11 g. de cada muestra de queso fueron pesados, posteriormente suspendidos y homogenizados en 90 ml de Agua peptonada (Bioxon) por dos minutos. El medio Baird-Parker se realizó utilizando 60 gr. de medio, adicionando 50 ml de solución de yema de huevo (60 ml de yema de huevo y 30 ml de solución salina al 8%) y una solución de telurito de potasio al 1%.

Cuenta total en placa de *Staphylococcus aureus*

Se hicieron 5 diluciones decimales y se inocularon en agar Baird-Parker (BD Bioxon, México), (Las muestras fueron obtenidas del centro o de la porción interior del queso, aunque pequeñas cantidades de la superficie también fueron incluidas en la muestra). Para inocular las placas se colocó la dilución en el centro de la placa y se destruyó uniformemente con una asa de vidrio estéril. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 24-48 h. Las colonias con morfología típica de *S. aureus*; negras, convexas y con o sin halo transparente fueron contadas.

Aislamiento e identificación bacteriológica de los aislamientos de *Staphylococcus aureus*

Los aislamientos obtenidos en Baird Parker fueron inoculados en placas de base de gelosa sangre (BD Bioxon, México), y agar de sal y manitol (BD Bioxon, México), y se incubaron a 37°C durante 24 h. La identificación de *S. aureus* se basó en la morfología de la colonia; en el agar base de gelosa sangre las colonias presentan color blanco grisáceo o amarillas, poseen forma convexa y presentan hemólisis alfa, beta o gamma (α , β , γ), en el medio sal y manitol las colonias son de color amarillo debido a la fermentación del manitol.

Se seleccionó solo una colonia del medio sal y manitol y se sometió a las pruebas de coagulasa, catalasa, fermentación anaerobia del manitol y Vogues Proskauer. Como control positivo se empleó la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 259123 y como control negativo la cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 como se muestra en la figura 8.

Figura 8: Identificación bacteriológica de *S. aureus* por métodos microbiológicos y bioquímicos.

					
Hemólisis	Fermentación de manitol por <i>S. aureus</i>	Tinción de Gram por <i>S. aureus</i>	Catalasa	Prueba de Coagulasa	Vogues-Proskauer

Conservación de aislamientos

Los aislamientos fueron conservados a -80°C en caldo infusión cerebro corazón (BHI) con 50% de glicerol en espera de análisis posteriores.

CARACTERIZACION DEL ANTIBIOTIPO DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A LA METICILINA

Sensibilidad *in vitro* de *Staphylococcus aureus*

La sensibilidad *in vitro* a antibióticos se llevó a cabo por el método de difusión en disco siguiendo el procedimiento establecido por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014), empleándose los siguientes antibióticos: Penicilina (10U), Ampicilina (10µg), Gentamicina, (10µg), Tetraciclina (30µg), Eritromicina (15µg), Trimetoprim-sulfametoxazol (1.25/23.75µg), Cefalotina (30µg), Cerufoxima (30µg), Cefotaxima (30µg), Ceftazidima (30µg)

Para la caracterizar *S. aureus* resistente a la meticilina, se emplearon unidiscos de oxacilina (1µg), cefoxitina (30 µg), y amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 µg), (CLSI, 2014).

El inóculo se preparó empleando el método de suspensión directa de colonias en caldo Mueller-Hinton, se comparó la turbidez de crecimiento bacteriano establecido por el método de McFarland 0.5 (1.5×10^8 UFC/g) (Anexo 7) Para inocular el agar Mueller-Hinton se utilizó un hisopo estéril de algodón, el cual se humedeció con la suspensión y se distribuyó uniformemente en toda la superficie de la placa, se dejó secar 10 minutos y se depositaron los discos correspondientes.

La zona de inhibición se determinó después de 24 horas de incubación y se compararon con los valores establecidos con el CLSI, (2014). Para la determinación del fenotipo de resistencia, intermedio y sensibilidad a los antibióticos para el género *Staphylococcus spp.* se usaron como controles las cepas de *S. aureus* ATCC 25923 y ATCC 43300.

DETECCIÓN DE AISLAMIENTOS DE MRSA, MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Extracción de ADN bacteriano

La extracción de ADN nuclear se llevó a cabo utilizando el kit comercial, GeneJET Genomic DNA purification Kit (Thermo Scientific, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo X).

Cuantificación del ADN

La concentración y pureza del ADN extraído se cuantificó mediante el espectrofotómetro y programa informativo de cuantificación NANO-DROP. La pureza del ADN se obtiene por la relación entre la absorbancia de 260nm y 280nm. La preparación pura del ADN presenta un cociente entre 1.8 y 2.0.

Detección de los genes *femB* y *mecA* por PCR multiplex

Todos los aislamientos de *S. aureus* fueron probados para la identificación de MRSA, el cual se llevó a cabo mediante la detección del gen *femB* (específico de *S. aureus*) y del gen *mecA* (codificante de la resistencia a la meticilina) (Kobayashi *et al.*, 1994), los iniciadores utilizados se especifican en el cuadro 6. Las condiciones de amplificación empleadas fueron las siguientes; desnaturalización inicial 94 °C por 5 minutos, desnaturalización 94°C por 1 minuto, alineación 55 °C por un minuto, extensión 72 °C por 2 minutos y extensión final a 72°C por 7 minutos.

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 25 µL. La mezcla de reacción consistió en 100 ng de ADN, 200 µM, de cada dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 10 µM de los iniciadores, excepto para *femB* del cual se utilizaron 13 µM, 1U de GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, EUA), 1.5 mM de MgCl₂ y Buffer 10X.

Cuadro 6: Secuencias de los iniciadores utilizados en la PCR y tamaños de los productos de los productos esperados.

Gen	Secuencia de nucleótidos (5' → 3')	Tamaño de amplicón (pb)	Referencia
<i>mecA</i>	Forward: AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC Reverse: AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	533	Kobayashi <i>et al.</i> , (1994).
<i>femB</i>	Forward: TTACAGAGTTAACTGTTACC Reverse: ATACAAATCCAGCACGCTCT	651	

Visualización de los amplicones

Todos los productos de amplificación de la PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/mL), (SIGMA-Aldrich, EUA). Además de ser comparados utilizando los marcadores de peso molecular, GeneRuler™ Low Range DNA Ladder 25 a 700 pb (Fermentas, EUA), para los genes *femB*, *mecA*. Después de realizar la electroforesis a 96V por 70 minutos se visualizó cada uno de los geles en UV y se capturaron en un sistema de foto documentación (minBIS Pro, Bio Imaginig Systems).

Biotipificación de los aislamientos de *Staphylococcus aureus*

Los aislamientos obtenidos fueron atribuidos a biotipos de acuerdo a la metodología descrita por Devriese (1984), utilizando 8 µg/ml como única concentración de Cristal Violeta. Las reacciones de Cristal violeta fueron leídas después de 1 y 2 días de acuerdo a los siguientes criterios:

Cuadro 7: Morfología de crecimiento en agar Soya Trypticaseína y cristal Violeta.

Morfología	Tipo de cristal violeta
Crecimiento de colonias azules o violetas con o sin halo naranja	C
Crecimiento de colonias con halos brillantes, amarillo pálido o amarillo con bordes violetas	A
Crecimiento de colonias blancas con halos azules	E

Fuente: Devriese, (1984).

Adicionalmente se realizaron pruebas de Estafilocinasa, β-hemólisis y coagulación en plasma de bovino; los resultados obtenidos permiten establecer el origen presuntivo del aislamiento como se muestra en el cuadro 8.

Cuadro 8: Biotipos de *Staphylococcus aureus*.

Biotipos de <i>Staphylococcus aureus</i>				
Biotipo	Estafilocinasa	β-hemólisis	Coagulación de Plasma de bovino (dentro de las 6 h)	Tipo de crecimiento en Cristal violeta
Ecovar Hospedero-específico				
Ecovar humano	+	-	-	C
Ecovar humano β+	+	+	-	C
Ecovar aves de corral	-	-	-	A
Ecovar bovino	-	+	+	A
Ecovar ovino	-	+	+	C
Biotipo Sin hospedero específico				
K-β+CV:C	-	+	-	C
K-β+CV:A	-	+	-	A
K+β-CV:A	+	-	-	A
K+β+CV:A	+	+	-	A
K-β-CV:C	-	-	-	C

Fuente: Devriese, (1984).

Identificación fenotípica de *biofilm* en rojo Congo

Para determinar la presencia de *biofilm* en los aislamientos de *Staphylococcus aureus* se utilizó la técnica de agar rojo Congo descrita por Freeman *et al.*, (1989), las placas contenían 0.8 g de colorante Rojo Congo, 36 g de sacarosa y 1 Lt de agar Infusión Cerebro Corazón (Bioxon), fueron inoculadas por 24-72 h. a 37°C. Las colonias características son negras de consistencia cristalina seca.

VII. LIMITE DE TIEMPO Y ESPACIO

El Municipio de Toluca, es la capital del Estado de México. Se organiza territorialmente en 47 delegaciones y 38 subdelegaciones, cuenta con una superficie total de 420.14 kilómetros cuadrados (Bando Municipal Toluca, 2015). Se ubica entre los paralelos 18°59´ y 19°29´ de latitud norte; los meridianos 99°32´ y 99°47´ de longitud oeste; altitud entre 2 400 y 4 700 m, colinda al norte con los municipios de Almoloya de Juárez, Temoaya y Oztolotepec; al este con los municipios de Oztolotepec, Xonacatlán, Lerma, San Mateo Atenco, Metepec y Calimaya; al sur con los municipios de Calimaya, Tenango del Valle, Villa Guerrero y Coatepec Harinas; al oeste con los municipios de Coatepec Harinas, Zinacantepec y Almoloya de Juárez. Ocupa el 2.03% de la superficie del Estado de México, cuenta con 97 localidades y una población total de 747 512 habitantes (INEGI, 2010). En este estudio se realizó un muestreo por conveniencia en el cual todos los productores y comercializadores de queso fresco en el municipio de Toluca fueron muestreados de acuerdo a una lista expedida por la Secretaria de Desarrollo Económico del municipio de Toluca según la cual se tienen registrados 52 tianguis y 4 mercados fijos.

La presente investigación se realizó durante el periodo de septiembre a agosto de 2014. Los procedimientos de laboratorio se llevaron a cabo en el área de Inocuidad Alimentaria del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México ubicado en el Km. 15.5 de la carretera Panamericana Toluca – Atlacomulco.

Los análisis fisicoquímicos de humedad, cenizas, grasa y proteínas se realizaron en el Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR), de la Universidad Autónoma del Estado de México.

VIII. RESULTADOS

Según el INEGI (2010), el municipio de Toluca cuenta con 22 tianguis, 7 mercados públicos y una central de abasto. La ubicación y los días de establecimiento de los mismos se tienen registrados en la Secretaría de Desarrollo Económico de la entidad (SEDECO). La procedencia del queso fresco que se comercializa en los mercados de abasto municipal es en mayor medida de los municipios de Villa Victoria e Ixtlahuaca 46.9-10.9% respectivamente. Seguida del abasto de Aculco y Toluca con 7.8%, y Almoloya de Juárez con 4.7%. En menor proporción los quesos provinieron de los municipios de Texcatitlán, Metepec, Ecatepec y San Mateo Atenco y solo algunos casos el abasto fue del estado de Jalisco (cuadro 9).

Cuadro 9: Procedencia del queso fresco en mercados populares.

Municipio	Frecuencia
Ecatepec	1.6%
Guadalajara	1.6%
Metepec	1.6%
San Mateo Atenco	1.6%
Zinacantepec	1.6%
Texcatitlán	3.1%
Almoloya de Juárez	4.7%
Aculco	7.8%
Toluca	7.8%
Desconoce	9.4%
Ixtlahuaca	10.9%
Villa Victoria	46.9%

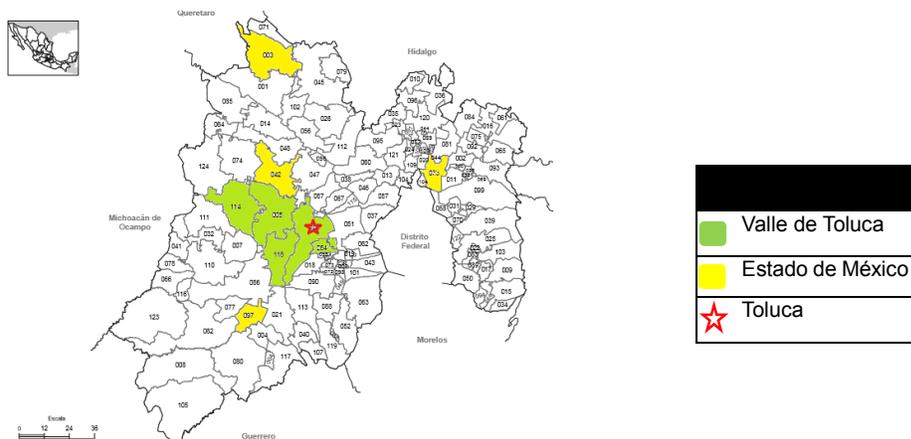
Sin embargo para un mejor manejo de la información la procedencia de los quesos se estableció a partir de la fuente de suministro (cuadro 10), en cuatro regiones: (A), Valle de Toluca que incluyo los municipios de Almoloya de Juárez, Metepec, San Mateo Atenco, Toluca, Villa Victoria y Zinacantepec; (B), los quesos originarios de otros municipios del Estado de México tales como Aculco, Ecatepec, Texcatitlán e Ixtlahuaca; (C), quesos de origen desconocido y (D), que comprendió muestras procedentes de otros estados del país (Guadalajara, Jalisco).

Cuadro 10: Procedencia del queso fresco en mercados populares por región.

Procedencia	Frecuencia
Región A	64.2%
Región B	23.4 %
Región C	11.8 %
Región D	1.6%

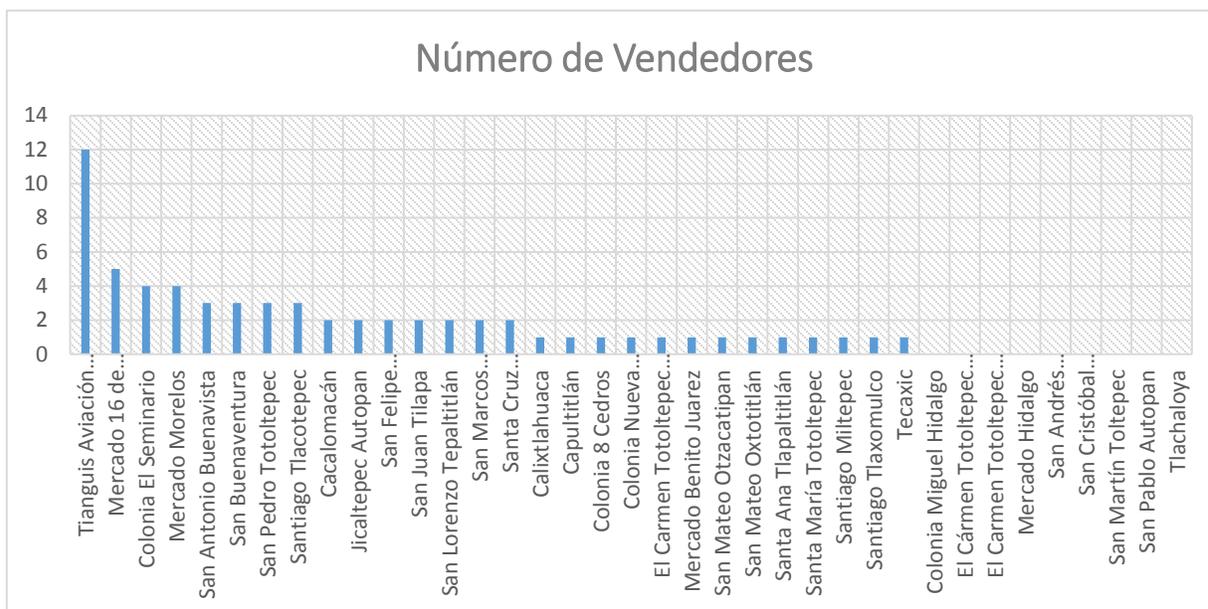
En la figura 9, se observa la frecuencia y procedencia del queso fresco que se comercializa en el municipio de Toluca. El abasto es local en su mayoría proviene de los municipios del Valle de Toluca, seguida de otros municipios del Estado de México y en menor proporción de origen desconocido y de fuera de la entidad.

Figura 9: Procedencia de los quesos en mercados y tianguis en Toluca (mapa INEGI 2015).



En el estudio se detectaron un total de 10 vendedores fijos y 54 ambulantes. La mayor frecuencia se localizó en el mercado Aviación-Autopan con 12 vendedores como se muestra en la Gráfica 1. La proporción de vendedores del queso fresco es de 80% comparada con el 20% de productores en pequeñas empresas familiares como se muestra en la gráfica 1.

Gráfica 1: Frecuencia en el número de vendedores de queso fresco.



Caracterización del queso fresco que se comercializa en mercados populares del municipio de Toluca

Los análisis fisicoquímicos permitieron realizar la caracterización del queso fresco que se comercializa en mercados populares del municipio de Toluca y el valor total de los resultados obtenidos se muestra en el cuadro 11.

Cuadro 11: Caracterización fisicoquímica del queso fresco que se comercializa en mercados populares del municipio de Toluca.

Parámetro	Valor
Temperatura de venta	7.8-26.2 °C
pH	4.84-6.07
Forma	Circular
Peso	100-250 gr.
Humedad	42.71-66.66%
Materia seca	1.678-3.3841
Cenizas	2.65-5.24%
NaCl	0.29-1.44%
Proteínas	16.81-26.62%
Grasa	12-32 %

Asimismo se muestran las medias de los resultados obtenidos de cada parámetro para los municipios como se muestra en la cuadro 12.

Cuadro 12: Valores de parámetros fisicoquímicos en los quesos frescos por municipio.

Queso Fresco								
	pH	Humedad	Materia seca	Cenizas	NaCl	Proteína	Grasa	Peso
Aculco	5.2	48	51.9	3.3	0.7	19.3	22	185
Almoloya de Juárez	5.4	48	51.3	3.4	0.8	21.5	21	180
Desconoce	5.3	47	53	3.2	0.8	22	21	170
Ecatepec	5.3	44	55.7	3.2	0.8	22.8	26	266
Guadalajara	5.7	46	54.4	3	0.7	24.2	24	180
Ixtlahuaca	5.3	48	52.5	4.3	0.7	22.4	20	152
Metepec	5.1	48	50	3.4	0.8	19	22	126
San Mateo Atenco	5.5	46	53.7	3	0.7	19.3	23	200
Texcatitlán	5.1	52	48.2	3.7	1.1	19.6	17	180
Toluca	5.2	48	51.6	3.1	0.7	19	20	170
Villa Victoria	5.3	52	48.2	3.2	1	20	19	173
Zinacantepec	5.6	49	51	3.6	0.8	19.2	21	145
Media±DE	5.3±0.26	49.5±6.5	50.3±5.4	3.3±0.8	0.9±0.4	20.6±2.1	19.9±3.7	173±34.4

pH

El pH de los quesos se situó en el rango de 5.1-5.7, el queso procedente de Guadalajara fue el que mostró el valor más alto de pH con 5.7, seguido de Zinacantepec, San Mateo Atenco y Almoloya de Juárez con valores de 5.6, 5.5 y 5.4 respectivamente; los municipios de Villa Victoria, Ixtlahuaca y Ecatepec presentaron el mismo valor de pH con 5.3; Toluca y Aculco tuvieron un valor de 5.2 y finalmente Texcatitlán y Metepec tuvieron el valor más bajo de pH con 5.1 como se muestra en el cuadro 13.

Cuadro 13: Valores de pH en los quesos frescos mostrados por municipio.

	pH					
	Media	Desviación estándar	Varianza	Coficiente de variación	Mínimo	Máximo
Aculco	5.2	0.24	0.06	4.6	4.84	5.4
Almoloya de Juárez	5.4	0.3	0.09	5.6	5.1	5.7
Desconoce	5.3	0.35	0.12	6.6	4.9	5.9
Ecatepec	5.3	0.00	0.00	0	5.3	5.3
Guadalajara	5.7	0.00	0.00	0	5.7	5.7
Ixtlahuaca	5.3	0.27	0.07	5.08	4.9	5.6
Metepec	5.1	0.00	0.00	0	5.09	5.09
San Mateo Atenco	5.5	0.00	0.00	0	5.5	5.5
Texcatitlán	5.1	0.00	0.00	0	5.1	5.1
Toluca	5.2	0.09	0.01	1.73	5.1	5.3
Villa Victoria	5.3	0.27	0.07	5.11	4.9	5.9
Zinacantepec	5.6	0.00	0.00	0	5.6	5.6

Humedad

Los quesos que mostraron mayor porcentaje de humedad fueron los procedentes del municipio de Texcatitlán con un 51.8% y Villa Victoria con 51.5%, seguidos de Zinacantepec con 49%, Almoloya de Juárez con 48.4%, Aculco con 48.1%; en un rango similar se ubicaron los municipios de Metepec, Toluca, Ixtlahuaca con valores de 47.9, 47.5, 47.5% respectivamente. Los valores más bajos fueron para los municipios de San Mateo, Guadalajara y Ecatepec con 46.3, 45.5 y 44.3% como se muestra en el cuadro 14.

Cuadro 14: Valores de humedad en los quesos frescos mostrados por municipio.

	Humedad					
	Media	Desviación estándar	Varianza	Coefficiente de variación	Mínimo	Máximo
Aculco	48.1	3.7	13.4	7.6	43.49	52.33
Almoloya de Juárez	48.4	2.06	4.3	4.3	46	49.8
Desconoce	47.0	7	49.51	14.96	34.67	55.2
Ecatepec	44.3	0.0	0.0	0	44.3	44.3
Guadalajara	45.5	0.0	0.0	0	45.46	45.6
Ixtlahuaca	47.5	8.55	73.2	18	32	56.8
Meteppec	47.9	0.0	0.0	0	47.94	47.94
San Mateo Atenco	46.3	0.0	0.0	0	46.28	46.28
Texcatitlán	51.8	0.6	0.35	1.15	51.36	52.2
Toluca	47.5	6.3	39.6	13.24	37.81	54.31
Villa Victoria	51.5	6.9	47.9	13.44	31.07	66.66
Zinacantepec	49.0	0.0	0.0	0	49	49

Materia Seca

Los quesos frescos que mostraron mayor porcentaje de materia seca fueron aquellos procedentes de Ecatepec con 55.7% seguido de Guadalajara, San Mateo Atenco, de origen desconocido e Ixtlahuaca con 54.4, 53.7, 53 y 52.5%, las muestras procedentes de Aculco, Toluca, Almoloya de Juárez y Zinacantepec mostraron valores similares con 51.9, 51.6, 51.3 y 51%. Los quesos de Texcatitlán y Villa Victoria mostraron el mismo valor con 48.2% como se muestra en el cuadro 15.

Cuadro 15: Valores de materia seca en los quesos frescos mostrados por municipio.

Materia seca						
	Media	Desviación estándar	Varianza	Coefficiente de variación	Mínimo	Máximo
Aculco	51.9	3.7	13.5	7.07	47.7	56.5
Almolya de Juárez	51.3	2.5	6	4.8	49	54
Desconoce	53	7	50	13.3	44.8	65.3
Ecatepec	55.7	0.0	0.0	0	55.7	55.7
Guadalajara	54.4	0.0	0.0	0	54.4	54.4
Ixtlahuaca	52.5	8.6	73.23	16.3	43.2	68
Metepec	50	0.0	0.0	0	50	50
San Mateo Atenco	53.7	0.0	0.0	0	53.7	53.7
Texcatitlán	48.2	0.6	0.35	1.23	47.8	48.6
Toluca	51.6	6.2	38.81	12	45.7	62.2
Villa Victoria	48.2	6.9	47	14.3	33.3	69
Zinacantepec	51	0.0	0.0	0	51	51

Cenizas

El mayor contenido de cenizas fue de los quesos procedentes de Ixtlahuaca con 4.3%, seguido de Texcatitlán con 3.7%, Zinacantepec con 3.6%, Metepec y Almolya de Juárez con 3.4%, Aculco con 3.3%, Villa Victoria y Ecatepec con 3.2%, Toluca con 3.1% y Guadalajara y San Mateo Atenco con 3 % como se muestra en el cuadro 16.

Cuadro 16: Valores de cenizas en los quesos frescos mostrados por municipio.

Cenizas						
	Media	Desviación estándar	Varianza	Coefficiente de variación	Mínimo	Máximo
Aculco	3.3	0.4	0.2	13.92	2.83	3.99
Almolya de Juárez	3.4	0.0	0.0	1.6	3.37	3.48
Desconoce	3.2	0.6	0.3	18	2.72	4.33
Ecatepec	3.2	0.0	0.0	0	3.2	3.2
Guadalajara	3.0	0.0	0.0	0	3.01	3.01
Ixtlahuaca	4.3	2.0	4.2	48	2.98	2.98
Metepec	3.4	0.0	0.0	0	3.38	3.38
San Mateo Atenco	3.0	0.0	0.0	0	3.03	3.03
Texcatitlán	3.7	0.2	0.0	5.9	3.56	3.56
Toluca	3.1	0.5	0.2	14.8	2.65	2.65
Villa Victoria	3.2	0.3	0.1	10.45	2.62	2.62
Zinacantepec	3.6	0.0	0.0	0	3.63	3.63

Cloruro de Sodio (NaCl)

El mayor porcentaje de NaCl se encontró en el queso procedente de Texcatitlán con 1.1%, seguido de Villa Victoria con 1%, en los municipios de Zinacantepec, Metepec, Ecatepec y Almoloya de Juárez se encontró un porcentaje de 0.8%, mientras que en los municipios de Toluca, San Mateo Atenco, Ixtlahuaca, Guadalajara y Aculco el valor fue de 0.7% como se muestra en el cuadro 17.

Cuadro 17: Valores de NaCl en los quesos frescos mostrados por municipio.

	NaCl					
	Media	Desviación estándar	Varianza	Coefficiente de variación	Mínimo	Máximo
Aculco	0.7	0.1	0.0	11.12	0.63	0.84
Almoloya de Juárez	0.8	0.1	0.0	11.8	0.73	0.92
Desconoce	0.8	0.2	0.0	26.27	0.62	1.2
Ecatepec	0.8	0.0	0.0	0	0.8	0.8
Guadalajara	0.7	0.0	0.0	0	0.71	0.71
Ixtlahuaca	0.7	0.18	0.0	24.5	0.53	1.05
Metepec	0.8	0.0	0.0	0	0.79	0.79
San Mateo Atenco	0.7	0.0	0.0	0	0.7	0.7
Texcatitlán	1.1	0.0	0.0	0	1.06	1.06
Toluca	0.7	0.1	0.0	9	0.64	0.81
Villa Victoria	1.0	0.5	0.3	52.6	0.35	3.35
Zinacantepec	0.8	0.0	0.0	0	0.83	0.83

Proteína

El mayor contenido de proteína por gramo fue del queso procedente de Guadalajara con 24.2%, seguido de Ecatepec e Ixtlahuaca con 22.8 y 22.4%, Almoloya de Juárez con 21.5%, Villa Victoria con 20.2%, Zinacantepec con 19.2% para Texcatitlán, Aculco, Metepec, y Toluca los valores fueron 19.6, 19.3 y 19 respectivamente y finalmente San Mateo Atenco con 18.9% como se muestra en el cuadro 18.

Cuadro 18: Valores de proteína en los quesos frescos mostrados por municipio.

	Proteína					
	Media	Desviación estándar	Varianza	Coficiente de variación	Mínimo	Máximo
Aculco	19.3	1.3	1.7	6.82	17.86	21.37
Almoloya de Juárez	21.5	1.4	2	6.61	20.66	23.12
Desconoce	22.0	2.3	5.5	10.6	18.56	25.13
Ecatepec	22.8	0.2	0.1	1.06	22.42	22.76
Guadalajara	24.2	0.5	0.2	2.02	24.17	24.87
Ixtlahuaca	22.4	2.7	7.4	12.2	19.26	26.62
Metepec	19	0.2	0.1	1.3	18.91	19.26
San Mateo Atenco	19.3	0.5	0.2	2.62	18.56	19.26
Texcatitlán	19.6	2.4	6.1	12.65	17.86	21.37
Toluca	19	1.3	1.7	6.8	17.86	21.02
Villa Victoria	20	1.8	3.4	9.1	16.8	23.47
Zinacantepec	19.2	0.2	0.1	1.3	18.91	19.26

Grasa

El mayor porcentaje de grasa por gramo fue de los quesos procedentes de Ecatepec con un 26%, seguido de Guadalajara con 24%, San Mateo Atenco con 23%, los municipios de Aculco, Metepec y Almoloya de Juárez mostraron valores similares con 22, 22 y 21 respectivamente, en Zinacantepec el valor fue de 21%; Toluca, Ixtlahuaca con 20% y Villa Victoria con 19%, el valor más bajo en este estudio fue en los quesos procedentes de Texcatitlán con 17% como se muestra en el cuadro 19.

Cuadro 19: Valores de grasa en los quesos frescos mostrados por municipio.

	Grasa					
	Media	Desviación estándar	Varianza	Coefficiente de variación	Mínimo	Máximo
Aculco	22	4.1	16.5	18.57	19	32
Almoloya de Juárez	21	2.52	6.33	12.18	17	27
Desconoce	21	5.3	28.0	25.51	14	29
Ecatepec	26	0.7	0.5	2.77	25	26
Guadalajara	24	0.7	0.5	3.01	23	24
Ixtlahuaca	20	3.8	14.5	19.5	13	23
Metepec	22	0.7	0.5	3.29	21	22
San Mateo Atenco	23	0.7	0.5	3.14	22	23
Texcatitlán	17	1.0	0.9	5.72	16	18
Toluca	20	2.7	7.2	13.49	15	23
Villa Victoria	19	3.5	12.1	18.17	11	26
Zinacantepec	21	0.7	0.5	3.45	20	21

Peso

El queso con mayor peso fue el procedente de Ecatepec con 266 gr; seguido de San Mateo Atenco con un peso de 200 gr; los quesos procedentes de Aculco con 185g, Texcatitlán, Guadalajara y Almoloya de Juárez tuvieron pesos similares de 180 g. los quesos de los municipios de Villa Victoria y Toluca mostraron resultados de 172 y 170 gr, el queso procedente de Zinacantepec tuvo un peso de 145 gr; y el queso con menor peso fue el procedente de Metepec como se muestra en el cuadro 20.

Cuadro 20: Valores de peso (gr.) en los quesos frescos mostrados por municipio.

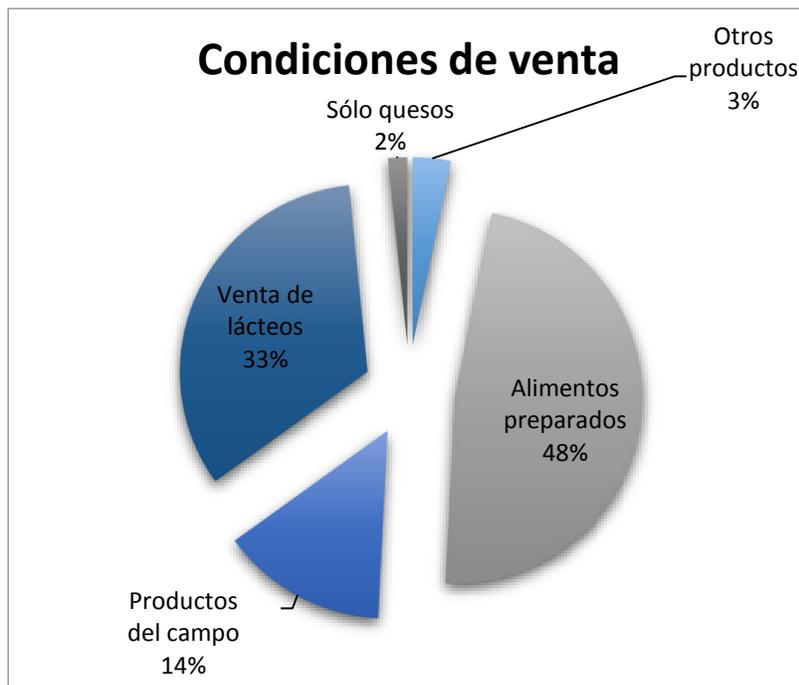
	Peso					
	Media	Desviación estándar	Varianza	Coficiente de variación	Mínimo	Máximo
Aculco	185	47.4	2248.4	25.59	125	252
Almoloya de Juárez	180	26.5	700	14.7	150	200
Desconoce	170	21.4	459	12.6	150	198
Ecatepec	266	0.0	0.0	0	266	266
Guadalajara	180	0.0	0.0	0	180	180
Ixtlahuaca	152	29.4	953	12.6	100	195
Metepéc	126	0.0	0.0	0	126	126
San Mateo Atenco	200	0.0	0.0	0	200	200
Texcatitlán	180	31	1512	21.55	153	208
Toluca	170	45.4	2058	26.62	110	230
Villa Victoria	172	31.5	995.3	18.17	105	213
Zinacantepec	145	0.0	0.0	0	145	145

Condiciones de venta

Durante el muestreo se observó que todos los quesos comercializados en mercados populares se venden a temperatura ambiente, el 59% no tenía ningún embalaje y el 41% estaban dentro de bolsas de plástico, hojas de polipapel o tapados con una servilleta. Mientras que en los establecimientos fijos 6 de los 10 tampoco tenían ningún tipo de embalaje y estaban junto a otros productos alimenticios a granel.

Un alto porcentaje de los comerciantes vende además de los quesos otros alimentos preparados con un 48%, seguida de la venta de otros derivados lácteos como leche y crema con un 33%, alimentos producidos en el campo con un 14%, otros productos como servilletas e hilos con un 3% y únicamente el 2% se dedica a la venta exclusiva de quesos como se muestra en la gráfica 2.

Gráfica 2: Condiciones de venta del queso fresco.



ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Después de la realización de las pruebas bioquímicas se obtuvieron 17 aislamientos de *Staphylococcus aureus*, los cuales proceden principalmente de los municipios de Villa Victoria (9/53%), Ixtlahuaca (3/17.6%), Aculco (3/17.6%), Toluca (1/5.9%) y de origen desconocido (1/5.9%) (Cuadro 21).

Cuadro 21: Distribución geográfica de los aislamientos de *Staphylococcus aureus*.

Municipio	No.(%) de aislamientos de <i>S. aureus</i>
Toluca	1 (5.9)
Desconoce	1 (5.9)
Villa Victoria	9 (53)
Ixtlahuaca	3 (17.6)
Aculco	3 (17.6)
Total	17(100%)

Resistencia fenotípica de los aislamientos de *Staphylococcus aureus*

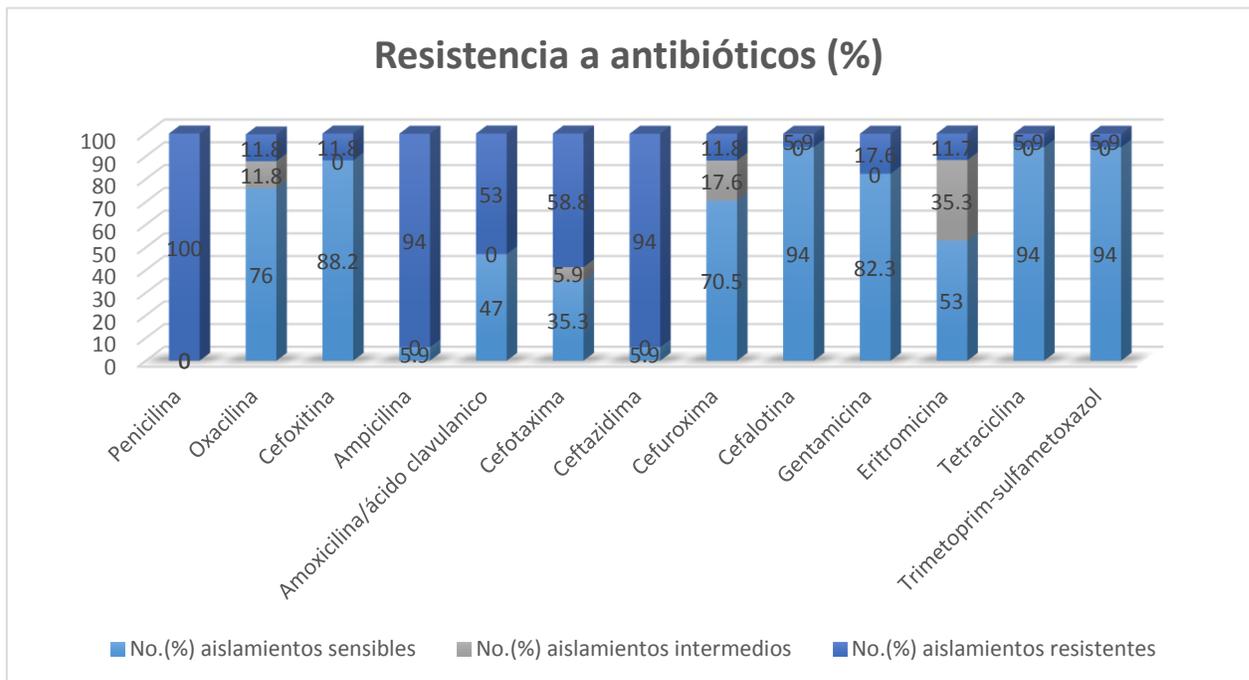
El patrón de sensibilidad *in vitro* mostró un alto porcentaje de aislamientos de *S. aureus* resistentes a los β -lactámicos, se observaron altos porcentajes de resistencia en Penicilina (17/100%), ampicilina (16/94%), ceftazidima (16/94%), cefotaxima (10/58.8%) y amoxicilina/ácido clavulánico (9/53%). Sin embargo los aislamientos también mostraron sensibilidad a antibióticos como cefalotina (16/94%), tetraciclina (16/94%), trimetoprim-sulfametoxazol (16/94%), gentamicina (14/82.3%), oxacilina (13/76%), cefoxitina (15/88.2%), cefuroxima (12/70.5%), eritromicina (9/53%) respectivamente (Cuadro 22 y gráfica 3).

Cuadro 22: Sensibilidad *in vitro* de aislamientos de *Staphylococcus aureus* a diferentes antibióticos.

Antibióticos	No.(%) aislamientos sensibles	No.(%) aislamientos intermedios	No.(%) aislamientos resistentes
Penicilina	0(0)	0(0)	17(100)
Oxacilina	13(76)	2(11.8)	2(11.8)
Cefoxitina	15 (88.2)	0(0)	2(11.8)
Ampicilina	1(5.9)	0(0)	16 (94)
Amoxicilina/ácido clavulánico	8(47)	0(0)	9(53)
Cefotaxima	6(35.3)	1(5.9)	10(58.8)

Ceftazidima	1(5.9)	0(0)	16 (94)
Cefuroxima	12(70.5)	3(17.6)	2(11.8)
Cefalotina	16 (94)	0(0)	1(5.9)
Gentamicina	14(82.3)	0(0)	3(17.6)
Eritromicina	9(53)	6(35.3)	2(11.7)
Tetraciclina	16 (94)	0(0)	1(5.9)
Trimetoprim-sulfametoxazol	16 (94)	0(0)	1(5.9)

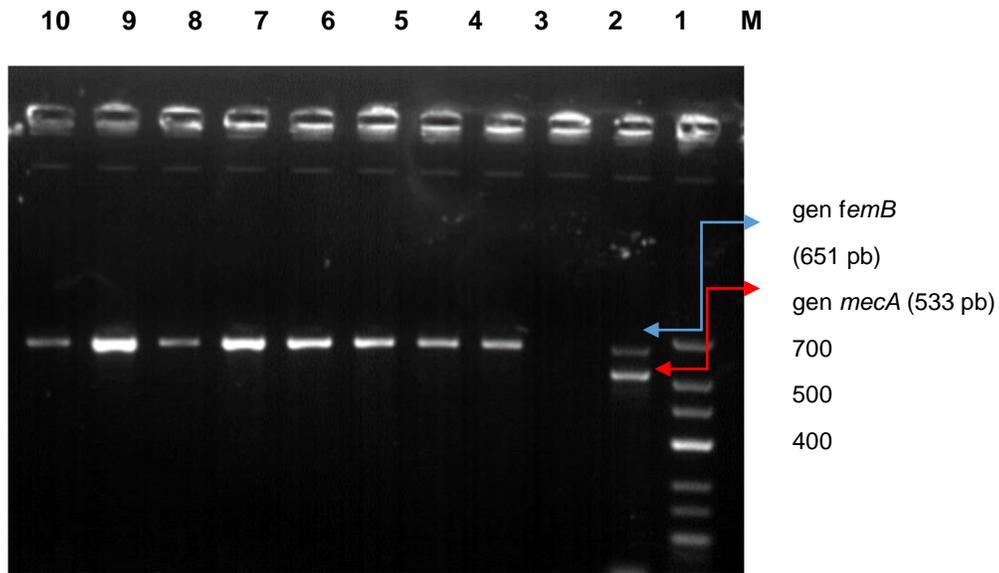
Gráfica 3: Sensibilidad *in vitro* de aislamientos de *Staphylococcus aureus* a diferentes antibióticos.



DETECCIÓN MRSA EN AISLAMIENTOS MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Los 17 aislamientos de *S. aureus* se confirmaron al ser positivos al gen *femB* por PCR. En ningún aislamiento se detectó el gen *mecA* por lo que fueron considerados como *Staphylococcus aureus* sensibles a la meticilina (MSSA).

Figura 10: PCR del gen *mecA* y *femB* de *S.aureus*.



El carril M es el marcador de peso molecular; carril 1 cepa control positiva ATCC 43300; carril 2 cepa control negativa ATCC 12228, carril 3-10 aislamientos positivos al gen *femB*.

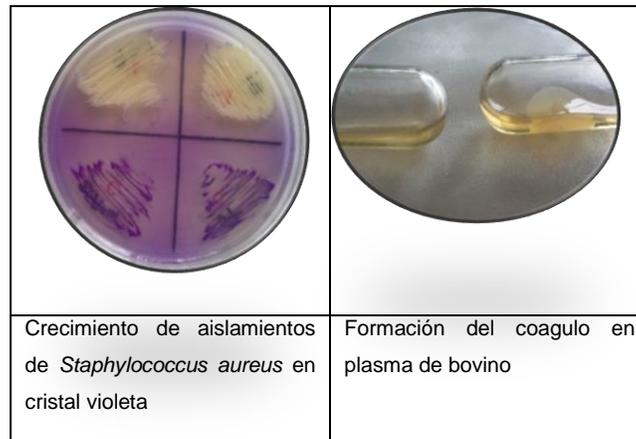
Biotipificación de los aislamientos de *S. aureus*

Del total de asilamientos de *S. aureus* 4(23.5%) fueron del ecovar humano, 2(11.8%) fueron del ecovar aves de corral, 0(0%) de ecovar bovino, 1(5.9%) pertenecieron al ecovar ovino, finalmente 10(58.8%) no tuvieron hospedero específico como se muestra en el cuadro 23.

Cuadro 23: Biotipos de aislamientos de *S. aureus*.

Biotipo	Aislamientos (No./%)
Ecovar humano β^+	4/23.5
Ecovar aves de corral	2/11.8
Ecovar bovino	0
Ecovar ovino	1/5.9
Biotipo Sin hospedero específico	10/58.8

Figura 11: Crecimiento de aislamientos de *S. aureus* en agar TSA y Cristal violeta (izquierda), prueba de coagulasa en plasma de bovino (derecha).

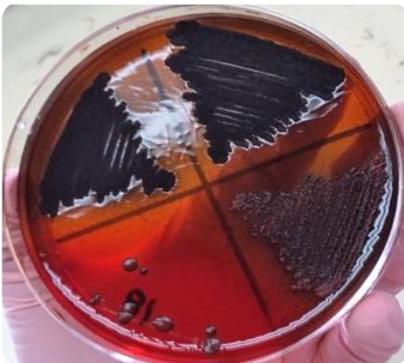


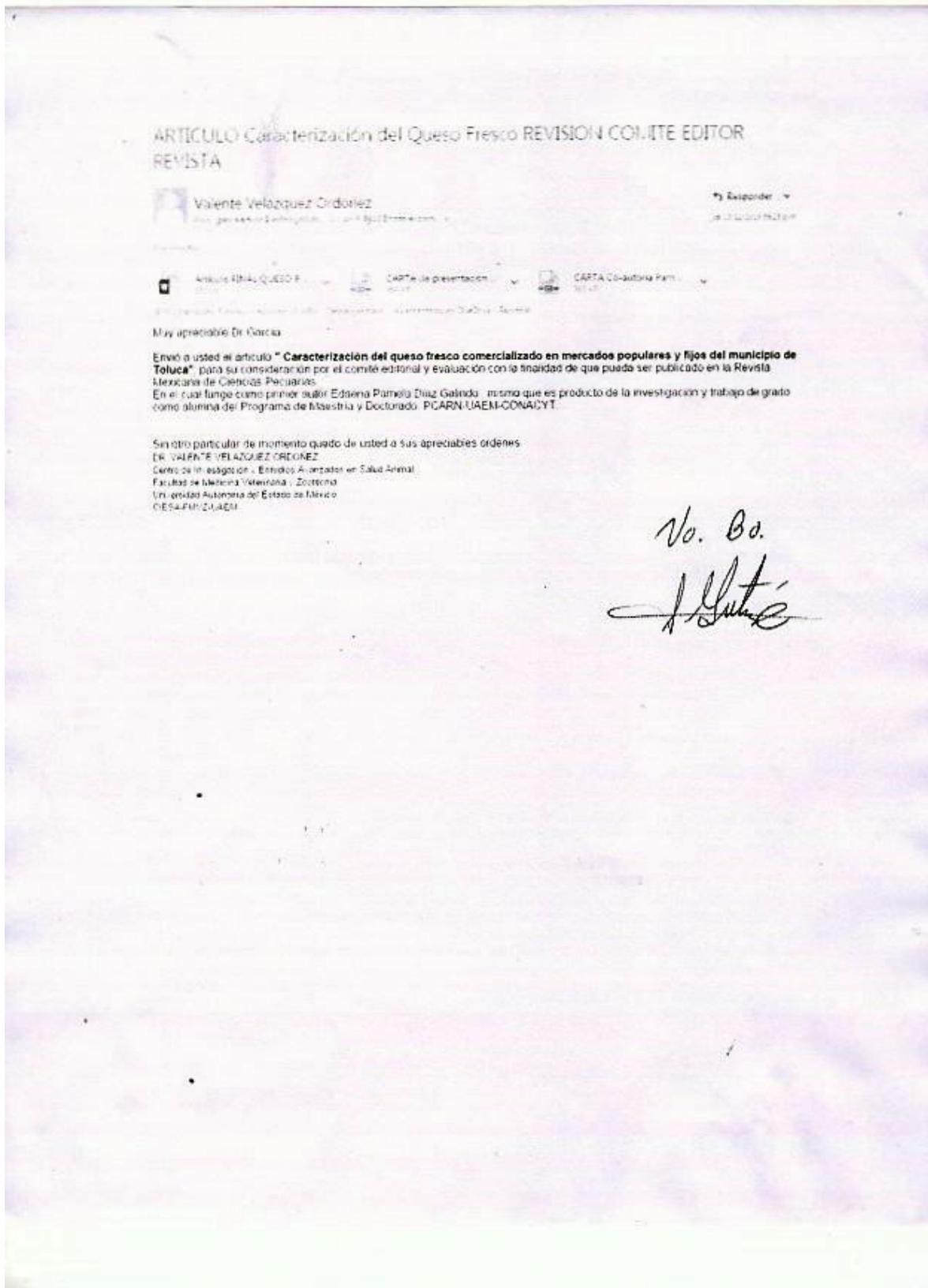
biofilm en aislamientos de *S. aureus*

Prueba fenotípica de expresión de *biofilm* en aislamientos de *Staphylococcus aureus*

Del total de los aislamientos que se probaron por la técnica de Rojo congo el 8 (47%) presentaron la coloración característica.

Figura 12: *biofilm* en aislamientos de *Staphylococcus aureus* crecimiento en agar Rojo Congo.





CARACTERIZACIÓN DE QUESO FRESCO COMERCIALIZADO EN MERCADOS FIJOS Y POPULARES DEL MUNICIPIO DE TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO.

FRESH CHEESE CHARACTERIZATION MARKETED AT FIXED AND POPULAR MARKETS OF TOLUCA'S MUNICIPALITY.

¹DÍAZ GALINDO EDAENA PAMELA**, ¹VALLADARES CARRANZA BENJAMIN,
¹GUTIÉRREZ CASTILLO ADRIANA DEL CARMEN, ²ARRIAGA JORDAN CARLOS
MANUEL, ³QUINTERO-SALAZAR BACILIZA, ⁴CERVANTES ACOSTA PATRICIA
¹VELÁZQUEZ ORDOÑEZ VALENTE*

¹Centro de Investigación y Estudios Avanzados En Salud Animal (CIESA-FMVZ-UAEM), Autopista de cuota Toluca Atlacomulco Km. 15.5, San Cayetano de Morelos, Toluca Estado de México CP 50200 México, (722) 296 55 55 y 296 89 80.

²Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR-UAEM).

³Centro de Investigación y Estudios turísticos (CIETUR-UAEM).

⁴Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana.

¹Correspondencia al último autor: vvo@uaemex.mx

** Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales (PCARN-UAEM-CONACYT), Línea de investigación Salud animal, Universidad Autónoma del Estado de México.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar las características fisicoquímicas, origen, formas de comercialización y condiciones de venta del queso fresco comercializado en el municipio de Toluca, Estado de México. Dada la importancia regional y económica del sistema de producción lechera y de la quesería artesanal en la zona. Se realizó un estudio transversal y un muestreo por conveniencia. Se adquirieron 64 piezas de quesos frescos en mercados itinerantes (tianguis) y fijos durante el periodo de agosto-octubre de 2014. El pH y la temperatura de los quesos se determinaron en el punto de venta. Mediante métodos oficiales se determinó el contenido de materia seca, cenizas, grasa, proteína y NaCl. La procedencia de los quesos se estableció a partir de la fuente de suministro en cuatro regiones: (A) Valle de Toluca; (B), otros municipios del Estado de México; (C), de origen desconocido y (D), otros estados del país. Se observó que la presentación del queso de forma circular fue la misma en todos los puntos de venta con un rango de peso de 100 a 250 g. Los rangos para los parámetros fisicoquímicos fueron pH (4.84-6.07), humedad (42.71-66.66%), materia seca (1.68-3.39%), cenizas (2.65-5.24%), grasa (12-32%), proteína (16.81-26.62%) y NaCl (0.29-1.44%). Se concluye que el queso fresco del municipio de Toluca puede ser considerado como un queso artesanal propio de la región, que debe de ser preservado como un interés en la gastronomía mexicana, además de la importancia de mejorar las condiciones de calidad e inocuidad en la comercialización.

Palabras clave: Queso, alimentos tradicionales, comercio, Valle de Toluca, patrimonio gastronómico.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine physicochemical characteristics its origin, marketing and sales conditions of fresh cheese marketed in Toluca's municipality, State of Mexico, Mexico. Additionally information on the milk industry and its link to the artisan cheese production as a traditional food and its regional economic importance were provided. A cross-sectional study was conducted by convenience; were sampled 64 pieces of fresh cheese purchased on fixed and itinerant markets (flea markets) during a period from August to October 2014. Temperature and pH data of the cheeses was determined at point sale. Then following the official standard methods, we tested dry content, ash, fat, protein and sodium chloride. The origin of the cheese was established from the supplier in each region and studied as follows: (A), Toluca Valley; (B), other municipalities in Mexico's State; (C), unknown origin and (D), other states. It was observed that the presentation of the sampled cheeses were of circular shape at all points of sale with a weight range of 100-200 g. The ranges for physicochemical parameters were pH (4.84-6.07), moisture (42.71-66.66%), dry matter (1.68-3.39%), ash (2.65-5.24%), fat (12-32%), protein (16.81-26.62%) and NaCl (0.29-1.44%). We concluded that the Toluca fresh cheese can be regarded as an artisan product with its own peculiar qualities from the whole region that should be preserved as an interest in the gastronomic heritage and culture. Its importance also stands out for the necessity for improving the quality and food safety in marketing of the fresh cheese.

Key words: Cheese, traditional food, marketing, Toluca Valley, gastronomic heritage.

INTRODUCCIÓN

La producción artesanal de los quesos en México data de la Colonia, con influencia hispana se distribuye ampliamente en el territorio nacional con sutiles diferencias en su elaboración^(1,2). Se conocen 40 tipos de quesos, que adaptados a las condiciones locales incorporan sabores, aromas y textura a la gastronomía mexicana, la cual ha sido reconocida como patrimonio cultural⁽³⁾. La importancia culinaria y cultural es indudable, pero la información de sus atributos y procesamiento es escasa debido a que esta se basa solamente en datos y establecimientos sujetos a registro censal⁽¹⁾. Además no tiene una evidencia socioeconómica actual, debido a que mientras algunos han incrementado su producción otros están en desaparición comercial⁽³⁾. Se elaboran mediante técnicas rústicas y comercialización local, fuera de la exigencia sanitaria y estandarización agroindustrial en un comercio globalizado⁽¹⁾. Son apreciados por las particularidades nutricionales, inocuidad, composición, atributos sensoriales y los procesos tradicionales de elaboración⁽⁴⁾, la calidad se atribuye a la gastronomía local y aceptación de los consumidores difiriendo de la normativa de hatos lecheros y de sanidad e higiene en la fabricación^(5,6). Las características sensoriales, físicas y de composición son producto del “terruño”, considerado como el espacio geográfico; además de factores naturales y culturales, el saber-hacer histórico, la tecnología de fabricación, el tipo de leche influida por la alimentación del ganado y proteínas, la microbiología y las condiciones de maduración definen la tipicidad⁽⁷⁾. Las queserías a escala familiar dependen de los conocimientos conservados mediante tradición oral, muestran un rezago en equipos, materiales de trabajo, sistema organizacional de producción,

innovación y comercialización que resulta en una calidad variable^(1,8). Potencialmente contribuye en el sistema agroalimentario mexicano al desarrollo económico regional al brindar valor agregado a la producción lechera al articular la cadena productiva, generar empleo en el medio rural, aparte de conservar los sólidos de leche en áreas calurosas y secas del trópico y condiciones ambientales hostiles^(1,3,8,9). En 2015 se estimó una producción de 144 606 ts; el 43% correspondió a las variedades panela, chihuahua y queso fresco⁽¹⁰⁾. Este último se obtiene de la coagulación de leche sin pasteurizar, la cuajada incluye la mayoría de sus componentes proporcionando producto heterogéneo de sabor y consistencia especial debido al método de elaboración⁽²⁾, que incluye la molienda y salado previos al moldeado en un aro pequeño que le da la forma común de presentación, tiene una consistencia blanda, quebradiza y vida útil corta^(8,1), su sabor suave es influido por la microflora y composición de la leche⁽¹¹⁾, alto contenido de humedad, pH ligeramente ácido, sabor lácteo, poco dulce y salado⁽¹²⁾. Históricamente la producción del queso fresco en el Valle de Toluca surgió en la laguna de Lerma, en Atenco propiedad de Hernán Cortés quién tras el aprovechamiento de los recursos locales para la alimentación del ganado, aportó leche y derivados lácteos como quesos molidos en metate, requesón y queso fresco, este último incorporado en la gastronomía local en los chiles en nogada sustituyendo a la crema⁽¹³⁾. Este producto en Toluca no está diferenciado y afecta su condición genuina, además es susceptible de ser opacado por la imitación debido al menor precio y accesibilidad⁽¹⁴⁾. Este estudio se realizó para establecer la forma de comercialización y la caracterización del queso fresco dada la complejidad de factores que

intervienen en la producción y su valor nutricional en la dieta de la población en el valle de Toluca, es necesario promover su rescate cultural como alimento regional.

MATERIAL Y METODOS

LOCALIZACIÓN Y SELECCIÓN DE MUESTRAS

El presente estudio se llevó a cabo durante los meses de agosto-octubre de 2014 en el municipio de Toluca, que territorialmente se organiza en 47 delegaciones y 97 localidades con una población de 819 561 habitantes, una superficie total de 420.14 km²; ubicándose entre los paralelos 18°59´ y 19°29´ de latitud norte; los meridianos 99°32´ y 99°47´ de longitud oeste; la altitud fluctúa entre 2 400 y 4 700 m., sobre el nivel del mar, el promedio de humedad ambiental es de 73.29%, con un rango de temperatura de 4 a 14°C, un clima templado subhúmedo con lluvias en verano, marcado invierno y frío de altura con semifrío subhúmedo⁽¹⁵⁾.

AREA DE ESTUDIO Y OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Se realizó un estudio transversal descriptivo durante el periodo de agosto-octubre de 2014. Mediante un muestreo por conveniencia, en los 52 tianguis y 4 mercados fijos registrados (SEDECO, 2014)⁽¹⁶⁾. Se aplicó una encuesta cerrada por consentimiento a los comerciantes de queso de la localidad orientada a identificar: los puntos de venta, procedencia del queso, productor y comercializador, proceso de elaboración y condiciones de venta. Durante el muestreo se determinó la temperatura del producto en el sitio de venta con un termómetro infrarrojo manual (DT8380 OEM, China). El pH se midió con un potenciómetro portátil de rango de pH de 0 a 14 (Hanna, EUA), obteniendo 3 lecturas de diferentes partes del queso. El método de muestro se llevó a cabo por el método señalado en la NMX-F-718-COFOCALEC-2006⁽¹⁷⁾. Las muestras de queso fueron transportadas en un

contenedor térmico, en bolsas de plástico estériles a una temperatura de 4°C para su análisis inmediato.

ANALISIS FISICOQUIMICO

Para determinar humedad se utilizó la NMX-F-083-198⁽¹⁸⁾, una muestra de 5 g. se mantuvo en una estufa de secado a 100 °C \pm 5 por 4 horas y se repitió el proceso hasta obtener un peso constante los valores fueron expresados en porcentaje. El contenido de cenizas se determinó utilizando el procedimiento descrito en la NMX-F-094-1984⁽¹⁹⁾, a partir de la muestra de humedad del queso y se sometió a incineración a una temperatura de 550 °C por un periodo de 4 horas. La determinación de cloruro de sodio (NaCl), se llevó a cabo por el método Volhard⁽²⁰⁾ que se basa en la determinación indirecta para cloruros, al añadir un exceso de nitrato de plata, en relación a la cantidad de cloruros presente en la muestra, al valorar el exceso de ión de plata con solución de tiocianato de amonio y sulfato férrico. El contenido total de grasa se determinó en 1 gr. \pm 0.001 de queso por el método de Gerber-Van Gulik⁽²¹⁾, el contenido total de grasa se expresó en porcentaje. La proteína cruda se obtuvo del promedio de nitrógeno presente en una muestra de 0.25 gr. \pm 0.001 por el método Kjeldahl (NMX-F-098-1976)⁽²²⁾. Todos los análisis fisicoquímicos se realizaron por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el estudio se obtuvieron 64 muestras de quesos frescos en los mercados y tianguis del municipio de Toluca. La procedencia de los quesos se estableció a partir de la fuente de suministro (Figura 1), en cuatro regiones: (A), Valle de Toluca incluyó a los municipios de Almoloya de Juárez, Metepec, San Mateo Atenco, Toluca, Villa Victoria y Zinacantepec; (B), los quesos originarios de otros municipios del Estado

de México tales como Aculco, Ecatepec, Texcatitlán e Ixtlahuaca; (C), quesos de origen desconocido y (D), que comprendió muestras procedentes de otros estados del país (Guadalajara, Jalisco).

En el cuadro 1, se observa la frecuencia y procedencia del queso fresco que se comercializa en el municipio de Toluca. El abasto es local en su mayoría proviene de los municipios del Valle de Toluca, seguida de otros municipios del Estado de México y en menor proporción de origen desconocido y de fuera de la entidad.

Los valores generales de los parámetros del análisis fisicoquímico del queso se muestran en el cuadro 2. Los valores mostrados para el pH, humedad, proteína y grasa caracterizan al queso fresco que se comercializa en el municipio de Toluca fueron heterogéneos en los diferentes parámetros por lo que se decidió mostrar los valores por región de abasto en el cuadro 3. En la distribución de las regiones de abasto, en la región A resalta del producto el mayor peso (gr.), su alto contenido de humedad (%) como valor máximo y el alto contenido de NaCl. En tanto la región B sobresalieron los contenidos porcentuales de materia seca, grasa, proteínas y cenizas. En la región C se identificó un queso referido como de origen desconocido, el cual mostró un contenido de NaCl cercano al mostrado por el queso de la región A, en tanto que los otros parámetros evaluados se mantuvieron constantes en comparación con otras regiones. El queso procedente de otra entidad federativa fue identificado y considerado en la región D, en cuya muestra se obtuvieron valores superiores para proteína, grasa y materia seca; además el costo fue superior en comparación con los quesos de las otras regiones municipales de abasto estudiadas.

Los resultados generales obtenidos de la encuesta aplicada a los comerciantes del queso en los centros de abasto, se muestran en el cuadro 4, en donde se detectaron un total de 10 vendedores fijos y 54 ambulantes demostrando que hay un mayor volumen de comercialización en los mercados populares o “tianguis” comparados con los mercados municipales fijos, situación que puede comprometer la trazabilidad del producto⁽²⁴⁾. En cuanto a las condiciones de venta se observó que solamente en los mercados fijos los quesos se mantenían en refrigeración, aunque en el caso estudiado no significó que la temperatura y conservación fuera adecuadas considerando los criterios sanitarios para los productos lácteos⁽²⁵⁾, debido a que durante la medición de la temperatura en el sitio de comercialización del queso, todos mostraron una temperatura superior a los 4°C, además de no contar con embalaje. El 50% de los sitios de venta de quesos frescos tenían de manera paralela la venta de alimentos preparados, el 32.8%, además otros derivados lácteos: crema, leche, yogurt y otros quesos comerciales; 11% vendía además productos agrícolas de temporada. Cabe resaltar que sólo el 1.6% de los comerciantes se dedica a la venta exclusiva de quesos.

Los quesos frescos que se expendían junto a otros productos alimenticios pueden propiciar una contaminación cruzada en el expendio del queso y a otros alimentos vendidos sin embalaje y a temperatura ambiente con una manipulación deficiente de los del producto por los vendedores. El escenario que prevalece en los “tianguis” del municipio de Toluca, propicia la contaminación fisicoquímica y microbiana incrementando el riesgo de enfermedades transmitidas por alimentos, particularmente por los productos lácteos⁽²⁶⁾, este hecho podría representar un

riesgo importante a la salud pública afectando seriamente la comercialización y el interés de los consumidores por los quesos artesanales⁽¹⁾, por lo que las instituciones sanitarias deberían poner énfasis en la comercialización de alimentos en los mercados y tianguis a fin de salvaguardar la salud de los consumidores en los centros de abasto de alimentos. La red comercial observada del queso fresco en los centros regionales de abasto en el municipio, está constituida principalmente por intermediarios con el 80% y solamente el 20% son productores y comerciantes del queso; la actividad comercial se realiza en los puntos de venta en tianguis y mercados del municipio. Esta situación coincide con el estudio realizado en Chiautla de Tapia, México⁽³⁾, donde se estudió la venta de queso fresco, denotando que el número de intermediarios es muy superior al de los productores que realizan la venta directa afectando la rentabilidad de pequeños productores.

En el presente estudio las muestras de queso fresco de origen desconocido se atribuyeron a una red comercial en los mercados con los queseros conocidos de antaño en donde estos entregan su producto a los establecimientos periódicamente sin brindar información adicional del origen del producto, este hecho refleja que el queso fresco goza de una buena aceptación entre los consumidores. La comercialización itinerante de queso en los “tianguis” no es una actividad constante a diferencia de la que se observa en los mercados fijos que reciben una entrega periódica en las cremerías del municipio de Toluca, que puede afectar el comercio del queso genuinamente local debido a las pobres condiciones de presentación y calidad higiénica de los mismos.

Un fenómeno similar en la comercialización de los quesos frescos fue observado en el estudio realizado en 2007 en Tetlatlahuca en el Estado de Tlaxcala⁽²⁷⁾. En el estudio realizado en el municipio de Toluca, solamente en un mercado fijo, en 8 tianguis y en la Central de abasto, no se identificaron comerciantes de queso fresco, si bien esto no significa que nunca fuera vendido este producto, debido a la venta esporádica que puede tener el producto en estos lugares. En contraste con la presencia de un mayor número de comerciantes de queso fresco apreciada en el principal mercado, Aviación-Autopan como el centro regional de mayor jerarquía y de mercadeo es el único “tianguis” que se realiza sus actividades comerciales los viernes en el Alto Lerma toluqueño concentrando el comercio con todos “tianguis” de la región que incluye a 26 municipios mexiquenses⁽¹³⁾.

Dentro de las características del queso fresco típico de la región estudiada, la forma de presentación del producto también fue circular en todos los puntos de muestreo, con un peso aproximado entre los 100 y 250 gr., que corresponde parcialmente a lo descrito en el libro de Los quesos mexicanos genuinos⁽¹⁰⁾ ya que no se encontraron piezas grandes. En el estudio se observó que el producto comercializado en los “tianguis” y mercados corresponden a un queso fresco genuino de la región de Toluca, México, la calidad fisicoquímica de los quesos deriva de la calidad de la leche, la disminución de pH por la acidificación previa al cuajado y que depende del tiempo que tarda en comenzar la producción cuando se adiciona el cuajo por lo que las características fisicoquímicas de los quesos que producen y comercializan en el Valle de Toluca muestran valores similares a los reportados en el estudio del queso rancharo artesanal del Centro de México⁽²⁾, que muestran valores de proteína (22.6 a 25.6%), grasa (18.9 a 22.5%), pH (5.0 a 5.2), humedad (50.1 a 53.8%) y NaCl (0.8

a 1.8%), y en el estudio del queso de Zacazonapan, Estado de México.⁽²⁸⁾, donde se reportaron valores de proteína (23.4 a 30.4%), grasa (7.5 a 28.5%), pH (5.1 a 5.8), humedad (34.6 a 55%) y NaCl (0.8 a 3.2%) y cenizas (1.2 a 3.2%).

Las diferencias en los quesos artesanales es común y se debe al proceso de elaboración⁽²⁸⁾, una característica importante es que algunos quesos frescos poseen capacidad para fundido al tener un pH de 5.1 a 5.3⁽¹²⁾, atributo que los comerciantes utilizan para la promover la venta de sus productos.

CONCLUSIÓN

Los quesos frescos tienen una importancia gastronómica, cultural y económica indiscutible sin embargo hace falta la implementación de programas de capacitación y asistencia que permitan mejorar la calidad sanitaria en la cadena productiva sin perder las características organolépticas de los quesos frescos tradicionales, que como se ha mostrado en diferentes publicaciones poseen atributos nutricionales importantes, además de que son bien aceptados en la población.

El precio de venta observado entre los 8 y 25 pesos fue considerado accesible para los consumidores locales, si se compara con otros alimentos de menor valor nutricional ofertados en los mercados reconociendo que los quesos artesanales son una fuente importante en la dieta de sectores de la población con bajos ingresos que enfrentan en precio como factor importante para su incorporación en la dieta diaria familiar⁽³⁾.

En el estudio la oferta del queso fresco en el municipio de Toluca se realiza de manera paralela otros alimentos de consumo perecedero, como “guisos” para “tacos

placeros” típicos de la región los que incluyen al queso fresco en su preparación. En una menor proporción se identificaron sitios de venta de queso con otros productos agrícolas y muy pocos comerciantes dedicados solo al abasto de queso fresco y derivados lácteos genuinos de la región.

La elaboración regional de queso denota la importancia regional de la producción agropecuaria en las unidades de producción familiar lechera en el Valle de Toluca ya que los principales centros de abasto de queso fresco son localidades aledañas, como lo describe en el estudio de la demanda de los quesos artesanales en la ciudad de Toluca⁽¹⁴⁾, pues en este estudio se estableció que la fuente principal de abasto son los municipios del Valle de Toluca. Lo anterior denota la importancia de la elaboración del queso para dar valor agregado al sistema producto leche. La distribución de quesos en el municipio de Toluca se considera una actividad complementaria en la organización comercial del abasto de alimentos en los mercados y “tianguis”. La desaparición de queso genuinos en el municipio se evidenció al encontrar una baja frecuencia en los tianguis, este escenario es similar en otros quesos genuinos y los factores que contribuyen su desaparición del queso son complejos y no han sido suficientemente estudiados; su comprensión resulta de gran importancia para diseñar e implementar estrategias para el rescate y la valorización de este patrimonio alimentario⁽³⁾, además del saber-hacer del queso artesanal como patrimonio gastronómico local y su riqueza cultural, que además median la economía familiar en la comunidad⁽⁸⁾.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca para cursar estudios de grado de Maestría (PCARN-UAEM). A la Secretaria de Investigación de la UAEM por el financiamiento otorgado a través del proyecto de investigación "Variación genética de aislamientos de *S. aureus* MRSA obtenidos de vacas lecheras en unidades de producción familiar, Clave 3848/2013CHT. Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología del Estado de México (COMECYT) por la beca de titulación otorgada.

LITERATURA CITADA

1. Villegas DGA. Tecnología quesera. 2ª edición. México. Trillas. 2004:11-25, 242-279, 305-309.
2. Solís-Méndez AD, Estrada-Flores JG, Castelán-Ortega OA. A Study on the texture diversity of the Artisan Ranchero Cheese from Central Mexico. *Int J Dairy Technol* 2013;66(1):37-44.
3. Grass-Ramírez JF, Cesín-Vargas A. Situación actual y retrospectiva de los quesos genuinos de Chiautla de Tapia, México *ASyD*. 2014;1(2):201-221
4. Montes de Oca FE, Arriaga JCM, Martínez CAR, Espinoza OA. Perfil sensorial del queso Oaxaca tradicional en el Altiplano Central de México [Resumen]. 13er. Congreso Nacional de Investigación Socioeconómica y Ambiental de la Producción Pecuaria, Colegio de Posgraduados. Puebla, Pue. 2012:183.
5. Manjarrez LAM, Díaz ZS, Salazar GF, Valladares CB, Gutiérrez CADC, Barbabosa PA, Talavera RM, Alonso FMU, Velázquez OV. Identificación de

- biotipos de *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras de producción familiar con mastitis subclínica en la región centro-oeste del Estado de México. Rev Mex Cienc Pecu 2012;3(2):265-274.
6. Barajas G. El sistema lechero de la región de Martínez de la Torre, Veracruz: los grandes ganaderos y sus interacciones. En Martínez B., Salas Q., coordinadores. Globalización e integración regional en la producción y desarrollo tecnológico de la lechería humana. UNAM, México, Porrúa Editores. 2002:181-240.
 7. Hernández MC, Hernández MA, Villegas DGAZ, Aguirre ME. El proceso socio-técnico de producción de Queso Añejo de Zacazonapan, Estado de México. Rev Mex Cienc Pecu. 2011;2(2):161-176.
 8. Cervantes EF, Villegas DGA, Cesín VA, Espinoza OA. Los quesos mexicanos genuinos, Patrimonio cultural que debe rescatarse. 2ª edición. México, Colegio de Posgraduados. 2008.
 9. Cervantes EF, Gómez AA, Altamirano CJR. Impacto económico y ambiental de la quesería en el Valle de Tulancingo, Hidalgo (México) [Resumen]. 116th EAAE Seminar "Spatial dynamics in agrifood systems: implications for sustainability and consumer welfare. Parma, Italia. 2010.
 10. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Boletín de Junio de 2015. Panorama de la lechería en México, disponible en: http://www.siap.gob.mx/pdfjs/web/viewer.php?file=b_leche_abrjun2015.pdf (Consultado el 12 de Noviembre de 2015).

11. Picos GJ, Torres VMDJ. Quesos frescos y madurados Microbiología en alimentos:59-82.
12. Ramírez-López C, Vélez-Ruíz J. Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. Temas selectos de Ingeniería en Alimentos 2012;6(2):131-148.
13. Romero CAT, Viesca GFC, Hernández TM. Formación del patrimonio gastronómico del Valle de Toluca, México. Ciencia Ergo Sum 2010;17(3):239-252.
14. González DJG, Esteban CM, Ponce GN, Contreras PM, Colín NV. Demanda potencial de los quesos artesanales en la ciudad de Toluca, Estado de México. En Álvarez MA, Boucher F, Cervantes EF, Espinoza OA Coord. Agroindustria rural y territorio. Tomo II. México: Universidad Autónoma del Estado de México; 2007:305-316.
15. INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Toluca, México. 2009. Disponible: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/datos-geograficos/15/15106.pdf>. Consultado 24 Nov, 2015.
16. Secretaría de Desarrollo Económico (SEDECO), Tianguis del municipio de Toluca, ubicación en Delegaciones, Subdelegaciones y Colonias. Subdirección de Mercados. 12 Jun 2014.
17. NMX-F-718-COFOCALEC-2006 Sistema Producto Leche – Alimentos – Lácteos – Guía para el muestreo de leche y productos lácteos.

18. NXM-F-083-1986. Alimentos. Determinación de humedad en productos alimenticios. Foods. Moisture in Food Products Determination. normas mexicanas. dirección general de normas.
19. NMX-F-094-1984. Alimentos. Lácteos. Determinación de cenizas en quesos. Foods Lacteous. Cheese Ashes Determination. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
20. NMX-F-360-S-1981. Alimentos para humanos. Determinación de cloruros como Cloruro de Sodio (Método de Volhard). Foods for humans. Determination of chlorides as Sodium Chloride (Volhard method). Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
21. NMX-F-100-1984. Alimentos Lácteos. Determinación de grasa butírica en quesos. Foods Lacteous. Cheese butter fat determination. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
22. NMX-F-098-1976. Determinación de proteínas en quesos. Method of test for protein in cheese. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
23. INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Mapa del Estado de México. Disponible:
http://cuentame.inegi.org.mx/mapas/pdf/entidades/div_municipal/mexicompios.pdf. Consultado 24 Nov, 2015.
24. Sepúlveda D, Olivas GI, Molina J. Productos lácteos. Gardea BAA, González GA, Higuera-Ciapara I, Cuamea NF editores. Buenas prácticas en la producción de alimentos, México: Editorial Trillas; 2007:351-379.

25. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Codex alimentarius. Código de prácticas de higiene para la leche y los productos lácteos. CAC/RCP 57-2004.
26. Velázquez-Ordoñez V, Valladares CB, Gutiérrez CAD, Talavera RM, Pescador SN, Valés R. Milk production and Safety food. Švarc-GajiÆ . Editor. In : Nutritional Insights and Food Safety. Nova Science Publishers, New York; 2011:335-359.
27. Cesín VA, Aliphath FM, Ramírez VB, Herrera HJG, Martínez CD. Ganadería lechera familiar y producción de queso. Estudio en tres comunidades del municipio de Tetlatlahuca en el estado de Tlaxcala, México. *Téc Pecu Mex* 2007; 45(1):61-76.
28. Sánchez VJJ, Colín NV, López GF, Avilés NF, Castelán OOA, Estrada FJG. Caracterización del queso madurado Zacazonapan producido en el Estado de México [Resumen]. 13er. Congreso Nacional de Investigación Socioeconómica y Ambiental de la Producción Pecuaria, Colegio de Posgraduados. Puebla, Pue. 2012:183.

FIGURAS Y CUADROS

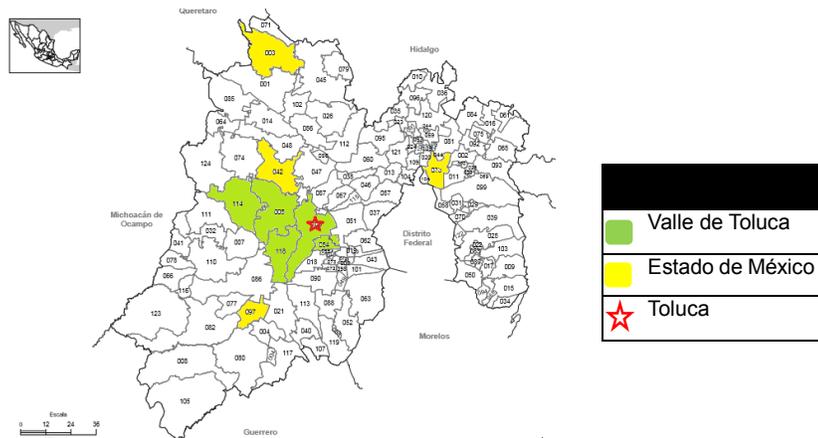


Figura 1: Procedencia de los quesos en mercados y tianguis en Toluca (mapa INEGI 2015)⁽²³⁾.

Región de Abasto	Muestras de queso %
A	64.2
B	23.4
C	11.8
D	1.6

Cuadro 1: Procedencia del queso fresco en mercados populares.

Parámetro	Valor
Temperatura de venta	7.8-26.2 °C
pH	4.84-6.07
Forma	Circular
Peso	100-250 gr.
Humedad	42.71-66.66%
Materia seca	1.68-3.38%
Cenizas	2.65-5.24%
NaCl	0.29-1.44%
Proteínas	16.81-26.62%
Grasa	12-32 %

Cuadro 2. Características fisicoquímicas del queso fresco en mercados del municipio de Toluca.

Región de abasto	Peso (g)	pH	Humedad %	Materia Seca %	Cenizas %	Proteína (%)	Grasa (%)	NaCl %	T° de venta
A	173±32	5.3±0.3	50.5±6.5	49.3±5.3	3.2±0.3	20.1±1.8	19.6±3.3	0.9±0.2	18±3.72
	m:105	m:4.9	m:31.1	m:33.3	m:2.6	m:16.1	m:11	m:0.4	m:7.8
	M:305	M:5.9	M:66.7	M:68.9	M:4.1	M:24.1	M:27	M:1.4	M:26.2
B	176±45	5.2±0.2	48.1±5.9	51.89±5.9	3.8±1.4	20.9±2.5	20.4±4.1	0.8±0.2	17.1±4.1
	m:100	m:4.8	m:32	m:43.2	m:2.8	m:17.5	m:13	m:0.5	m:9.3
	M:266	M:5.6	M:56.8	M:68	M:8.4	M:26.6	M:32	M:1.1	M:25.4
C	171±20	5.3±0.3	47.0±6.7	52.96±6.7	3.2±0.6	22.0±2.3	20.8±5.3	0.8±0.2	14.5±1.9
	m:150	m:4.9	m:44.8	m:44.8	m:2.7	m:18.2	m:14	m:0.6	m:11.5
	M:198	M:5.9	M:65.3	M:65.7	M:4.3	M:25.1	M:29	M:1.2	M:17
D	180	5.7	45.5	55.5	3.0	24.9	23.5	0.7	14.8
PROMEDIO	173	5.3	49.5	50.3	3.3	20.5	19.7	0.87	17.3
TOTAL									

Regiones de abasto municipal: A, B, C y D; los valores se muestran en m: valor mínimo, y M: valor máximo.

Cuadro 3: Análisis fisicoquímico del queso fresco por regiones de abasto.

Región de abasto	A	B	C	D
Sitio de Comercialización				
Mercados fijos	7	3	0	0
Tianguis	34	12	7	1
Central de abasto	0	0	0	0
Tipo de vendedores				
Productores	12	1		
Intermediarios	29	14	7	1
Condiciones de Venta				
Venta de lácteos	14	6		1
Alimentos preparados	17	8	7	
Solamente quesos	1			
Productos agrícolas	7			
Otros	2	1		
Embalaje				
Película de plástico	23	12	3	1
Ninguno	18	3	4	
Presentación	Circular	Circular	Circular	Circular
Precio	15.8±3.5	18±4.2	16.9±2.2	30

Cuadro 4: Características de comercialización del queso fresco en mercados populares del municipio de Toluca.

IX. DISCUSIÓN

CARACTERIZACIÓN DE QUESO FRESCO

Se detectaron un total de 10 vendedores fijos y 54 ambulantes demostrando que hay un mayor volumen de comercialización en los tianguis comparados con otros mercados municipales, situación que puede comprometer la trazabilidad del producto (Sepúlveda *et al.*, 2007). En cuanto a las condiciones de venta se observó que solamente en los mercados fijos se mantenían en refrigeración, aunque en el caso estudiado no significo que la temperatura y conservación fuera adecuadas considerando los criterios sanitarios para los productos lácteos (*Codex alimentarius*), debido a que durante la medición de la temperatura en el sitio de comercialización, todos los quesos mantenían una temperatura superior a los 4°C, además de no contar con un medio de embalaje y estos se expendían junto a otros productos alimenticios, es posible que esta situación pueda propiciar una posible contaminación cruzada; el expendio del queso con otros alimentos también fue observado en los quesos frescos vendidos además de carecer de embalaje estaban a una temperatura ambiente con una manipulación deficiente de los vendedores del producto.

El escenario que prevalece en los tianguis del municipio de Toluca, propicia la contaminación fisicoquímica y microbiana de los alimentos incrementando el riesgo de enfermedades transmitidas por alimentos, particularmente la que ocurre por los productos lácteos (Velázquez-Ordoñez *et al.*, 2011), este hecho podría representar un riesgo importante a la salud de los consumidores afectando seriamente la comercialización y su interés por los quesos artesanales (Villegas de Gante, 2004), por lo que las instituciones sanitarias deben poner énfasis en la comercialización de alimentos en los mercados y tianguis a fin de salvaguardar la salud de los consumidores en los centros de abasto nacional.

La red comercial observada del queso fresco en los centros regionales de abasto en el municipio, está constituida principalmente por intermediarios con el 80% y solamente el 20% son productores y comerciantes del queso; la actividad comercial se realiza en los puntos de venta en tianguis y mercados del municipio. Esta situación coincide con el estudio realizado en Chiautla de Tapia, México (Grass-Ramírez y Cesín-Vargas, 2014), donde se estudió la venta de queso fresco denotando que el número de intermediarios es muy superior al de los productores que realizan la venta directa. En el presente estudio las muestras de queso fresco de origen desconocido son debido a que los comerciantes establecieron la red comercial con los queseros años atrás y estos entregan su producto de manera periódica sin solicitar información adicional. La comercialización itinerante de queso en los tianguis no es una actividad constante a diferencia de la que se realiza en los

establecimientos fijos en los mercados que reciben una entrega periódica en cremerías del municipio de Toluca, sin embargo puede afectar el comercio del queso genuinamente local debido a las pobres condiciones de presentación y calidad higiénica de los mismos. Un fenómeno similar en la comercialización de los quesos fue observado en el estudio realizado por Cesín *et al.*, (2007).

En el estudio realizado en el municipio de Toluca, solamente en un mercado fijo, en 8 tianguis y en la Central de abasto no se encontró presencia de comerciantes de queso fresco lo cual no significa que nunca fuera vendido este producto, ya que los locatarios indicaron que si acuden pero de manera esporádica.

La presencia de un mayor número de comerciantes de queso fresco se observó en el mercado Aviación-Autopan identificado como el de mayor jerarquía, considerado como el centro regional de mercadeo al ser el único tianguis que se realiza los viernes en el Alto Lerma toluqueño concentrando actividades comerciales con todos tianguis de la región incluyendo a 26 municipios mexiquenses (Romero *et al.*, 2010). En lo que se refiere a las características del producto, la forma de presentación del producto fue circular en todos los puntos de muestreo con un peso aproximado entre los 100 y 250 gr., y un precio de venta que oscilo entre los 8 y 25 pesos. El producto comercializado en los tianguis y mercados corresponde a un queso fresco típicamente genuino de la región de Toluca, México. El precio de venta se consideró como accesible para su adquisición si se compara con otros alimentos de menor valor nutricional ofertados en estos sitios, como lo señala en su estudio Grass-Ramírez y Cesín-Vargas (2014), reconociendo que los quesos artesanales son una fuente importante en la dieta de los sectores de la población de bajos ingresos y que además compiten directamente con este tipo de productos en un mercado en el que el precio es importante para la adquisición.

En este estudio se valoró que en su mayoría los quesos frescos en el municipio de Toluca fueron vendidos a un precio económico y de manera paralela a la venta de alimentos de consumo perecedero, localmente denominados guisos para “tacos placeros” típicos de la región que incluyen queso fresco en su elaboración, situación que indica su consumo es el mismo día o en los posteriores.

El 50% de los sitios de venta de quesos frescos tenían de manera paralela la venta de alimentos preparados, el 32.8%, además otros derivados lácteos: crema, leche, yogurt y otros quesos comerciales; 11% vende además productos agrícolas de temporada. Cabe resaltar que sólo el 1.6% de los comerciantes se dedica a la venta exclusiva de quesos. La elaboración regional de queso denota la importancia regional de la producción agropecuaria en las unidades de producción familiar lechera en el Valle de Toluca ya que los principales centros de abasto de queso fresco son localidades aledañas, como lo describe González *et al.*, (2007), pues en

este estudio se estableció que la fuente principal de abasto son los municipios del Valle de Toluca. Lo anterior denota la importancia de la elaboración del queso para dar valor agregado al sistema producto leche. La distribución de quesos en el municipio de Toluca se considera una actividad complementaria en la organización comercial del abasto de alimentos en los mercados y tianguis.

La calidad fisicoquímica de los quesos deriva de la calidad de la leche, la disminución de pH por la acidificación previa al cuajado y que depende del tiempo que tarda en comenzar la producción cuando se adiciona el cuajo por lo que las características fisicoquímicas de los quesos que producen y comercializan en el Valle de Toluca muestran valores similares a los reportados por Solís *et al.*, (2012), que muestran valores de proteína (22.6 a 25.6%), grasa (18.9 a 22.5%), pH (5.0 a 5.2), humedad (50.1 a 53.8%) y NaCl (0.8 a 1.8%), mientras que Sánchez *et al.*,⁽¹¹⁾, reportó valores de proteína (23.4 a 30.4%), grasa (7.5 a 28.5%), pH (5.1 a 5.8), humedad (34.6 a 55%) y NaCl (0.8 a 3.2%) y cenizas (1.2 a 3.2%), para otras zonas de producción de queso fresco en Estado de México. Las diferencias en los quesos artesanales es común y se debe al proceso de elaboración (Sánchez *et al.*, 2012), una característica importante es que algunos quesos frescos poseen capacidad para fundido al tener un pH de 5.1 a 5.3 (Ramírez-López y Vélez-Ruiz, 2012), atributo que los comerciantes utilizan para la promover la venta de sus productos.

La desaparición de queso en el municipio se evidencia al encontrar una baja frecuencia en los tianguis, este escenario es similar en otros quesos genuinos y los factores que contribuyen a la desaparición del queso son complejos y no han sido suficientemente estudiados; su comprensión resulta de gran importancia para diseñar e implementar estrategias para el rescate y la valorización de este patrimonio alimentario (Grass-Ramírez y Cesín-Vargas, 2014). Los quesos frescos en Toluca son bien aceptados en la población aunque hay aspectos como higiene, frescura, variedad y disponibilidad han sido descuidados ya que la falta de consumo de este alimento es debido a la mala distribución y difusión de un mercado potencial abandonado (González *et al.*, 2007), esta situación se podrían mejorar con la intervención de organismos gubernamentales al interaccionar con los productores y comercializadores.

ANALISIS MICROBIOLÓGICO

Staphylococcus aureus es frecuentemente aislado de quesos (Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2015). En el presente estudio se encontró una prevalencia de 26.6%, que contrasta con el 11.28% reportado de muestras de lácteos en su mayoría de quesos en el Estado de Tabasco por Borbolla-Sala *et al.*, (2004), y con el 2% encontrado en quesos estudiados en el mismo estado de la República Mexicana por Castro-

Georgana *et al.*, (2007), otro estudio en el país de Grass-Ramírez y Cesín-Vargas (2014), en Chiautla de Tapia encontraron niveles de *S. aureus* dentro de límites permitidos por las Normas Mexicanas. A nivel internacional varios reportes evidencian la presencia del patógeno en altos niveles en queso como Spanu *et al.*, (2012), con un 100% de contaminación, Kamal *et al.*,(2013), que encontraron una prevalencia de 93%, Valero-Leal *et al.*, (2012), con 78%, Alvarado *et al.*,(2011), con 83%, André *et al.*,(2008), con 70.8%, Rodríguez-Lázaro *et al.*, (2015), con 59.1% en quesos confiscados en aeropuertos, Rosegren *et al.*, (2010), con 69%, Normanno *et al.*, (2005), con 23.7%, Jakobsen *et al.*, (2011), reportó prevalencias de 80.8, 76.7 y 24.7%. Aunque también se han reportado bajas prevalencias como el estudio llevado a cabo por Lemus *et al.*,(2008), con 32.2%, Rivera-Salazar *et al.*, (2011), con 26%, Vanegas *et al.*, (2008), con 26%, Shanebandi *et al.*, (2014), con 16%, Sasidharan *et al.*, (2011), con 10%, Khakpoor y Safarmashael (2011), con 10% y Yeşim y Haluk (2012), con un porcentaje de 6%. La presencia de *S. aureus* en los quesos artesanales está relacionado con la concentración inicial en la leche cruda, sin embargo la prevalencia final del patógeno también se debe a las prácticas de elaboración (Valero-Leal *et al.*, 2012). Posibles fuentes de contaminación son materiales, equipo de trabajo, materias primas y el personal también puede transferir cepas de la piel, boca y fosas nasales (Vanegas *et al.*, 2008). Prácticas apropiadas de higiene durante la producción, transporte, conservación, venta al por menor deben ser implementadas para reducir el riesgo de contaminación de *S. aureus*, los vendedores al menudeo y los consumidores también deben considerar la vida de anaquel de los productos alimenticios durante la compra o venta y practicar una adecuada higiene personal para reducir la vulnerabilidad del patógeno (Mai *et al.*, 2010).

Algunas poblaciones de *S. aureus* han desarrollado resistencia a antibióticos comúnmente usados, como penicilina, ampicilina etc. debido al amplio uso de betalactámicos, particularmente para el tratamiento de mastitis bovina (Mai *et al.*, 2010). En ese sentido las cepas estudiadas mostraron 100% de resistencia a penicilina que concuerda con datos de Pereira *et al.*, (2009), con 73% aunque contradice con valores de Rivera-Salazar *et al.*, (2011), con 44%, Spanu *et al.*, (2012), con 40%, Alvarado *et al.*, (2011), reportaron 31%. Para la ampicilina también se encontró un nivel de resistencia alto con 94%, valor alto en comparación con Pereira *et al.*, (2009), ampicilina con 70% y que contrasta con el estudio de Yeşim y Haluk (2012), y André *et al.*, (2008), que encontraron un valor de 50% para este antibiótico, Spanu *et al.*, (2012), con 40% y Alvarado *et al.*, (2011), reportaron 31%.

Para gentamicina se encontró una sensibilidad de 82.3% en los aislamientos y valores similares encontró Normanno *et al.*, (2007), que encontró 100% de sensibilidad, Pereira *et al.*, (2009), con 92%, Alvarado *et al.*, (2011), André *et al.*,

(2008), y Rivera-Salazar *et al.*, (2011), también encontraron sensibilidad a este antibiótico.

Para eritromicina se encontró una sensibilidad de 53% que contrasta con el 100% de sensibilidad que encontraron Normanno *et al.*, (2007), Spanu *et al.*, (2012), y Alvarado *et al.*, (2011), por otro lado Pereira *et al.*, (2009), encontró sensibilidad intermedia a eritromicina con 60%, por su parte Rivera-Salazar *et al.*, (2011), encontró resistencia eritromicina con 8% y intermedia con 76%

Para tetraciclina se encontró una sensibilidad de 94% valores similares a los registrados por Normanno *et al.*, (2007), y Sasidharan *et al.*, (2011), que encontraron 100% de sensibilidad, Pereira *et al.*, (2009), con 99.3%, así como Yeşim y Haluk (2012), André *et al.*, (2008), con 75% aunque también se ha encontrado resistencia en bajos porcentajes como Rivera-Salazar *et al.*, (2011), con 12% y Alvarado *et al.*, (2011), con 4%.

Para trimetoprim-sulfametoxazol se encontró en este estudio una sensibilidad de 94%, que coincide con Alvarado *et al.*, (2011), Normanno *et al.*, (2007), Alvarado *et al.*, (2011), que encontraron sensibles sus aislamientos

Y para la oxacilina en el presente estudio se encontró que dos aislamientos (11.8%) mostraron ser resistentes a oxacilina en la prueba de sensibilidad *in vitro* sin embargo no presentaron la presencia del gen *mecA* en la prueba de PCR. Este valor es similar a los reportados por Rivera-Salazar *et al.*, (2011), y Alvarado *et al.*, (2011), quienes encontraron resistencia con porcentajes de 20 y 15% respectivamente y contrastan con Pereira *et al.*, (2009), y Spanu *et al.*, (2012), encontraron 62 y 100%.

El incremento de la resistencia a penicilina en aislamientos de alimentos requiere investigación de la eficacia de los tratamientos a antibióticos (Valsangiacomo *et al.*, 2000).

El rol de los alimentos como vehículo de colonización o infección de MRSA en humanos ha sido establecido por varios estudios (Kluytmans, 2010; Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2015). En el presente estudio no se encontró la presencia del gen *mecA* (MRSA) en los aislamientos procedentes de quesos frescos, aunque estudios evidencian que estos productos lácteos son una ruta de transmisión de MRSA como es estudio llevado a cabo por Pesavento *et al.*, (2007), quienes encontraron 6 MRSA de quesos, Normanno *et al.*, (2007), quienes aislaron MRSA procedente de dos muestras de quesos, Kamal *et al.*, (2013), encontraron un aislamiento positivo a *mecA*, Yeşim y Haluk (2012), encontraron 2 aislamientos positivos a *mecA* provenientes de quesos, Lemus *et al.*, (2008), encontró 1.2% de resistencia a Oxacilina en queso y también se han encontrado prevalencias altas como Shanebandi *et al.*, (2014), quienes encontraron un 21% de prevalencia en quesos lo que representa un riesgo de infecciones y también la posibilidad de transmisión

de resistencia a otras bacterias o a humanos a través de los alimentos lo que podría ocasionar infecciones y llevar al fracaso de terapias con antibióticos. (Pesavento *et al.*, 2007).

Mayor atención se le debe poner a la cadena alimenticia del ganado, que podría ser una posible ruta de transmisión de MRSA a humanos a través de derivados lácteos de leche cruda (Traversa *et al.*, 2015), esto es especialmente crítico en México que posee una amplia variedad de quesos elaborados a partir de leche cruda pues productos lácteos como el queso tradicional los microbios no son eliminados por calentamiento o durante el procesamiento, por lo que podrían servir como vehículo para dispersar MRSA (Shanebandi *et al.*, 2014).

El monitoreo de leche cruda y el control post-ordeña debe ser seguida y aplicada para reducir o prevenir la incidencia de *S. aureus* y MRSA en leche y productos lácteos (Visciano *et al.*, 2014). Y en México hace falta un control de estos alimentos ya que estudios como el de López-Vázquez *et al.*, (2010), detectaron MRSA en hatos lecheros sin embargo a diferencia de Europa donde leche cruda y productos hechos con leche cruda están listados en la categoría de productos recomendados para ser muestreados para el monitoreo de MRSA (Traversa *et al.*, 2015)

La alta prevalencia de genes de resistencia debe ser considerada como un riesgo potencial para la salud en seres humanos y en el ganado, estudios epidemiológicos y patogénicos deben ser realizados para supervisar la distribución, las especies infecciosas y la cinética de la infección, se deben adoptar precauciones necesarias por el gobierno y personas para evitar una mayor propagación de MRSA, medidas como la promoción de la higiene y evitar el uso no supervisado de antibióticos son pasos esenciales al respecto, esto sería útil en las practicas del manejo de la enfermedad y así reducir los costos generales del tratamiento médico (Shanebandi *et al.*, 2014). La inocuidad alimentaria debe ser garantizada a fin de prevenir la transmisión de microorganismos patógenos u oportunistas al consumidor (Pesavento *et al.*, 2007).

La biotipificación empleada para determinar el origen presuntivo de las cepas de *S. aureus* mostró los aislamientos pertenecieron al ecovar sin hospedero específico con 58.8%, datos similares se observaron en el estudio de Normanno *et al.*, (2007), quienes no pudieron tipificar el 50% de sus aislamientos, sin embargo en este estudio el 23.5% de los aislamientos pertenecieron al ecovar humano y Rosegren *et al.*, (2010), mostraron que sus cepas pertenecieron en su mayoría a este ecovar con 75%. Cepas multiresistentes pueden ser transmitidas de los productores y manipuladores de queso como el estudio de Ferreira *et al.*, (2014), que demostró que personal con higiene deficiente tiene un rol importante como portadores y diseminadores.

En cuanto al *biofilm* del total de los aislamientos que se probaron por la técnica de Rojo congo el 8(47%) presentaron la coloración característica, estos datos contrastan con los resultados encontrados por Salgado-Ruíz *et al.*, (2014), quienes utilizaron técnicas genotípicas para la detección del *biofilm* y encontraron que el 100% de sus aislamientos eran positivos, esto es importante debido a que la zona en que se realizó ese estudio la leche se utiliza en su mayoría para la producción de queso. La presencia del biofilm sugiere que la contaminación se produjo durante el proceso de manufactura.

X. CONCLUSIONES

La procedencia del queso fresco en el municipio es mayoritariamente del Valle de Toluca.

La evaluación del queso fresco del Valle de Toluca correspondió a un queso típicamente genuino de la región.

El sistema de comercialización del producto es deficiente.

Se identificaron 17 aislamientos de *S. aureus* procedentes de quesos frescos, siendo todos positivos al gen *femB* que representa un riesgo a la Salud Pública.

Los aislamientos mostraron un mayor porcentaje de resistencia a penicilina, ampicilina, ceftazidima, cefotaxima y amoxicilina/ácido clavulánico.

Ningun aislamiento mostró el gen *mecA* en la prueba de PCR.

La biotipificación mostró que los aislamientos pertenecían mayoritariamente al Ecovar humano.

Un porcentaje importante mostró ser positivo a *biofilm*.

XI. LITERATURA CITADA

Adams M., Moss M., (2002) Microbiología De Los Alimentos, Acribia, España, 258-264.

Alvarado V., Mora M., Arías M., Rojas N., Chaves C.,(2011), Resistencia antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus*, Costa Rica, Rev Costarr Salud Pública, 20:102-106.

André M., Hidalgo M., Jayme L., Kipnis A., Pimenta M., Bisol A., (2008), Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following Smal digestion, Food Control 19:200-207.

Bando Municipal, obtenido de: <http://legislacion.edomex.gob.mx/sites/legislacion.edomex.gob.mx/files/files/pdf/bdo/bdo108.pdf>, consultado el 22 de enero de 2015.

Borbolla-Sala M., Vidal-Pérez M., Piña-Gutiérrez O., Ramírez Messner I., Vidal-Vidal J., (2004), Contaminación de los alimentos por *Vibrio cholerae*, coliformes fecales, *Salmonella*, Hongos, levaduras y *Staphylococcus aureus* en Tabasco durante el 2003, Salud en Tabasco, 10(2):221-232.

Bustos-Martínez J., Hamdan-Partida A., Gutiérrez-Cárdenas M., (2006), *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad, Rev. Biomed, 17:287-305.

Camussone C. y Calvino L., (2013), Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias de bovinos: relevancia y rol como agentes inmunogenos, Revista Argent Microbiol., 45(2):119-130.

Castro-Georgana V., Díaz-Rodríguez A., Torres-Torres B., (2005), Análisis de la calidad sanitaria de las queserías y quesos en el Estado de Tabasco en el periodo del 2002-2005, Salud en Tabasco 13(1):560-567.

Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades, (ECDC), 2013.

Cervantes F, Villegas de Gante A., Cesín A, Espinoza A., (2008), Los quesos mexicanos genuinos Patrimonio cultural que debe rescatarse, México: Universidad Autónoma Chapingo, Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial, pp: 63-65.

Cervantes-García E., García-González R., Salazar-Schettino, (2014), Características generales del *Staphylococcus aureus*, Rev Latinoam PAtol Clin Med Lab, 61(1):28-40.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. (2014). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-S24 and eM100.

Codex alimentarius. Código de prácticas de higiene para la leche y los productos lácteos. CAC/RCP 57-2004.

Crago B., Ferrato C., Drews S., Svenson L., Tyrrell G., Louie M., (2012) Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in food samples associated with foodborne illness in Alberta, Canada from 2007 to 2010, *Food Microbiology*, 32 (1):202-205.

Da Silva Q., De Medeiros I., Alves A., Pinto J., Leite E., (2012), Influence of temperature and surface kind on *biofilm* formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers, *Food Control*, 25:469-475.

Devriese L.A., (1984), A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species, *Journal of Applied Bacteriology*, 56:215-220.

Di Ciccio P., Vergara A., Festino A., Paludi D., Zanardi E., Ghidini S., Ianieri A., (2015) *Biofilm* formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity, *Food Control*, 50:930-936.

Fagundes H, Barchesi L., Nader F., Ferreira A., Menezes L., Oliveira C., Fernandes A., (2010), Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in São Paulo state, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(2):376-380.

Ferreira J., Costa W., Cerqueira E., Carvalho J., Oliveira L., Almeida R., (2014), Food handler-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in public hospitals in Salvador, Brazil, *Food Control*, 37:395-400.

Flórez A. y Mayo B., (2015), Diversity and dynamics of antibiotic-resistant bacteria in cheese as determined by PCR denaturing gradient gel electrophoresis, *International Journal of Food Microbiology*, 214: 63-69.

Fluit A., (2012), Livestock-associated *Staphylococcus aureus*, *Clinical Microbiology and Infection*, Review.

Freeman J., Falkner R., Keane T., (1989), New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci, *Journal of Clinical Pathology*, 42:872-874.

Gil M., (2000), *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a la meticilina, *Rev Chil Infect*, 17(2):145-152.

González J., Chávez M., Ponce N., Contreras M., Colín V. (2007), Demanda potencial de los quesos artesanales en la ciudad de Toluca, Estado de México. En:

Agroindustria rural y territorio. Tomo II, Nuevas tendencias en el análisis de la lechería. Universidad Autónoma de México, México, DF.; 305-316.

Grass-Ramírez J. y Cesín-Vargas, A., (2014), Situación actual y retrospectiva de los quesos genuinos de Chiautla de Tapia, México. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 11(2), 201-221.

Grundmann H., Aires-de-Sousa M., Boyce J., Tiemersma E., (2006), Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat, *Lancet*, 368:874-885.

Guzmán-Blanco M., Mejía C., Isturiz R., Álvarez C., Bavestrello L., Gotuzzo E., Labarca J., Luna C., Rodríguez Noriega E., Salles M., Zurita J., Seas C., (2009), Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34:304-308.

Hiramatsu K., Katayama Y., Matsuo M., Sasaki T., Morimoto Y., Sekiguchi A., Baba T., (2014), Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy, *Journal of Infection and Chemotherapy*, 20(10):593-601.

Hwa J. (2006), Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cattle and chicken, and analyses of their *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes, *Veterinary Microbiology*, 114:155-159.

Instituto Nacional de Geografía y Estadística e Informática (INEGI). Mapa del Estado de México. obtenido de: http://cuentame.inegi.org.mx/mapas/pdf/entidades/div_municipal/mexicompios.pdf, consultado el 24 de Noviembre de 2015.

Ippolito G., Leone S., Lauria F., Nicastrì E., Wenzel R., (2010), Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the superbug, *International Journal of Infectious Diseases*, 14S4: S7-S11.

Instituto Nacional de Geografía Estadística e Informática (INEGI) 2010, obtenido de <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/datos-geograficos/15/15106.pdf>, consultado el 14 de febrero de 2014.

Jablonski Lynn y Bohach Gregory (2000) *Microbiología de los alimentos. Fundamentos y fronteras*. Editorial Acribia.

Jones T., Kellum M., Porter S., Bell M., Schaffner W., (2002), An outbreak of Community-Acquired Foodborne illness caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, *Emerging Infectious Diseases*, 8(1):82-84.

Kamal R., Bayoumi M., Abd El Aal S., (2013) MRSA detection in raw milk, some dairy products and hands of dairy workers in Egypt, a mini survey, *Food Control* 33:49-53.

- Kawada M. y Komatsuzawa H., (2012), Factors affecting susceptibility of *Staphylococcus aureus* to bacterial agents, *Journal of Oral Biosciences*, 54:86-91.
- Khakpoor Mansor y Safamarshael S., (2011), Contamination rate of Iranian Traditional Kuzehi cheese to Coagulase Positive *Staphylococcus aureus* by Culture and PCR Method, *Annals of Biological Research*, 2 (6):536-541.
- Khoramian B., Jabalameli F., Niasari-Niasari A., Taherikalani M., Emaneini M., (2015), Comparison of virulence factors and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from human and bovine infections, *Microbial Pathogenesis* 88:73-77.
- Kluytmans J., (2010), Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or case for complacency, *Clinical Microbiology and Infection, Review* 16:11-15.
- Kluytmans J., Van Leeuwen W., Goessens W., Hollis R., Messer S., Herwaldt L. Bruining H., Heck M., Rost J., Van Leeuwen N., Van Belkum A., Verbrugh H., (1995), Food-Initiated Outbreak of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Analyzed by Pheno-and Genotyping, *Journal of Clinical Microbiology*, 1121-1128.
- Kobayashi H., Wu H., Kojima K., Taniguchi K., Urasawa S., Uehara N., Omizi Y., Kishi Y., Yagihashi A., Kurokawa I., (1994), Detection of *mecA*, *femA*, and *femB* genes in clinical strains of staphylococci using polymerase chain reaction, *Epidemiol infect*, 113(2):259-266.
- Kousa M., Mataragas M., Skandamis P., Drosinos E., (2010), Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels, *Food Control*, 21:805-815.
- Lemus D., Maniscalchi M., Massoun M., Vizcaya H., (2008), Estafilococos oxacilino resistentes en queso blanco fabricado en el estado de Anzoátegui, Venezuela, *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 28(1):48-54.
- Leonard F. y Markey B., (2008), Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: A review, *The Veterinary Journal*, 175:27-36.
- López-Vázquez M., Martínez-Castañeda J., Talavera-Rojas M., Valdez-Alarcón J., Velázquez-Ordoñez V., (2015), Detection of *mecA*, *mecI* and *mecR1* genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains of bovine origin isolated from Family Dairy Farms, *Archivos de Medicina Veterinaria*, 47:245-249.
- Luini M., Cremonesi P., Magro G., Bianchini V., Minozzi G., Castiglioni B., Piccinini R., (2015), Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is associated with low within-herd prevalence of intra-mammary infections in dairy cows: Genotyping of isolates, *Veterinary Microbiology*, 178:270-274.

Mai B., Hayat Z., Basu S., Kassu A., Van N., Mohammad A., Yamato M., Ota F., Thi N., Thi H., Cong N., (2010), Toxigenicity and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from Vietnamese ready-to-eat-foods, Food Control, 21:166-171.

Medvedová A, Valík L., Sirotná Z., Liptáková D., (2009), Growth Characterization of *Staphylococcus aureus* in Milk: a Quantitative Approach 27(6):443-453.

NMX-F-083-1986. ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS.

NMX-F-094-1984. ALIMENTOS. LÁCTEOS. DETERMINACIÓN DE CENIZAS EN QUESOS. FOODS LACTEOUS. CHEESE ASHES DETERMINATION. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS.

NMX-F-098-1976. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EN QUESOS. METHOD OF TEST FOR PROTEIN IN CHEESE. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMA.

NMX-F-100-1984. ALIMENTOS. LÁCTEOS. DETERMINACIÓN DE GRASA BUTÍRICA EN QUESOS. FOODS. LACTEOUS. CHEESE BUTTER FAT DETERMINATION. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS.

NMX-F-360-S-1981. ALIMENTOS PARA HUMANOS. DETERMINACIÓN DE CLORUROS COMO CLORURO DE SODIO (MÉTODO DE VOLHARD). FOODS FOR HUMANS. DETERMINATION OF CHLORIDES AS SODIUM CHLORIDE (VOLHARD METHOD). NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-109-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. PROCEDIMIENTOS PARA LATOMA, MANEJO Y TRANSPORTE DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.

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-115-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE *Staphylococcus aureus* EN ALIMENTOS.

Normanno G., Corrente M., La Salandra G., Dambrosio A., Quaglia N., Parisi A., GResco G., Bellacicco A., Virgilio S., Celano G.,(2007), Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy, International Journal of Food Microbiology, 117:219-222.

Normanno G., Firinu A., Virgilio S., Mula G., Dambrosio A. Poggiu A., Decatelli L., Mioni R., Scuota S., Bolzoni G., Di Giannatale E., Salinetti., La Salandra G., Bartoli

M., Zuccon F., Pirino T., Sias S., Parisi A., Quaglia N., Celano, (2005) Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy, *International Journal of Food Microbiology* 98:73-79.

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.

Oniciuc E., Araiza-Miguel J., Bolocan A., Diez-Valcarce M., Rovira J., Hernández M. Fernandez-Natal i., Ioana A., Rodríguez-Lázaro D., (2015), Foos from black market at EU border as a neglected route of potencial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission, *International Journal of Food Microbiology*, 209:34-38.

Otto M., (2008), Staphylococcal Biofilms, *Curr Top Microbiol Immunol*, 322: 207–228.

Pesavento G., Ducci B., Comodo N., Lo Nostro A., (2007), Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Food Control*, 18:196-200.

Petinaki E. y Spiliopoulou I., (2012), Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among companion and food-chain animals: impact of human contacts, *Clinical Microbiology and Infection*, 18:626-634.

Picos J, y Torres M., (2006), Microbiología en alimentos, Universidad de Guadalajara, México, pp 59-82.

Prère M., Baron o., Cohen S., Fayet O. (2006), Genotype MRSA, a new genetic test for the rapid identification of *staphylococci* and detection of *mecA* gene, *Pathologie Biologie*, 54:502-505.

Ramírez-López C. y Vélez-Ruíz J., (2012), Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad, *Temas selectos de Ingeniería en Alimentos*, 6-2:131-148.

Rivera-Salazar J., Mujica I., Aranaga-Natera V., Navarro-Ocando C., Zabala-Díaz I., Arencio-Bracho L., (2011), *Staphylococcus aureus* procedentes de quesos: Susceptibilidad a antibióticos y su relación con los plasmidos, *Revista científica*, 21(3): 202-211.

Rode T., Langsrud S., Holck A., Møretrø T., (2007), Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions, *International Journal of Food Microbiology*, 116:372-383.

Rodríguez-Lázaro D., Ariza-Miguel J., Diez-Valcarce M., Fernández-Natal I., Hernández M., Rovira J., (2015), Foods confiscated from non-EU flights as a

neglected route of potential methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission, International Journal of Food Microbiology, 209:29-33.

Romero A., Viesca F., Hernández M., (2010), Formación del patrimonio gastronómico del Valle de Toluca, México, Ciencia Ergo Sum, 24(3):239-252.

Rosengren A., Fabricius A., Guss B., Sylvén S., Lindqvist R., (2010) Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in chesse produced on farm-dairies, International Journal of Food Microbiology, 144:263-269.

Rossi F., Rizzotti L., Felis G., Torriani S., (2014), Horizontal gene transfer among organisms in food: Current knowledge and future perspectives, Food Microbiology, 42: 232-243.

Salgado-Ruíz T., Rodríguez A, Gutiérrez D., Martínez B., García P., Espinoza-Ortega A., Martínez-Campos A., Lagunas-Bernabé S., Vicente F., Arriaga Jordán C., (2014), Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* from small-scale dairy systems in the highlands of Central México, Dairy Sci. Technol. Original Paper.

Sánchez V., Colín N., López G., Avilés N., Castelán O., Estrada F., (2012), Caracterización del queso madurado Zacazonapan producido en el Estado de México, 13er. Congreso Nacional de Investigación Socioeconómica y Ambiental de la Producción Pecuaria, Colegio de Posgraduados, Campus Puebla, México.

Sandel M., McKillip J., (2004) Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches, Food Control, 15:5-10.

Sasidharan S., Prema B., Yoga L., (2011), Antimicrobial drug resistance of *Staphylococcus aureus* in dairy products, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 130-132.

Secretaría de Desarrollo Económico (SEDECO), Tianguis del municipio de Toluca, ubicación en Delegaciones, Subdelegaciones y Colonias. Subdirección de Mercados. 12 Jun 2014.

Sepúlveda D., Olivas G., Molina J. (2007), Productos lácteos en Buenas prácticas en la producción de alimentos, Trillas; Pp 351-379.

Shanehbandi D., Baradaran B., Sadigh-Eteghad S., Zarredar H., (2014), Occurrence of Methicillin Resistant and Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Traditional Cheeses in the North West of Iran, ISRN Microbiology, 5 pp.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP),(2007), Panorama de la lechería en México, disponible en:

http://www.siap.gob.mx/pdfjs/web/viewer.php?file=b_leche_abrjun2015.pdf

(Consultado el 5 de Noviembre de 2013).

Solís-Méndez A., Estrada-Flores J., Castelan Ortega O., (2012), A study on the texture diversity of the Artisan Ranchero Cheese from Central Mexico, *International Journal of Dairy Technology* 41(1):37-44.

Sollid J., Furberg A., Hanssen A., Johannessen M., (2014), *Staphylococcus aureus*: Determinants of human carriage, *Infection, Genetics and Evolution*, 21:531-541.

Spanu V., Spanu C., Viridis S., Cossu F., Scarano C., De Santis E., (2012) Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese, *International Journal of Food Microbiology*, 153:53-57.

Stefani S. y Goglio A., (2010), Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: related infections and antibiotic resistance, *International Journal of Infectious Diseases*, 14S4:S19-S22.

Traversa A., Gariano G., Gallina S., Bianchi D., Orusa R., Domenis L., Caballerio P., Fossati L., Serra R., Decastelli, (2015), Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from food and wild animal carcasses in Italy, *Food Microbiology*, 52:154-158.

Valasagiaco C., Dolina M., Peduzzi R., Jäggli M., (2000), Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from hospitalized and dairy food (fresh cheese): a survey over a decade in southern Switzerland, *European Society of Clinical Microbiology and infectious Diseases*, 6:393-394.

Valero-Leal K., Rivera-Salazar J., Valbuena E., Boscán L., Valeris R., Castro G., Briñez W. (2012) Caracterización bioquímica y producción de enterotoxinas de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche cruda y queso fresco artesanal en fincas del Estado de Zulia, *Revi Científica FCV-LUZ*, 22(4):303-314.

Vanegas M., González L., Martínez A., Buitrago F.,(2008), Aislamiento y caracterización de cepas de *Staphylococcus* enterotoxigénicos aislados de quesos en Bogota, *Rev. MVZ Córdoba*, 13(2):1288-1293.

Vasudevan P., Mohan M., Annamalai T., Venkitanarayanan K., (2003), Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation, *Veterinary Microbiology*, 92:179-185.

Velázquez-Meza M, (2005), Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* metiliclorresistente, *Salud Pública Mex*, 47:381-387.

Velázquez-Ordoñez V., Valladares B., Gutiérrez A., Talavera M., Pescador N., Valés R., (2011), Milk production and Safety food. In : *Nutritional Insights and Food Safety*. Švarc-GajiÆ . Editor. Nova Science Publishers, New York, Fp 335-357.

Villegas de Gante Abraham, (2004), Tecnología quesera, Trillas, México pp:11-25, 242-279, 305-309.

Visciano P., Pomilio F., Tofalo R., Sacchini L., Saletti M., Tieri E., Schirone M., Suzzi, (2014), Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy cow farms, Food Control, 46:532-538.

Wendlandt S., Schwarz S., Silley P., (2013), *Staphylococcus aureus*: A Food-Borne Pathogen, Annu. Rev. Food Sci. Technol., 4:117-139.

World Health Organization 2014, Antimicrobial resistance: global report on Surveillance.

Wu Z., Li F., Liu D., Xue H., Zhao X., (2015), Novel type XII staphylococcal cassette chromosome mec harboring a new cassette chromosome recombinase, CcrC2. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 59:7597-7601.

Yeşim H. y Haluk T., (2012), Detection of enterotoxigenic and antimicrobial resistant *S. aureus* in Turkish cheeses, Food Control, 24:100-103.

XII. ANEXOS

Anexo 1: CUESTIONARIO PARA COMERCIANTES DE QUESOS FRESCOS EN MERCADOS POPULARES DEL MUNICIPIO DE TOLUCA



UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MEXICO
 MAESTRIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
 RECURSOS NATURALES
 FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
 SALUD ANIMAL



CUESTIONARIO PARA COMERCIANTES DE QUESOS FRESCOS EN MERCADOS POPULARES DEL MUNICIPIO DE TOLUCA

Fecha: _____

1. Número de muestra: _____
2. Mercado: _____
3. Procedencia del vendedor: _____
4. Procedencia del queso: _____
5. ¿Lo compra? No ____ Si ____ ¿Donde? _____
6. ¿Lo elabora? No ____ Si ____ ¿Donde? _____
7. Utiliza leche comprada u obtenida de vacas propias _____
8. Ud. Ordeña o utiliza personal para esa actividad: _____
9. Utiliza la leche de ese día o mezcla la de varios días: _____
10. ¿Desde cuándo lo elabora? _____
11. De quien aprendió la técnica: _____
12. Pasteurización de la leche: Si ____ No ____
13. ¿Cantidad de sal que utiliza? _____
14. Tipo de sal que utiliza: Grano _____ La Fina _____ ¿Otro? _____
15. Adición de cuajo o algún otro aditivo : Líquido _____ Polvo _____ Abomaso _____ ¿Otro? _____
16. Técnica de molienda del queso: _____
17. Número de quesos frescos que elabora: _____
18. Quienes participan en la elaboración del queso? Familia: _____ Empleados: _____
19. Acude a otros mercados a vender los quesos que elabora? Si, ¿Cuáles? _____ No _____
20. Condiciones en las que son vendidos los quesos frescos: _____
21. T°: _____
22. pH: _____
23. pH 1: _____
24. pH 2: _____
25. pH 3: _____
26. Presentación: Circular _____ Rectangular _____ ¿Otra? _____
27. Peso aproximado: _____
28. Embalaje: Películas de plástico: _____ Papel: _____ Ninguno: _____ Otro: _____
29. Precio del queso: _____ Pieza: _____ Kg.: _____
30. Cuenta de *Staphylococcus aureus*: _____ ufc/g.
31. Sensibilidad *in vitro*:

Antibiótico	Sensible	Intermedia	Resistente
oxacilina (1 µg)			
cefotitina (30 µg)			
amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 µg)			

32. Cantidad de NaCl: _____

MRSA: _____

ANEXO 2: DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN QUESO FRESCO

DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN QUESO FRESCO			
			
1) Crisoles a peso constante	2) Pesar 5 gr. de muestra	3) Secado en estufa por 4 hr. a 100 °C	4) Pasar las muestras al desecador y pesar hasta obtener un peso constante

Anexo 3: DETERMINACIÓN DE CENIZAS EN QUESO FRESCO

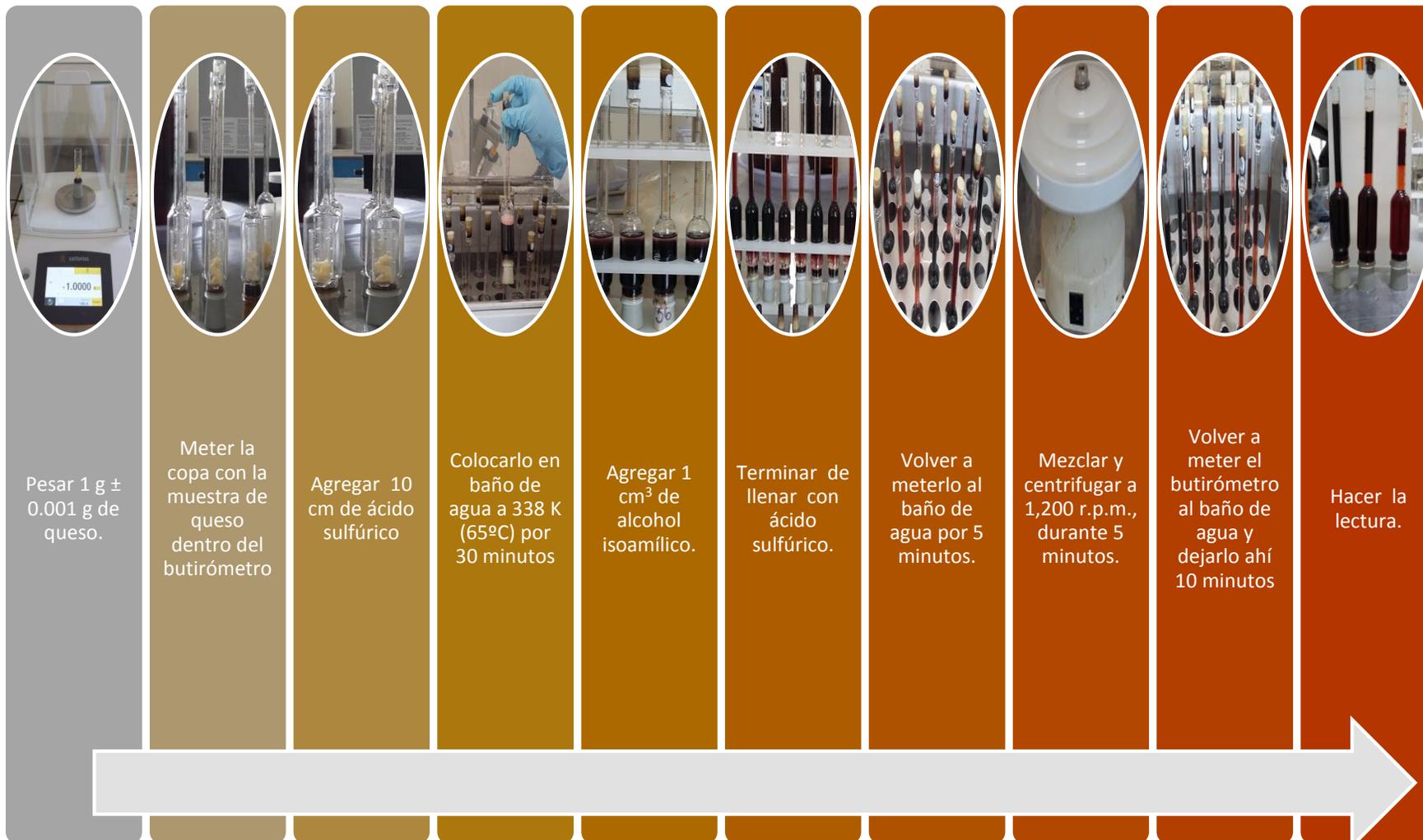
DETERMINACIÓN DE CENIZAS EN QUESO FRESCO		
		
1) Muestras secas	2) Calcinado en la mufla por 4 hr. a 550°C	3) Pasar las muestras al desecador y pesar hasta obtener un peso constante

ANEXO 4: DETERMINACIÓN DE NaCl EN QUESO FRESCO

DETERMINACIÓN DE NaCl EN QUESO FRESCO

			
1) Disolver las cenizas en ácido nítrico, filtrar, lavar y recibir en un matraz Erlenmeyer con agua	2) Agregar 5 ml de nitrato de plata	3) Adicionar 5 ml del indicador sulfato férrico amoniacal y 1 ml de ácido nítrico.	4) Titular con solución de tiocianato de potasio o amonio 0.1N hasta que aparezca un viraje detectable y permanente

ANEXO 5: DETERMINACIÓN DE GRASA EN QUESO FRESCO



ANEXO 6: DETERMINACIÓN DE PROTEINA EN QUESO FRESCO

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EN QUESO FRESCO

						
<p>Pesar 0.25 g</p>	<p>Agregar al tubo 1 pastilla catalizadora y 12 ml de ácido sulfúrico concentrado.</p>	<p>Colocar el tubo digestor previamente calentado (a 420°C) hasta su completa digestión.</p>	<p>Sacar el tubo del digestor y dejarlo enfriar de 20 a 30 minutos.</p>	<p>Adicionar 60 ml de agua y 50 ml de NaOH al 40% y colocarlo en el destilador</p>	<p>En un matraz Erlenmeyer agregar 30 ml de ácido bórico al 4% y 6 gotas de indicador verde de bromocresol – rojo de metilo; ahí se recibió el destilado durante 5 minutos</p>	<p>Titular con ácido clorhídrico 0.1 N (verde a rosa claro).</p>

Anexo 7: MÉTODO McFARLAND

1. Agregar 0.5 mL de 0.048 mol/L de BaCl_2 (1.175% w/v $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 99.5 mL de 0.18 mol/L de H_2SO_4 (1% v/v) en constante agitación hasta obtener una suspensión.
2. Verificar la correcta densidad de la turbidez mediante la medición de la absorbancia en un espectrofotómetro. La absorbancia a 625nm debe ser de 0.08 a 0.13 para el standard de McFarland.
3. Transferir la solución de Sulfato de Bario en alícuotas de 4 a 60 mL.
4. Guardar los tubos en un lugar oscuro a temperatura ambiente.
5. Verificar cada mes la densidad.

Anexo 8: NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-115-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE *Staphylococcus aureus* EN ALIMENTOS.

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Salud.

JOSE MELJEM MOCTEZUMA, Director General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, por acuerdo del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 38 fracción II, 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 194 fracción I de la Ley General de Salud; 2o. fracción III, 34, 37, 40 y los demás aplicables del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios; 8o. fracción IV y 13 fracción I del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud.

PREFACIO

En la elaboración de la presente norma participaron los siguientes organismos e instituciones:

SECRETARIA DE SALUD

Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios
Laboratorio Nacional de Salud Pública

SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA Y DESARROLLO RURAL

Comisión Nacional del Agua

SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y PESCA

Instituto Nacional de la Pesca

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

JUGOS DEL VALLE, S.A. DE C.V.

LABORATORIO FERMI, S.A.

LABORATORIO ICCABI, S.A. DE C.V.

LECHE INDUSTRIALIZADA CONASUPO, S.A DE C.V. LICONSA

SOCIEDAD MEXICANA DE NORMALIZACION Y CERTIFICACION, S.C.

NORMEX

INDICE

0. INTRODUCCION

1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION

2. FUNDAMENTO

3. REFERENCIAS

4. DEFINICIONES
5. SIMBOLOS Y ABREVIATURAS
6. REACTIVOS Y MATERIALES
7. APARATOS
8. PREPARACION DE LA MUESTRA
9. PROCEDIMIENTO
10. CALCULO Y EXPRESION DE RESULTADOS
11. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES
12. BIBLIOGRAFIA
13. OBSERVANCIA DE LA NORMA
14. VIGENCIA

0. Introducción

El crecimiento de *Staphylococcus aureus* en alimentos tiene gran importancia por tratarse de un microorganismo capaz de producir una poderosa enterotoxina que al ingerirse causa intoxicaciones alimentarias.

Entre las razones para determinar el *Staphylococcus aureus* en alimentos están:

Confirmar la presencia de este microorganismo como agente causal de una enfermedad de origen alimentario.

Determinar si un alimento o ingrediente es fuente potencial de este microorganismo enterotoxigénico. Demostrar la contaminación postproceso la cual es usualmente debida a contacto humano o con superficies inadecuadamente sanitizadas.

Los alimentos sujetos a contaminación postproceso con tipos enterotoxigénicos de *Staphylococcus aureus* representan un riesgo por la ausencia de flora competitiva que normalmente restringe el crecimiento del *Staphylococcus aureus* y la producción de enterotoxinas.

Este tipo de alimentos se vuelven más peligrosos, si además son sujetos a un inadecuado manejo o son mantenidos a temperaturas de conservación inapropiadas.

Los alimentos perecederos tales como: carnes crudas y procesadas, ensaladas, productos de pastelería y productos de leche, son los más comúnmente asociados con intoxicación estafilocócica.

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece el método microbiológico para determinar la cuenta de *Staphylococcus aureus* presente en alimentos nacionales o de importación.

1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el territorio nacional para las personas físicas o morales que requieran efectuar este método en alimentos, para fines oficiales.

2. Fundamento

Este método permite hacer una estimación del contenido de *Staphylococcus aureus* en alimentos, se efectúa directamente en placas de medio de cultivo selectivo y diferencial, con la confirmación mediante las pruebas de coagulasa y termonucleasa.

Este método es adecuado para el análisis de alimentos en los cuales se esperen más de 100 células de *Staphylococcus aureus* por g.

3. Referencias

Esta norma se complementa con lo siguiente:

NOM-109-SSA1-1994 Procedimiento para la Toma, Manejo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.*

NOM-110-SSA1-1994 Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.*

4. Definiciones

Para fines de esta norma se entiende por:

Staphylococcus aureus, microorganismo que se desarrolla en medios de cultivo selectivo y diferencial, que es capaz de dar positiva la prueba de coagulasa y termonucleasa.

5. Símbolos y abreviaturas

Cuando en esta norma se haga referencia a los siguientes símbolos y abreviaturas se entiende por:

kg kilogramo

cm² centímetro cuadrado

g gramo

l litro

ml mililitro

cm centímetro

mm milímetro

h hora

min minuto

seg segundo

°C grados Celsius

N normal

M molar

PM peso molecular

pH potencial de hidrógeno

± más o menos

% por ciento

/ por

µm micrómetro

UFC unidades formadoras de colonias

6. Reactivos y materiales

En caso de disponerse de fórmulas comerciales deshidratadas, para su preparación se deben seguir las instrucciones impresas en la etiqueta respectiva.

Cuando se mencione agua debe entenderse que se trata de "agua destilada".

Los reactivos a emplear en el método objeto de esta norma deben ser grado analítico.

6.1 Reactivos

6.1.1 Soluciones diluyentes

6.1.1.1 Solución reguladora de fosfatos (Solución concentrada)

FORMULA

Ingredientes Cantidad

Fosfato monopotásico 34,0 g

Agua 1,0 l

Preparación

Disolver el fosfato en 500 ml de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1 N, aforar con agua a 1 l.

Esterilizar durante 15 min a 121°C ±1, conservar en refrigeración (solución concentrada).

Tomar 1,25 ml de la solución concentrada y llevar a 1 l con agua (solución de trabajo).

Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera.

Esterilizar a 121°C ±1 durante 15 min.

Después de la esterilización, los volúmenes finales y el pH de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

6.1.1.2 Agua peptonada

FORMULA

Ingredientes Cantidad

Peptona 1,0 g

Cloruro de sodio 8,5 g

Agua 1,0 l

Preparación

Disolver los componentes en un litro de agua.

Ajustar el pH a 7,0 con solución de hidróxido de sodio 1N.

Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera.

Esterilizar a 121°C ±1 durante 15 min.

Después de la esterilización los volúmenes finales y el pH de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

6.1.2 Medios de cultivo

6.1.2.1 Medio de Baird-Parker

FORMULA

Ingredientes Cantidad

Medio base (6.1.2.1.1) 95,0 ml

Solución de telurito de potasio (6.1.2.1.2) 1,0 ml

Emulsión de yema de huevo (6.1.2.1.3) 5,0 ml

Preparación

Cuando el medio base esté a 45°C, agregar los demás ingredientes y mezclar.

Colocar de 15 a 20 ml del medio completo, enfriar y dejar solidificar.

Las placas pueden almacenarse por 48 h a temperatura de 0 a 5°C.

6.1.2.1.1 Medio base de Baird-Parker

FORMULA

Ingredientes Cantidad

Triptona 10,0 g

Extracto de levadura 1,0 g

Extracto de carne 5,0 g

Glicina 12,0 g

Cloruro de litio 5,0 g

Piruvato de sodio 10,0 g

Agar 20,0 g

Agua 1,0 l

Preparación

Disolver los ingredientes o el agar base en agua y calentar con agitación constante y hervir durante 1 min. Esterilizar a 121°C ±1 durante 15 min.

Enfriar y mantener el medio a 45°C.

6.1.2.1.2 Solución de telurito

FORMULA

Ingredientes Cantidad

Telurito de potasio 1,0 g

Agua 100,0 ml

Preparación

Disolver el telurito de potasio en agua y esterilizar.

La solución puede ser almacenada por varios meses a temperatura de 0 a 5°C.

6.1.2.1.3 Emulsión de yema de huevo

Preparación

Lavar con agua y jabón los huevos frescos que sean necesarios y limpiarlos con una solución de tintura de yodo (solución alcohólica al 2%) o sumergirlos en solución de cloruro mercuríco (1:1000). Enjuagar con agua estéril y secar con gasa estéril.

En campana de flujo laminar o en condiciones asépticas, abrir los huevos y vaciarlos en un separador de claras estéril. Transferir las yemas a una probeta hasta un volumen de 60 ml y completar a 90 ml con solución salina isotónica.

Verter la emulsión a un matraz Erlenmeyer con perlas de vidrio estéril y agitar fuertemente para formar la emulsión.

Filtrar a través de gasa.

Las placas deben utilizarse dentro de las 48 h siguientes a su preparación.

6.1.2.1.4 Solución salina isotónica

FORMULA

Ingredientes Cantidad

Cloruro de sodio 0,85 g

Agua 100,0 ml

Preparación

Disolver el ingrediente en agua y esterilizar a 121°C ±1 durante 15 min.

6.1.2.2 Caldo de infusión cerebro-corazón (BHI)

FORMULA

Ingredientes Cantidad

Infusión de cerebro de ternera 200,0 ml

Infusión de corazón de res 250,0 ml

Peptona de gelatina 10,0 g

Cloruro de sodio 5,0 g

Fosfato disódico dodecahidratado 2,5 g

Glucosa 2,0 g

Agua 1,0 l

Preparación

Disolver los ingredientes en agua y calentar ligeramente si es necesario.

Distribuir y esterilizar durante 15 min a 121°C ±1.

6.1.2.3 Acido desoxirribonucleico helicoidal de timo de ternera.

FORMULA

Ingredientes Cantidad

Acido desoxirribonucleico helicoidal de timo de ternera o equivalente 0,03 g

Agar 1,00 g

Cloruro de calcio anhidro (Solución 0,01 M) (6.1.2.3.1) 0,10 ml

Cloruro de sodio 1,00 g

Azul de toluidina (Solución 0,1 M) (6.1.2.3.2) 0,30 ml

Tris-(hidroximetil-aminometano)

(Tris solución 0,05 M, pH 9) (6.1.2.3.3) 100,00 ml

Preparación

Disolver los ingredientes, excepto el azul de toluidina agitando hasta completar la disolución del ácido desoxirribonucleico y calentar a ebullición.

Agregar el azul de toluidina. Distribuir en frascos pequeños con tapón de hule. No es necesario esterilizar.

Este medio es estable a temperatura ambiente hasta 4 meses y funciona perfectamente aun después de fundirlo varias veces.

Tomar un portaobjetos limpio y agregar 3 ml del medio fundido esparciéndolo por la superficie.

Cuando el agar solidifique, hacer orificios con la punta de una pipeta Pasteur.

Conservar en refrigeración para evitar la deshidratación.

6.1.2.3.1 Solución de cloruro de calcio anhidro 0,01 M

Cloruro de calcio PM = 110,99

Disolver 0,1199 g de cloruro de calcio en 100 ml de agua.

6.1.2.3.2 Solución de azul de toluidina 0,1 M

Disolver 3,05 g de azul de toluidina en 100 ml de agua.

6.1.2.3.3 Solución amortiguadora 0,05 M Tris-(hidroximetilaminometano)

(Tris pH 9) PM = 121,1

Disolver 6,055 g de Tris en 100 ml de agua.

6.1.3 Reactivo biológico:

Plasma de conejo

Emplear plasma de conejo deshidratado o rehidratado siguiendo las instrucciones del fabricante y agregar ácido etilendiaminotetracético (EDTA) en solución al 0,1% en plasma rehidratado. Si se utiliza plasma deshidratado diluir con agua estéril en proporción de 1:3.

Puede emplearse plasma de conejo liofilizado adicionado de EDTA. No debe emplearse sangre citratada.

6.2 Materiales

Todos los instrumentos que se utilicen para trabajar la muestra deben esterilizarse mediante horno, durante 2 h de 170-175°C o como alternativa en autoclave durante 15 min como mínimo a 121°C ±1.

Cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas y separador de huevo.

Tubos de cultivo de 16 mm x 150 mm o frascos de 125 a 250 ml de capacidad.

Tubos de cultivo de 10 mm x 75 mm.

Cajas Petri de 90 a 100 mm de diámetro.

Pipetas bacteriológicas de 1 ml y 10 ml de capacidad graduadas en 0,1 ml y 1 ml respectivamente y diámetro de 2 a 3 mm.

Pipetas Pasteur.

Probetas.

Varillas de vidrio de 3,5 mm de diámetro aproximadamente y 20 cm de largo dobladas en ángulo recto.

Matraz Erlenmeyer con perlas de vidrio

Cámara húmeda: consiste en una caja Petri en la cual se coloca una varilla de vidrio en forma de "V" rodeada de algodón humedecido con agua.

7. Aparatos

Horno para esterilizar que alcance 180°C.

Autoclave con termómetro.

Baño de agua con regulador de temperatura de 35 ± 0,5°C.

Baño de agua con regulador de temperatura de 45 ± 0,5°C.

Balanza con capacidad no mayor de 2,500 g y sensibilidad de 0,1 g.

Incubadora a 35 ± 1°C.

8. Preparación de la muestra

La preparación de la muestra se debe realizar de acuerdo a lo establecido en la NOM-110-SSA1-1994 "Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico".

9. Procedimiento

9.1 Utilizando diferentes pipetas de 1 ml para cada dilución, depositar 0,1 ml sobre la superficie de las placas de agar Baird-Parker.

9.2 Distribuir el inóculo sobre la superficie del agar con varillas estériles de vidrio en ángulo recto, utilizando una para cada dilución.

9.3 Mantener las placas en su posición hasta que el inóculo sea absorbido por el agar.

9.4 Invertir las placas e incubar de 45 a 48 h a 35°C.

9.5 Seleccionar las placas que tengan entre 15 y 150 colonias típicas de *Staphylococcus aureus*; si no es posible, seleccionar las placas de las diluciones más altas no obstante tengan más de 150 colonias.

9.6 Cuando las placas tengan menos de 15 colonias típicas también pueden ser utilizadas y al informe se debe agregar la nota de "valor estimado".

9.7 Las colonias típicas son negras, circulares, brillantes, convexas, lisas, de diámetro de 1 a 2 mm y muestran una zona opaca y un halo claro alrededor de la colonia.

9.8 Seleccionar las colonias de acuerdo con el siguiente cuadro para realizar las pruebas de coagulasa y termonucleasa:

CUADRO

NUMERO DE COLONIAS NUMERO DE COLONIAS
SOSPECHOSAS EN PLACA POR PROBAR

Menos de 50 3

51 a 100 5

101 a 150 o más 7

9.9 Seleccionar el número de colonias y sembrar cada una en tubos con 0,5 ml de caldo de infusión cerebro-corazón.

9.10 Incubar a 35°C durante 24 h.

9.11 Inocular en la misma forma cepas conocidas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* como testigos positivo y negativo.

9.12 Después del periodo de incubación pasar con una pipeta de 1 ml, 0,3 ml de cada cultivo a otro tubo de 10 mm x 75 mm y conservarlo para la prueba de termonucleasa. El resto del cultivo se usa para la prueba de coagulasa.

9.13 Prueba de coagulasa

9.13.1 Agregar a los 0,2 ml del cultivo anterior, 0,2 ml de plasma de conejo diluido volumen a volumen con solución salina estéril.

9.13.2 Incubar en baño de agua de 35 a 37°C y observar durante 6 h a intervalos de 1 h; si no hay formación de coágulo, observar a las 24 h. Considerar positiva la prueba si hay formación de coágulo. Para comprobar la coagulabilidad del plasma de conejo se añade una gota de cloruro de calcio al 5% a 0,5 ml de plasma reconstituido empleado, formándose un coágulo en 10-15 seg.

9.14 Prueba de termonucleasa

9.14.1 Calentar durante 15 min, 0,3 ml de cultivo en caldo de infusión cerebro-corazón en baño de agua hirviendo.

9.14.2 Pasar una gota de cada cultivo por medio de una pipeta Pasteur a un orificio del medio, incluye testigo.

9.14.3 Incubar a 35°C en cámara húmeda de 4 a 24 h.

9.14.4 La aparición de un halo color rosa extendido de por lo menos 1 mm alrededor de la perforación se califica como positiva.

10. Cálculo y expresión de resultados

10.1 Cálculo

Hacer el cálculo del contenido de microorganismos en el producto tomando en cuenta el número de colonias totales, el número de colonias confirmadas, la dilución y el volumen inoculado (0,1 ml).

Ejemplo 1:

Si la caja tiene 80 colonias en la dilución 1:1000

Se toman 5 colonias para la prueba, de éstas dan 4 positivas, el cálculo es:

$$80 \times 4 = 64 \times 1000 \times 10 = 640\ 000$$

5

Ejemplo 2:

Si la caja tiene 14 colonias en la dilución 1:10

Se toman 3 colonias para la prueba, de éstas dan 2 positivas, el cálculo es:

$$14 \times 2 = 9,3 \times 10 \times 10 = 930$$

3

10.2 Expresión de los resultados:

Según ejemplo 1:

Informar como *Staphylococcus aureus* 640 000 UFC/g

Según ejemplo 2:

Informar como *Staphylococcus aureus* 930 UFC/g valor estimado

Si las pruebas confirmativas resultan negativas en todas las colonias probadas, informar como:

0 UFC/g en muestras directas

-10 UFC/g en muestras de dilución 1:10

-100 UFC/g en muestras de dilución 1:100

En la práctica los resultados pueden variar, esto dependerá del técnico que trabaje el método y el grado de confiabilidad del mismo, que en el 95% de los casos es de $\pm 16\%$ a $\pm 52\%$.

11. Concordancia con normas internacionales

Esta norma no tiene concordancia con normas internacionales.

12. Bibliografía

12.1 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1992. Ley Federal sobre Metrología y Normalización. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.

12.2 Secretaría de Salud. 1988. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.

12.3 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1993. NOM-008-SCFI-1993 Sistema General de Unidades de Medida. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.

12.4 Food and Drug Administration. 1978. Bacteriological Analytical Manual. 6th ed. Cap. XI p.p 4-5.

12.5 Koneman E./Stephen D. Diagnóstico Microbiológico. 3ra. ed. Editorial Médica Panamericana Uruguay. p.p. 295

12.6 Secretaría de Salud. Manual para la determinación de *Staphylococcus aureus*. Laboratorio Nacional de Salud Pública. México, D.F. p.p. 12-14 y 26-28.

12.7 NORMA ISO. 6888. 1983. General Guidance for the Enumeration of *Staphylococcus aureus*-Colony Count Technique. International Organization for Standardization

12.8 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1981 NORMA-Z-013/02. Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas. México, D.F.

12.9 Poelman L.P./Silleker H.J. 1984. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. *Staphylococcus aureus*. 2nd ed. Ed. American Public Health Association. Washington, D.C.

13. Observancia de la Norma

La vigilancia del cumplimiento de la presente norma corresponde a la Secretaría de Salud.

14. Vigencia

La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor con su carácter de obligatoria a partir de los treinta días siguientes a su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 10 de mayo de 1995.- El Director General, José Meljem Moctezuma.- Rúbrica.

Anexo 9: NMX-F-083-1986. ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS. FOODS. MOISTURE IN FOOD PRODUCTS DETERMINATION. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS.

PREFACIO

En la elaboración de esta Norma participaron las siguientes Organismos:

Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos.

Dirección General del Fomento Ganadero.

Cámara de Productos Alimenticios Elaborados con Leche. Compañía Nestlé, S.A. de C.V.

Leche Industrializada CONASUPO S.A.

Productos de Leche del Bajío S. A.

Carnation de México, S. A. de C. V.

Kem Fuds, S.A.

1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta Norma establece el método para determinar la humedad en productos alimenticios con rango de secado de 95° a 105°C.

2. REFERENCIAS

Esta Norma se complementa con la Norma Mexicana en vigor siguiente: NMX-BB-014 Clasificación y tamaños nominales para utensilios de vidrio usados en laboratorio.

3. DEFINICIÓN

Para los efectos de esta Norma, se entiende por humedad, la pérdida en peso que sufre un alimento un alimento al someterlo a las condiciones de tiempo y temperatura prescritos.

4 APARATOS Y EQUIPO

Balanza con sensibilidad de 0.1 mg

Cápsulas con tapa de 5, 8 ó 10 cm de diámetro

Horno o estufa eléctrica con control de temperatura

Desecador

Pinzas para crisol

Material común de laboratorio.

5. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La preparación y conservación de las muestras se indica en la Norma correspondiente (ver 9.1).

6. PROCEDIMIENTO

Pesar una cantidad de muestra conveniente en la cápsula previamente tarada; colocar la cápsula y la tapa en la estufa y mantener la temperatura adecuada al producto, durante el tiempo que sea conveniente (ver 9.2).

Tapar la cápsula y transferirlas al desecador; dejar enfriar a la temperatura ambiente y pesar. Repetir el procedimiento indicado hasta obtener peso constante.

7 CÁLCULOS

$$\% \text{ en Humedad} = \frac{(P - P1) \times 100}{P2}$$

En donde:

P = Peso del recipiente con la muestra húmeda, en gramos. P1 = Peso del recipiente con la muestra seca. P2 = Peso de la muestra en gramos.

7.1 Repetibilidad

La diferencia máxima permisible entre dos determinaciones, como mínimo, efectuadas por el mismo analista con el mismo equipo y la misma muestra no debe ser mayor de 0.1%, en caso contrario repetir la determinación.

8 BIBLIOGRAFÍA

NMX-Z-013-1977. Norma Mexicana. "Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Mexicanas" Secretaría de Patrimonio y Fomento Industrial.

Secretaría de Salud – Manual de técnicas para el análisis fisicoquímico. Dirección General de Investigación en Salud Pública (1975).

9. APÉNDICE

9.1 La cantidad de muestra empleada en esta prueba, será la señalada en la Norma del producto correspondiente.

9.2 El tiempo y la temperatura se indican en la Norma del producto correspondiente.

10. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

No se puede establecer concordancia por no existir referencia al momento de la elaboración de la presente.

Esta Norma cancela a la: NMX-F-083, NMX-F-102, NMX-F-105-1970.

Anexo 11: NMX-F-094-1984. ALIMENTOS. LÁCTEOS. DETERMINACIÓN DE CENIZAS EN QUESOS. FOODS LACTEOUS. CHEESE ASHES DETERMINATION. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS.

PREFACIO

En la elaboración de la presente Norma, participaron los siguientes Organismos:

Cámara de Productos Alimenticios Elaborados con Leche. Industrias Alimenticias Club, S.A. Cremería Chalco, S.A. Kraft Foods de México, S.A. de C.V. Productos de Leche Noche Buena, S.A. Productos de Leche, S.A. Quesos La Capercucita, S.A.

1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta Norma Mexicana establece el procedimiento para la determinación de cenizas en los quesos.

2. REACTIVOS Y MATERIALES

Material común de laboratorio.

3. APARATOS Y EQUIPO

- Balanza analítica con sensibilidad de 0.001 g.
- Mufla con pirómetro y regulador de temperatura.
- Desecador.
- Crisol de porcelana.
- Cánula o cañuela.

4. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se toma una muestra por medio de una cánula o cañuela especial, introduciéndola hasta el centro de la pieza y de esta muestra se toman las cantidades necesarias para el análisis.

5. PROCEDIMIENTO

En un crisol tarado, a peso constante, se colocan 3 gramos de la muestra comprimiéndolos lo máximo, se calienta el crisol en un mechero hasta que la materia se calcine, a continuación se pasa a la mufla por 2 horas a 823 K (550°C), una vez concluido el tiempo, se pasa al desecador para que enfríe y cuando está a temperatura ambiente se pesa.

6. CÁLCULOS Y RESULTADOS

La cantidad de cenizas se calcula de la siguiente forma:

$$C = \frac{(P1 - P2) \times 100}{P}$$

C = Contenido de cenizas en por ciento. P1 = Peso del crisol más muestra en gramos. P2 = Peso del crisol más cenizas en gramos. P = Peso de la muestra en gramos.

7. REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

La diferencia máxima permisible para la determinación efectuada por duplicado, no debe ser mayor de 0.5 % en caso contrario repetir las determinaciones.

8. BIBLIOGRAFÍA

Woodman. Análisis de Alimentos. 4ª Edición, 1959. IRAM 14014. Método de determinación de la humedad y residuo seco. NMX-Z-13-1977. Guía para la redacción estructuración y presentación de las Normas Mexicanas.

Anexo 11: DETERMINACIÓN DE NaCl EN QUESO FRESCO NMX-F-360-S-1981. ALIMENTOS PARA HUMANOS. DETERMINACIÓN DE CLORUROS COMO CLORURO DE SODIO (MÉTODO DE VOLHARD). FOODS FOR HUMANS. DETERMINATION OF CHLORIDES AS SODIUM CHLORIDE (VOLHARD METHOD). NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS.

PREFACIO

En la elaboración de esta Norma participaron los siguientes Organismos:

Subsecretaría de Salubridad.

Dirección General de Laboratorios de Salud Pública.

Ernesto Ibarra y Cía., S.A.

1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

La presente Norma Mexicana establece el procedimiento para la determinación de cloruros, expresados como cloruro de sodio, por el método de Volhard.

2. REFERENCIAS

Esta Norma se complementa con la siguiente Norma Mexicana vigente: NMX-F-066-S Alimentos para humanos - Determinación de cenizas. (Determinación de cenizas en alimentos).

3. FUNDAMENTO

Se basa en la determinación indirecta para cloruros, en que se añade un exceso de nitrato de plata con respecto a la cantidad de cloruros presente. El exceso de ion plata se valora por retroceso con solución de tiocianato de potasio o amonio y sulfato férrico como indicador según el método de Volhard.

4. REACTIVOS Y MATERIALES

4.1 Reactivos

Los reactivos que a continuación se indican deben ser grado analítico; cuando se mencione agua debe entenderse agua destilada.

4.1.1 Solución de nitrato de plata (AgNO_3), 0.1 N.

4.1.2 Solución de tiocianato de potasio o de amonio (KCNS o NH_4CNS), 0.1N.

4.1.3 Solución indicadora-sulfato férrico amónico $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.

4.1.4 Acido nítrico 6N.

4.2 Materiales

4.2.1 Pipetas volumétricas de 5 cm

4.2.2 Buretas de 50 cm

4.2.3 Matracas Erlenmeyer de 250 cm

4.2.4 Material común de laboratorio.

5. APARATOS

5.1 Balanza analítica con ± 0.1 mg de sensibilidad.

5.2 Placa caliente o baño de arena.

6. MUESTRAS

6.1 A una muestra seca de 5 g determinarle cenizas totales, aplicando la NMX-F-066-S (véase 2).

6.2 Disolver las cenizas en ácido nítrico, filtrar, lavar y recibir en un matraz Erlenmeyer de 250 cm con agua.

NOTA: En algunos productos puede no ser necesario partir de las cenizas, sino que podrán usarse directamente.

7. PROCEDIMIENTO

7.1 A la muestra preparada en 6.2 agregarle solución de nitrato de plata con un ligero exceso conocido.

7.2 A la combinación de los filtrados y lavados adicionar 5 cm del indicador sulfato férrico amónico y pocos cm de ácido nítrico.

7.3 Titular el exceso de plata con solución de tiocianato de potasio o de amonio 0.1 N, hasta la aparición de un color café claro que sea permanente y detectable.

7.4 Hacer un ensayo en blanco, siguiendo el procedimiento descrito en 7.1, 7.2 y 7.3, excluyendo la muestra.

8. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Se calcula el por ciento de cloruros como cloruro de sodio, mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ NaCl} = \frac{(A - B) N \times 0.0585}{M} \times 100$$

Donde:

A = cm de solución de nitrato de plata 0.1 N agregada en exceso.

B = cm de solución de tiocianato de potasio o de amonio 0.1N, empleados en titular el exceso de nitrato de plata.

N = Normalidad del tiocianato de potasio o de amonio.

M = Peso de la muestra en gramos.

0.0585 = Miliequivalente del cloruro de sodio.

9. BIBLIOGRAFÍA.

Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists

William Horwitz, Editor. Twelfth Edition, 1975 Chapter 3 Parts. 3.067, 3.068 Y 3.070.

Anexo 12: DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno combinado u orgánico actúa como fuente de reserva y formas solubles. La determinación de este nitrógeno incluye la descomposición total de los compuestos orgánicos mediante una digestión con ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado y catalizadores para formar sulfato de amonio (NH_4SO_4) el cual posteriormente desprende el amoniaco (NH_4) con la adición del hidróxido de sodio (NaOH); el amoniaco (NH_4) se recibe con ácido bórico (H_3BO_3) y se titula con ácido clorhídrico valorado (HCl 0.1 N).

OBJETIVOS

Determinar el nitrógeno total de las muestras a analizar.

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

$$\%N = \frac{(14.01)(ml\ s - ml\ bco)(N\ HCl)}{(wm)(10)}$$

En donde:

14.01 = miliequiva lente.

ml s = mililitros gastados en la titulación de la muestra.

ml bco = mililitros gastados en la titulación del blanco.

N HCl = normalidad exacta del ácido clorhídrico.

wm = peso de la muestra en gramos.

MATERIALES

Ácido sulfúrico concentrado

Pastillas catalizadoras

Hidróxido de sodio al 40% (Tecator) 32% Buchi

Ácido bórico al 4%

Ácido clorhídrico 0.5 N. 0.1N.

Indicador verde de bromocresol - rojo de metilo

Matraz erlenmeyer

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES:

1. Hidróxido de sodio al 40%: con mucho cuidado pesar 2.0 Kg. de hidróxido de sodio y pasarlo a un recipiente de aproximadamente 6 Lts., disolver el hidróxido de sodio con 3.0 Lts. de agua desionizada; tener cuidado al agregar el agua porque se produce una reacción exotérmica.
2. Ácido Bórico al 4%: pesar 40 g de ácido bórico y disolver con 960 ml de agua desionizada.
3. Indicador verde de bromocresol – rojo de metilo: disolver 0.1 g de rojo de metilo en 100 ml de metanol, a parte disolver 0.07 g de rojo de metilo en 70 ml de metanol.
4. Mezclar las dos soluciones

APARATOS E INSTRUMENTOS

Balanza analítica

Tubo para digestión.

PROCEDIMIENTO

1. Pesar en balanza analítica 0.25 g de muestras previamente molida (pesarla en papel copia), anotar el peso exacto.
2. Envolver la muestra en el papel para evitar la pérdida de muestra y colocarlo en un tubo para digestión.
3. Agregar al tubo 1 pastilla catalizadoras y 12 ml de ácido sulfúrico concentrado; colocar el tubo digestor previamente calentado (a 420°C), durante 30 minutos.
4. Sacar el tubo del digestor y dejarlo enfriar de 20 a 30 minutos.
5. Adicionar 75 ml de agua y 70 ml de hidróxido de sodio al 40% y colocarlo en el destilador.
6. En un matraz Erlenmeyer agregar 30 ml de ácido bórico al 4% y 5 gotas de indicador verde de bromocresol – rojo de metilo; ahí recibiremos el destilado durante 5 minutos.
7. Sacar el matraz titular con ácido clorhídrico 0.1 N (verde a rosa claro).
8. Tratar una muestra en blanco para las correcciones necesarias.

REFERENCIAS

Van Soest and Wine (1967).

Anexo 13: NMX-F-100-1984. ALIMENTOS. LÁCTEOS. DETERMINACIÓN DE GRASA BUTÍRICA EN QUESOS. FOODS. LACTEOUS. CHEESE BUTTER FAT DETERMINATION. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS.

PREFACIO

En la elaboración de la presente Norma, participaron los siguientes Organismos:

Cámara de Productos Alimenticios Elaborados con Leche.

Industrias Alimenticias Club, S.A.

Cremería Chalco, S.A.

Kraft Foods de México, S.A. de C.V.

Productos de Leche Noche Buena, S.A.

Productos de Leche, S.A.

Quesos Caperucita, S.A.

1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta Norma Mexicana establece el procedimiento para determinar la grasa butírica en quesos por el método de Gerber-Van Gulik.

2. FUNDAMENTO

Este método se basa en la digestión parcial de los componentes del queso, excepto la grasa, en ácido sulfúrico. Emplea alcohol isoamílico para ayudar a disminuir la tensión en la interfase entre la grasa y la mezcla en reacción (ácido sulfúrico-leche), lo que facilita el ascenso de los glóbulos pequeños de grasa por centrifugación. El alcohol isoamílico reacciona con el ácido sulfúrico formando un éster que es completamente soluble en dicho ácido.

3. REACTIVOS Y MATERIALES

3.1 Reactivos

3.1.1 Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico, cuando se indique agua, debe entenderse agua destilada.

Ácido sulfúrico concentrado de densidad 1.530 a 288 K (15°C).

Alcohol isoamílico o amílico libre de grasa y de densidad 0.88 a 288 K (15°C).

Nota: Tanto el ácido sulfúrico como el alcohol isoamílico deben someterse a una prueba en blanco antes de usarse.

3.2 Materiales

Embudo con llave de paso para liberar 1.0 cm
Embudo con llave de paso para liberar 10.0 cm
Butirómetro de Gerber-Van Gulik para quesos
Tapones para butirómetro
Tapa perforada para queso
Material común de laboratorio

4. APARATOS Y EQUIPO

Centrífuga para butirómetro Gerber
Baño de agua que pueda mantener la temperatura regulable de $338\text{ K} \pm 1\text{ K}$ ($65^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$).

5. PROCEDIMIENTO

- 5.1 Pesar directamente en la copa fijada en el tapón del butirómetro $3\text{ g} \pm 0.001\text{ g}$ de queso.
- 5.2 Meter la copa con la muestra de queso dentro del butirómetro.
- 5.3 Por la abertura superior, agregar el butirómetro 10 cm de ácido sulfúrico de tal manera que recubra todo el queso.
- 5.4 Tapar la abertura y colocarlo en baño de agua a 338 K (65°C) por 30 minutos, agitar cuidadosamente 2 o 3 veces durante ese lapso, para disolver todas las partículas de queso.
- 5.5 Agregar 1 cm de alcohol isoamílico o amílico y agitar.
- 5.6 Terminar de llenar el butirómetro con ácido sulfúrico, hasta que el volumen llegue aproximadamente tres cuartas partes de la columna graduada.
- 5.7 Tapar la abertura superior y volver a meterlo al baño de agua por 5 minutos.
- 5.8 Mezclarlo antes de centrifugar a 1,200 r.p.m., durante 5 minutos.
- 5.9 Volver a meter el butirómetro al baño de agua y dejarlo ahí 10 minutos.
- 5.10 Hacer la lectura llevando la base de la columna de grasa exactamente al cero, por medio de presión en el tapón del butirómetro.

6. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

La lectura observada en la escala indica directamente la cantidad en por ciento de la grasa contenida en el queso.

7. BIBLIOGRAFÍA

Ramos, Córdova M. Manual de métodos de análisis de leche y lacticios. México, D.F. 1976.

Rosell, J. Ma. Manual de análisis lactológicos y fabricación de quesos y mantecas. Ed. Trofos, España, 1960.

Gerber N., Schneider K. Tratado práctico de los análisis de la leche y del control de los productos lácteos. Ed. Dossat, S.A. Madrid, 1960.

NMX-Z-013-1977. Guía para la redacción, estructuración y presentación de las Normas Mexicanas.

ANEXO 14: PROCEDIMIENTO PARA EXTRACCIÓN DE ADN

Thermo Scientific GeneJet Genomic DNA Purification Kit

- Buffer de lisis:

200mM Tris-HCl (ph 8.0)

2mM EDTA

1.2% Triton X-100

Lisozima 20 mg/mL agregar inmediatamente antes de usarse.

1. Colocar 2x10⁹ de células bacterianas en un tubo de 2 mL y centrifugar por 10 min a 5000x g. Desechar el sobrenadante.
2. Resuspender el pellet en 180 µL del buffer de lisis e incubarlo por 30 min a 37°C.
3. Agragar 200 µL de la solución de lisis y 20 µL de proteínasa K, mezclar con vortex obteniendo una suspensión uniforme.
4. Incubar la muestra a 56 °C, vortex ocasionalmente hasta que las células sean completamente lisadas (-30 min).
5. Agregar 20 µL de RNase A, mezclar con vortex e incubar a temperatura ambiente por 10 min.
6. Agregar 400 µL de etanol 50% y mezclar.
7. Transferir el lisado al tubo en columna del kit. Centrifugar por 1 min a 6000 x g.

Descartar el tubo de colección conteniendo el líquido y pasar la columna dentro de un tubo nuevo.

8. Agregar 500 µL de buffer lavado I (con el etanol agregado). Centrifugar por 1 min a 8000 x g.
9. Agregar 200 µL de buffer de elución en el centro de la membrana. Incubar por 2 min a temperatura ambiente y centrifugar por 1min a 8000 x g.