



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA  
SALUD ANIMAL

EVALUACIÓN DE LA SOBREVIVENCIA DE *Brucella melitensis* EN QUESOS  
DE CABRA DURANTE SU ELABORACIÓN Y MADURACIÓN

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

**KARLA YULIETT MÉNDEZ GONZÁLEZ**

Tutor: Jorge Francisco Monroy López  
Comité Tutorial: Francisco Suárez Güemes  
Ahidé López Merino

MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIAS

A mis papás por siempre apoyarme en todos los momentos más difíciles y por enseñarme que todo en la vida se puede lograr.

## AGRADECIMIENTOS

Al MVZ. MCV. Jorge Francisco Monroy López, por su apoyo durante mi formación académica. Gracias por brindarme su amistad.

Al Dr. Francisco Suárez Güemes, por apoyarme para la realización de este trabajo de investigación.

A la Dra. Ahidé López Merino, por sus comentarios y apoyo para la realización de ésta tesis.

A mi jurado Dra. Beatriz Arellano y al Dr. Efrén Díaz, por sus valiosos comentarios y tiempo.

A la Dra. Isabel Guerrero Legarreta, por brindarme el apoyo para la realización del presente trabajo de maestría.

A todo el personal del CEIPSA, por brindarme las facilidades del uso de sus instalaciones y en especial al Dr. Javier Gutiérrez Molotla.

Al Dr. Rigoberto Hernández Castro, por su valiosa colaboración para la realización de la parte experimental y por tenerme paciencia.

A los Doctores, compañeros y amigos del Departamento de Microbiología e Inmunología, Laboratorio de Tuberculosis y Brucelosis, por su linda amistad, convivencia y en especial a Lucy, Rosalia, Alma, Erika, Victor, Elhiú, Uzziel, Rigoberto, Dra. Irasema.

A mis amigas Paty, Yessy, Brenda, Oscar, Antonio, por siempre apoyarme y brindarme su amistad desde el inicio hasta el término de la carrera. Muchas gracias por todos los momentos de alegría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, por otorgarme la beca para la Maestría.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado, DGEP, por otorgarme la beca para la Maestría.

Al Proyecto de CONACYT – SEP 2003 – C02-45271, por los apoyos económicos.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## DECLARATORIA DE LA AUTORA

La autora da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que esta tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliográfico que estime conveniente.

MVZ KARLA YULIETT MÉNDEZ GONZÁLEZ

## ÍNDICE

RESUMEN .....	14
SUMMARY .....	15
I. INTRODUCCIÓN .....	16
1.1. Producción de leche caprina en México.....	19
1.1.2. Producción de quesos de cabra.....	21
1.1.2.1. Queso fresco de cabra tipo “panela”.....	21
1.1.2.2. Queso madurado de cabra .....	22
1.1.3. Información de la presencia de <i>Brucella</i> en alimentos .....	22
1.1.4. Información de brucelosis en humanos.....	23
1.1.5. JUSTIFICACIÓN .....	27
1.2. HIPÓTESIS .....	27
1.3. OBJETIVO GENERAL.....	27
1.3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
II. MATERIAL Y MÉTODOS .....	28
2.1. Unidad de análisis.....	28
2.2. Material para la toma de la leche de cabra .....	28
2.3. Proceso de elaboración del queso fresco.....	29
2.3.1. Queso sin inocular.....	29
2.3.2. Queso inoculado con <i>B. melitensis</i> .....	30
2.4. Proceso de elaboración del queso semi-madurado a 24°C .....	30
2.4.1. Queso sin inocular.....	31
2.4.2. Queso inoculado con la cepa 16M de <i>B. melitensis</i> .....	32
2.5. Proceso de elaboración del queso semi-madurado a 24°C en condiciones controladas o leche previa pasteurización .....	33
2.5.1. Procedimiento para la detección de fosfatasa en leche .....	34
2.5.2. Queso sin inocular.....	34
2.5.3. Queso inoculado con la cepa 16M de <i>B. melitensis</i> .....	35

2.6. Proceso de elaboración del queso semi-madurado a 4°C .....	36
2.6.1. Queso sin inocular.....	37
2.6.2. Queso inoculado con la cepa 16M de <i>B. melitensis</i> .....	37
2.7. Determinación de hongos y levaduras.....	38
2.8. Preparación de las unidades de muestras para los análisis fisicoquímicos .....	39
2.8.1. Procedimiento para los análisis fisicoquímicos.....	39
2.8.2. Determinación del pH .....	39
2.8.3. Determinación del $a_w$ .....	39
2.9. Procedimiento para el cultivo bacteriológico.....	39
2.9.1. Preparación del inóculo .....	39
2.9.2. Preparación de la solución reguladora de fosfatos .....	40
2.9.3. Medio de cultivo.....	40
2.9.4. Preparación de las muestras para siembra .....	40
2.10. Siembra en medio de cultivo .....	41
2.10.1. Siembra en medio Farell .....	41
2.10.2. Incubación .....	41
2.10.3. Lectura de resultados de los cultivos realizados .....	41
2.11. Evaluación del queso madurado de cabra tomado de un centro comercial.....	41
2.12. Procedimiento para el análisis de los Puntos Críticos de Control .....	41
2.13. Análisis Estadístico.....	44
2.13.1. Variables a analizar.....	44
III. RESULTADOS.....	45
3.1. Queso fresco tipo “panela” .....	45
3.1.1. Correlación entre la $a_w$ con la sobrevivencia de <i>B. melitensis</i> .....	47
3.1.2. Correlación entre el pH con la sobrevivencia de <i>B. melitensis</i> .....	47

3.1.3. Correlación entre el tiempo de elaboración con la sobrevivencia de <i>B. melitensis</i> .....	47
3.1.4. Correlación entre el tiempo de elaboración con la $a_w$ del queso fresco	48
3.1.5. Correlación entre el tiempo de elaboración con el pH del queso fresco .....	49
3.1.6. Correlación entre el aislamiento de levaduras y miceliados .....	49
3.2. Queso semi-madurado a 24°C.....	51
3.2.1. Correlación entre la $a_w$ con la sobrevivencia de <i>B. melitensis</i> .....	54
3.2.2. Correlación entre el pH con la sobrevivencia de <i>B. melitensis</i> .....	54
3.2.5. Correlación entre el tiempo de maduración con la sobrevivencia de <i>B. melitensis</i> .....	55
3.2.4. Correlación entre el tiempo de maduración con la $a_w$ del queso semi-madurado a 24°C .....	56
3.2.5. Correlación entre el tiempo de maduración con el pH del queso semi-madurado a 24°C .....	56
3.2.6. Correlación entre el aislamiento de levaduras y miceliados .....	57
3.3. Queso semi-madurado a 24°C (con leche previamente pasteurizada o condiciones controladas) .....	58
3.3.1. Correlación entre la $a_w$ con la sobrevivencia de <i>B. melitensis</i> .....	61
3.3.2. Correlación entre la pH con la sobrevivencia de <i>B. melitensis</i> .....	61
3.3.3. Correlación entre el tiempo de maduración con la sobrevivencia de <i>B. melitensis</i> .....	61
3.3.4. Correlación entre el tiempo de maduración con la $a_w$ del queso semi-madurado .....	62
3.3.5. Correlación entre el tiempo de maduración con el pH del queso semi-madurado .....	62
3.3.6. Correlación entre la presencia de levaduras y miceliados.....	63
3.4. Queso semi-madurado a 4°C.....	65
3.4.1. Correlación entre la $a_w$ con la sobrevivencia de <i>B. melitensis</i> .....	68
3.4.2. Correlación entre el pH con la sobrevivencia de <i>B. melitensis</i> .....	68
3.4.3. Correlación entre el tiempo de maduración con la sobrevivencia de <i>B. melitensis</i> .....	68

3.4.4. Correlación entre el tiempo de maduración con la $a_w$ del queso semi-madurado .....	69
3.4.5. Correlación entre el tiempo de maduración con el pH del queso semi-madurado .....	69
3.4.6. Correlación entre la presencia de levaduras y miceliados.....	70
3.5. Análisis del HACCP en los diferentes quesos .....	71
IV. DISCUSIÓN .....	76
4.1. Efecto del tiempo de maduración en los quesos semi-madurados .....	76
4.2. Efecto de la actividad de agua con la sobrevivencia de <i>B. melitensis</i> ...	77
4.3. Efecto del pH con la sobrevivencia de <i>B. melitensis</i> .....	79
4.4. Efecto de los miceliados y levaduras en la sobrevivencia de <i>B. melitensis</i> .....	79
4.5. Temperatura de almacenamiento de los quesos semi-madurados .....	80
4.6. Aplicaciones del suero del subproducto de los quesos .....	80
V. CONCLUSIONES.....	82
VI. REFERENCIAS.....	84

## LISTA DE CUADROS

CUADRO 1. Sobrevivencia de <i>Brucella melitensis</i> durante la elaboración del queso fresco tipo “panela”.....	45
CUADRO 2. Aislamiento de levaduras y miceliados durante la elaboración del queso fresco. ....	45
CUADRO 3. Sobrevivencia de <i>Brucella melitensis</i> en los subproductos del queso fresco. ....	47
CUADRO 4. Aislamiento de levaduras y miceliados en los subproductos del queso fresco. ....	47
CUADRO 5. Coeficiente de correlación de Spearman en el queso fresco tipo “panela”.....	50
CUADRO 6. Sobrevivencia de <i>Brucella melitensis</i> durante la elaboración del semi-madurado a 24°C.....	51
CUADRO 7. Aislamiento de levaduras y miceliados durante la elaboración del queso semi-madurado a 24°C.....	52
CUADRO 8. Sobrevivencia de <i>Brucella melitensis</i> en los subproductos del queso semi-madurado a 24°C.....	53
CUADRO 9. Aislamiento de levaduras y miceliados en los subproductos del queso semi-madurado a 24°C.....	54
CUADRO 10. Coeficiente de correlación de Spearman en el queso semi-madurado a 24°C.....	57
CUADRO 11. Sobrevivencia de <i>Brucella melitensis</i> durante la elaboración del queso semi-madurado a 24°C (en condiciones controladas). ....	58
CUADRO 12. Aislamiento de levaduras y miceliados los subproductos del queso semi-madurado a 24° (condiciones controladas). ....	59
CUADRO 13. Sobrevivencia de los subproductos del queso semi-madurado (en condiciones controladas).....	60
CUADRO 14. Aislamiento de levaduras y miceliados en los subproductos del queso semi-madurado a 24°C (en condiciones controladas). ....	61
CUADRO 15. Coeficiente de correlación de Spearman en el queso semi-madurado a 24°C (condiciones controladas).....	64
CUADRO 16. Sobrevivencia de <i>Brucella melitensis</i> durante la elaboración del semi-madurado a 4°C. ....	65

CUADRO 17. Aislamiento de levaduras y miceliados los subproductos del queso semi-madurado a 4°C.....	66
CUADRO 18. Sobrevivencia de los subproductos del queso semi-madurado a 4°C. ....	67
CUADRO 19. Aislamiento de levaduras y miceliados en los subproductos del queso semi-madurado a 4°C.....	67
CUADRO 20. Coeficiente de correlación de Spearman en el queso semi-madurado a 4°C.....	70
CUADRO 21. Hoja de análisis de peligros del queso fresco.....	71
CUADRO 22. Respuestas al árbol de decisiones del queso fresco.....	71
CUADRO 23. Hoja de análisis de peligros del queso semi-madurado a 24°C. ....	72
CUADRO 24. Respuestas al árbol de decisiones del queso semi-madurado a 24° C.....	73
CUADRO 25. Hoja de análisis de peligros del queso semi-madurado a 4°C	74
CUADRO 26. Respuestas al árbol de decisiones del queso semi-madurado a 4° C.....	75

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Producción de leche de cabra en México (Fuente: SIAP SAGARPA, 2006).....	20
FIGURA 2. Porcentaje estatal de la producción Nacional de leche de cabra en 2006 (Fuente: SIAP SAGARPA, 2006).....	20
FIGURA 3 . Total de casos de brucelosis en humano por grupo de edad de 2000-2005 (Fuente: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/ Dirección General de Epidemiología SSA, 2006).....	23
FIGURA 4. Número de casos totales de brucelosis en humanos en 2005 notificados por las principales fuentes institucionales (Fuente: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/ Dirección General de Epidemiología SSA, 2006).....	24
FIGURA 5. Número de casos de brucelosis en humanos por estados de la República Mexicana en el 2005 (Fuente: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/ Dirección General de Epidemiología SSA, 2006). .....	25
FIGURA 6. Número de casos de brucelosis humana en la República Mexicana por mes del 2005 (Fuente: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/ Dirección General de Epidemiología SSA, 2006). .....	26
FIGURA 7. Elaboración del queso fresco de cabra tipo “panela”.....	30
FIGURA 8. Elaboración del queso semi-madurado a 24°C. ....	32
FIGURA 9. Elaboración del queso semi-madurado a 24°C en condiciones controladas. ....	36
FIGURA 10. Elaboración del queso semi-madurado a 4°C. ....	38
FIGURA 11. Árbol de decisiones. ....	43
FIGURA 12. Valores del $a_w$ en las diferentes etapas de elaboración del queso fresco tipo “panela”.....	46
FIGURA 13. Valores del pH en las diferentes etapas de elaboración del queso fresco tipo “panela”.....	46
FIGURA 14. Sobrevivencia de <i>B. melitensis</i> en queso fresco.....	48
FIGURA 15. Sobrevivencia de <i>B. melitensis</i> en queso fresco.....	49
FIGURA 16. Sobrevivencia de <i>B. melitensis</i> con relación de las diferentes etapas de elaboración del queso semi-madurado 24°C. ....	52
FIGURA 17. Valores del pH con respecto a las diferentes etapas de elaboración del queso semi-madurado a 24°C.....	53

FIGURA 18. Supervivencia de <i>B. melitensis</i> en queso semi-madurado a 24°C. .....	55
FIGURA 19. Supervivencia de <i>B. melitensis</i> en queso semi-madurado a 24°C. .....	56
FIGURA 20. Valores de $a_w$ en las diferentes etapas de elaboraci3n del queso semi-madurado a 24°C (en condiciones controladas). ....	59
FIGURA 21. Valores del pH en las diferentes etapas de elaboraci3n del queso semi-madurado a 24°C (en condiciones controladas). ....	60
FIGURA 22. Supervivencia de <i>B. melitensis</i> en queso semi-madurado a 24°C con leche previamente pasteurizada.....	62
FIGURA 23. Supervivencia de <i>B. melitensis</i> en queso semi-madurado a 24°C con leche previamente pasteurizada.....	63
FIGURA 24. Valores de $a_w$ en las diferentes etapas de elaboraci3n del queso semi-madurado a 4°C.....	66
FIGURA 25. Valores del pH en los subproductos del queso semi-madurado a 4°C. ....	67
FIGURA 26. Supervivencia de <i>B. melitensis</i> en queso semi-madurado a 4°C. .....	68
FIGURA 27. Supervivencia de <i>B. melitensis</i> en queso semi-madurado a 4°C. .....	69

## RESUMEN

**Karla Yuliett Méndez González.** “Evaluación de la sobrevivencia de *Brucella melitensis* en quesos de cabra durante su elaboración y maduración”. Bajo la dirección del MVZ. MCV. Jorge Francisco Monroy López, Dr. Francisco Suárez Güemes y Dra. Ahidé López Merino.

El objetivo de este trabajo es evaluar la sobrevivencia y viabilidad con la cepa 16M de *Brucella melitensis* en quesos de cabra inoculados, durante su elaboración y maduración. Se trabajó con leche de cabra y se elaboraron quesos frescos sin pasteurizar y queso semi-madurado a 24°C con leche pasteurizado y no pasteurizado y quesos semi-madurados a 4°C sin leche pasteurizada. Posteriormente se identificaron las siguientes etapas del queso fresco: leche, templado 24°C, cuajo, corte y desuerado; en el caso del queso semi-madurado se dividieron en las siguientes etapas: templado, incubación, corte, desuerado, inmersión en salmuera, maduración I (5 días), maduración II (15 días), maduración III (30 días). Se formaron dos lotes, el primero constituido por el queso fresco y queso semi-madurado inoculado con la cepa 16M de *Brucella melitensis*, la inoculación se realizó a partir de la etapa del templado; en el segundo lote se incluyó el queso fresco y semi-madurado no inoculado con la cepa 16M de *B. melitensis*. En el primer lote se aisló *B. melitensis*, en el segundo lote se determinó la presencia de hongos y levaduras de acuerdo a la NOM -111-SSA-1994 (Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos),  $a_w$ , pH, de cada etapa. En el primer lote del queso fresco se aisló *B. melitensis* hasta la etapa de desuerado en una concentración de  $1 \times 10^6$  ufc/g, sin embargo en el queso semi-madurado a 24°C con leche previamente pasteurizada solo se aisló  $3 \times 10^4$  ufc/g de *B. melitensis* en la etapa del corte, en las demás etapas no se observó desarrollo de la bacteria; en el queso semi-madurado a 24°C donde la leche no fue previamente pasteurizada, si hubo aislamiento de *B. melitensis* ( $1 \times 10^4$  ufc/g) a los 15 días de maduración y en el queso semi-madurado a 4°C fue de  $1 \times 10^3$  ufc/g a los 30 días de maduración. En el queso fresco se encontró un  $a_w$  de 0.969 y un pH de 6, mientras que el queso semi-madurado a 24°C con leche no pasteurizada presentó un  $a_w$  de 0.8999 y un pH de 4.0, en el queso semi-madurado a 24°C con leche pasteurizada a los 30 días de maduración presentó una  $a_w$  de 0.527 y un pH de 5 y en el queso semi-madurado a 4°C presentó un  $a_w$  de 0.9 y un pH de 5.0. De acuerdo a los resultados obtenidos se demuestra que la actividad de agua y el tiempo de maduración tiene un efecto sobre la sobrevivencia de *B. melitensis*.

Palabras claves: *Brucella melitensis*, actividad del agua, salmuera, quesos.

## SUMMARY

**Karla Yuliett Méndez González.** “*Brucella melitensis* survival in fresh and ripe goat cheese”. Bajo la dirección del MVZ. MCV. Jorge Francisco Monroy López, Dr. Francisco Suárez Güemes y Dra. Ahidé López Merino.

The aim of this study was to evaluate the *B. melitensis* survival and viability when inoculated in ripe and fresh goat cheeses at different stages of the ripening process. The stages for fresh cheese were established as follows milk reception, milk at 24°C, curd cheese, cutting, serum elimination and cheese as final product. The ripe cheese process was divided as following stages: milk at 24°C, incubation, cutting, immersion in brine, ripening I (5 days), ripening II (15 days) and ripening III (30 days). There were two different cheeses batches; in the first one *B. melitensis* was inoculated in the goat milk, which was used to elaborate ripe goat cheeses at 4°C (39.2°F) and 24°C (75.2°F) with raw and pasteurized milk. In the second batch presence of fungi and yeast were evaluated in each stage, as well as the  $a_w$  and pH. In the fresh cheese as final product *B. melitensis* growth in a concentration of  $1 \times 10^6$  cfu/g in contrast, in the cutting stage of ripe cheese at 24°C with pasteurized milk *B. melitensis* was isolated in a concentration of  $3 \times 10^4$  cfu/g. No bacterium growth was registered in the other stages. In ripe cheese at 4°C (ripening III) *B. melitensis* was isolated ( $1 \times 10^3$  cfu/g), as well as in ripe cheese elaborated with raw milk at 24°C ( $1 \times 10^4$  cfu/g). The fresh cheese had an  $a_w$  of 0.969 and a pH of 6, while ripe cheese at 24°C with pasteurized milk (ripening III) had an  $a_w$  of 0.527 and pH of 5. This study demonstrated that the water activity and the ripening time, affect *Brucella melitensis* development and survival in goat cheeses.

Keywords: *Brucella melitensis*, water activity, brine, cheeses, goat.

## I. INTRODUCCIÓN

Los quesos son un alimento que se ha consumido desde los tiempos más antiguos y que ha llegado hasta nuestros días. Los griegos lo consideraban como un producto muy apreciado y se incluía como ingrediente principal en alguna de las recetas más cotidianas. El primer queso que se conoce se elaboró en Mesopotamia (6000-7000 a.C), actual Irak; Tierra rica y fértil, situada entre los ríos Tigris y el Eufrates. Se fabricó con leche de vaca o cabra, que era el ganado que existía en esa zona. El descubrimiento del queso, fue de gran importancia, ya que era una manera de consumir un alimento altamente proteico y que se conservaba durante mucho tiempo. La cultura del queso les llegó a los romanos a través de su trato con los Griegos. Varro (116-27 a.C) hizo incluso comentarios de carácter nutricional, decía que el queso de vaca era más nutritivo que el de cabra, pero que éste era más digestivo y laxante. También se comenzó a considerar la higiene en la fabricación, así mismo Delgado en el 2004 menciona como diferentes autores escribieron verdaderos tratados sobre la coagulación, basándose en los coagulantes utilizados.

Los quesos son alimentos que contribuyen con una variedad y atractivo a nuestra dieta, los cuales han constituido una importante fuente de nutrientes para el hombre, en cualquier lugar en el que se críen animales productores de leche (ICMSF, 1998), siendo a menudo uno de los artículos básicos de la dieta elaborado en ocasiones bajo condiciones artesanales (Potter, 1984).

El queso se define como el producto elaborado con la cuajada de leche 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, puede o no ser prensada con o sin adición de fermentos de maduración mohos especiales, sales e ingredientes comestibles opcionales dando lugar a las diferentes variedades de queso pudiendo, por su proceso, ser: fresco, madurado o procesado (NOM-121-SSA, 1994).

La maduración a la que estos productos están sometidos, modifica el grado de lipólisis y proteólisis, estos procesos son influenciados por los cultivos iniciadores, los cuales están formados por microorganismos mesófilos como *Lactococcus lactis* subs. *cremoris* y *lactis* son bacterias formadoras de ácido, desdoblado por consiguiente la lactosa en ácido. *Leuconostoc lactis* y *mesenteroides* subs., *cremoris*) y termófilos como *Streptococcus salivarius* subs. *thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subs. *lactis*, utilizados en el proceso inicial de fermentación

de la leche, siendo determinantes para éste ya que utilizarán los ácidos grasos y los recursos nitrogenados para su metabolismo generando una gran cantidad de productos secundarios como aldehídos, alcoholes, ácidos orgánicos y compuestos aromáticos (Bonilla, 2005). La pasteurización de la leche reduce la actividad enzimática de estos microorganismos, impactando sobre el sabor y aroma del producto, en este caso es importante añadir cloruro cálcico al elaborar el queso para permitir la formación de puentes de calcio –salinos. Estos compuestos se generan en una red tridimensional, el conjunto adopta aspecto esponjoso y la leche se coagula. La leche cruda tiene una flora mixta que deriva de diversas fuentes (Scholz, 1997), así por ejemplo: la leche se retiene en el interior de la ubre merced a fuerzas capilares de la red de conductos galactóforos y el músculo esfínter en el extremo interior del canal del pezón. Durante el ordeño, el fenómeno hormonal junto con la presión que se aplica sobre el pezón fuerza a la leche a pasar a través del orificio del mismo, el cual puede ser una puerta de entrada de microorganismos al interior del pezón. La microbiota habitual de la ubre incluye estreptococos, estafilococos y micrococos (normalmente > 50 % de microorganismos), seguido de *Corynebacterium* spp., *Escherichia coli* (ICMSF, 1998).

El inconveniente para utilizar leche cruda de cabra para la elaboración de quesos es el peligro potencial de contener bacterias patógenas como *Brucella* las que perdurarán en el producto. Diversos factores influyen en la presencia y sobrevivencia de patógenos en el queso como son: su tolerancia al calor, la acidez de producto, la sal, el agua disponible ( $a_w$ ) y el número microorganismos que influyen en la capacidad de sobrevivir a las operaciones del proceso.

Las etapas del proceso de fabricación afectan también a la sobrevivencia de los patógenos. Entre los parámetros que adquieren importancia cabe destacar la temperatura de almacenamiento y proceso, la producción de ácidos por los cultivos iniciadores, la adición de sal y otros inhibidores y el proceso de maduración de los quesos (ICMSF, 1998).

Si se tiene presente la enorme cantidad de queso producida en el mundo, hay que concluir que este producto tiene un admirable historial respecto a su seguridad microbiológica. Sin embargo, ha sido el vehículo de ciertos brotes de enfermedades por ejemplo la brucelosis humana (ICMSF, 1998; Potter, 1984).

La brucelosis, es una zoonosis de distribución mundial. Es una enfermedad que primordialmente afecta a los animales y que, incidentalmente, se transmite al humano.

El género *Brucella* incluye diferentes especies importantes para la salud humana. *B. melitensis*, que comúnmente afecta a las cabras, es el agente responsable de la mayoría de los casos humanos diagnosticados bacteriológicamente (Velásquez, 1998).

Se estima que el 64% de los casos de brucelosis en humanos es transmitido por ganado caprino o sus productos. Actualmente se considera a la cabra como el principal hospedero de *Brucella melitensis*. Si bien la distribución de esta bacteria es en diferentes partes del mundo, es de relevancia en América Latina, son México, Perú y el Noroeste Argentino. En estas últimas áreas, se encuentra la mayor explotación de caprinos, principalmente en terrenos áridos o semiáridos (López *et al.*, 1992; Meljem y Flores, 1998), la enfermedad puede ser de relevancia en otros países de la región, sin embargo no se tienen datos precisos. La transmisión al humano puede ser directa o indirecta, a través de productos lácteos, como quesos, estos últimos se consideran la mayor fuente de infección porque durante su manufactura *Brucella* presente en la leche queda atrapada en la cuajada.

El queso fresco, no curado, de procedencia casera y en consecuencia no sometido a control sanitario, es el principal vehículo de esta forma de contagio, dando lugar a brotes epidémicos. Por lo que el tiempo de maduración del queso es un factor importante para la sobrevivencia de *Brucella melitensis* (Clasessens and Ring, 1996; Öztürk and Nazli, 1996).

Los quesos son alimentos que no deben causar daño a la salud. Existen algunas metodologías, como el sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (conocido como HACCP por sus siglas en inglés), para identificar peligros y estimar los riesgos que pueden afectar la inocuidad de un alimento a fin de establecer las medidas para controlarlos (Almeida *et al.*, 2001).

Este sistema permite, tanto a los responsables del manejo de una industria de alimentos, como a las autoridades oficiales encargadas del control de alimentos, disponer de una herramienta más lógica que el tradicional muestreo y análisis de productos finales, para tomar decisiones en aspectos relacionados con la inocuidad de los productos. Permite además destinar sus recursos hacia el control de los riesgos de contaminación durante el proceso, mediante la aplicación de las siguientes actividades principales (Almeida *et al.*, 2001):

1. Identificación de los peligros, estimación de los riesgos y establecimiento medidas para controlarlos

2. Identificación de los puntos donde el control es crítico para el manejo de la inocuidad del alimento.
3. Establecimiento de criterios de control (Límites Críticos) a cumplir en esos puntos críticos.
4. Establecimiento de procedimientos para la vigilancia, mediante el monitoreo del cumplimiento de los criterios de control.
5. Definición de los correctivos a aplicar cuando la vigilancia indique que no se satisfacen los criterios de control.
6. Mantenimiento de un sistema de registros y documentación sobre el sistema.
7. Establecimiento de procedimientos para verificación del correcto funcionamiento del sistema.

Un peligro se define como cualquier agente biológico, químico o físico con el potencial de causar un efecto adverso para la salud cuando está presente en el alimento en niveles inaceptables. El consumir un alimento, del que se desconoce la forma en que fue elaborado, se considera un riesgo, el cual puede estar presente y se conoce como la función de probabilidad de que ocurra un peligro en el alimento (Almeida *et al.*, 2001).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido que la leche y los productos lácteos contaminados son factores de riesgo para contraer la brucelosis humana, en países en desarrollo en donde el tratamiento de los productos lácteos no se lleva a cabo en forma adecuada (Suárez y López, 2002).

### **1.1. Producción de leche caprina en México**

La producción de leche caprina en México, ha tenido un incremento desde el 2000 al 2005; en el año 2000 la producción de leche fue de 132 millones de litros, en 2001 fue de 140 millones de litros, en el 2002 de 147 millones de litros, en 2003 de 152 millones de litros, en 2004 y 2005 de 161 millones de litros y para el 2006 se pronostica que se producirán 163 millones de litros (Figura 1) (Sistema de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera, 2005).

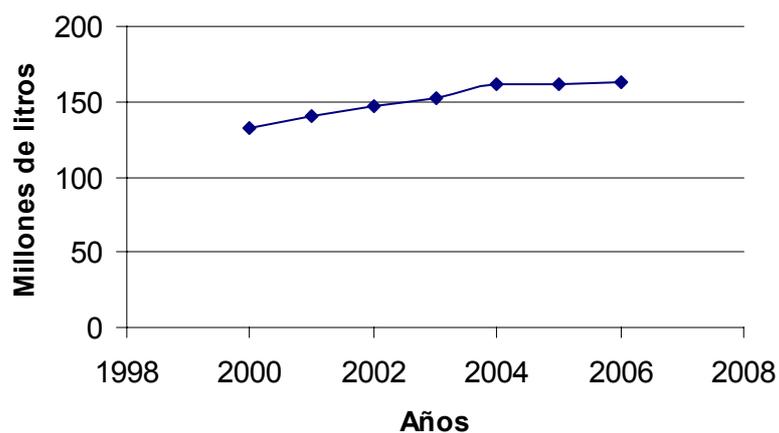


FIGURA 1. Producción de leche de cabra en México (Fuente: SIAP SAGARPA, 2006).

Los cinco principales estados de la República Mexicana productores de leche caprina en el 2006, fueron Coahuila, Durango, Guanajuato, Chihuahua y Jalisco, siendo Coahuila el estado con mayor producción de leche de cabra (Figura 2) (Sistema de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera, 2006).

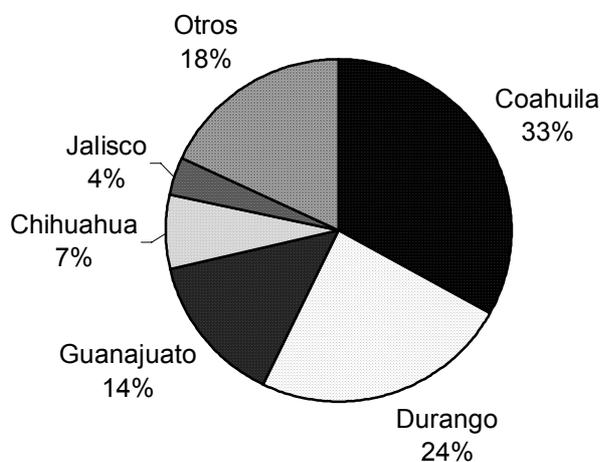


FIGURA 2. Porcentaje estatal de la producción Nacional de leche de cabra en 2006 (Fuente: SIAP SAGARPA, 2006).

### **1.1.2. Producción de quesos de cabra.**

En Francia, Grecia, España e Italia se produce la mayor cantidad de quesos de leche de cabra; hasta el 2003 fue de 68,000 48,000 37,000 y 8,600 toneladas respectivamente, siendo la producción total de aproximadamente 182, 545 miles de toneladas. En algunos casos el proceso de elaboración es estrictamente artesanal, generando un producto de alta calidad y que compite con la tecnología industria moderna (Bonilla, 2005).

El queso de leche de cabra en México es típicamente suave y característicamente untable; a la fecha existen en el mercado 11 diferentes marcas comerciales, las cuales elaboran un producto que recuerda a su origen Francés. Existen tres presentaciones conocidas como rollo, pirámide y boursin, las cuales se encuentran asociados con diversos ingredientes, empleando leche entera de cabra pasteurizada con cultivos lácticos, cuajo natural, sal y algunos productos incorporan cloruro de calcio (Bonilla, 2005).

Las zonas queseras de la República Mexicana se ubican en el norte, centro: Puebla y Michoacán. En el norte de Puebla se elaboran quesos de tipo artesanal (con leche sin pasteurización), y su comercialización es regional; en el norte del país el 18% de la producción nacional son de quesos artesanales y quesos pasteurizados; en el centro del país se elaboran quesos de pasta suave, cuajada mixta con leche sin pasteurizar y se comercializan en el Distrito Federal.

#### **1.1.2.1. Queso fresco de cabra tipo “panela”.**

El queso fresco de cabra tipo “panela” es un derivado lácteo con presentación de forma de cilindros empaquetados en papel doble celofán y papel aluminio de 80 g elaborado con leche sin pasteurizar, con una vida útil de 10 días en refrigeración, consumido por la población en general, incluidos niños y ancianos (Scholz, 1997).

El queso fresco de cabra es un producto poco fermentado, aunque ligeramente ácido con un pH de 5,3, con alto contenido de agua con una actividad del agua de 0.9, con un bajo porcentaje de sal (menor al 3%) y con un potencial de óxido-reducción electronegativo, es decir, con ausencia de oxígeno (Rodríguez, 2002).

Este queso contiene un 55% de humedad, 23% de proteína, 1.2 g de carbohidratos, 26 g de grasa, 336 Kcal de energía, 1.1g de calcio y 800 mg de sodio (Bonilla, 2005).

### **1.1.2.2. Queso madurado de cabra**

El queso de tipo semi-madurado con presentación de 80 g es consumido por la población exigente. La vida útil del producto es de 4-6 semanas (Scholz, 1997).

El queso madurado de cabra sin pasteurizar se caracteriza por ser un producto cuyo pH es de 4.2 a 5.5 en el caso de quesos tipo camembert, en el caso del queso emmental su potencial oxido reducción es de -50 a -200 mV y su  $a_w$  menos de 0.98 y hasta 0.93 (Bourgeois and Larpent, 1995; ICMSF, 1980).

### **1.1.3. Información de la presencia de *Brucella* en alimentos**

Las bacterias requieren de un coeficiente de actividad de agua ( $a_w$ ) de 0.91, con un pH mínimo de 4.5, óptimo de 6.5 a 7.5 y máximo de 9 y con una humedad relativa de > 92%.

*B. melitensis* es un bacilo corto, que no tiene cápsula, inmóvil, Gram negativo, es un patógeno intracelular facultativo aerobio, su temperatura de crecimiento es de 20°C a 42°C y como óptima de 37°C y un pH de 4 a 8.7 (ICMSF, 1996; Gorvel *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2002; Ko *et al.*, 2003; Saldarriaga *et al.*, 2001).

La viabilidad de *B. melitensis* en los quesos frescos de cabra a una temperatura de 37°C es de 48-72 h, en la leche a 37°C es de 5 - 24 h y a una temperatura de 4°C su viabilidad es de 18 meses. En queso blanco su viabilidad es de 1 - 8 semanas, en la mantequilla con una temperatura de 8°C su viabilidad es de 142 días y en los helados a 0°C su viabilidad es de 30 días (Suárez y López, 2002).

La brucelosis es inicialmente, un problema de salud animal en el país, con implicaciones económicas en la ganadería a nivel nacional. Según datos proporcionados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, las pérdidas anuales se estiman en 75 millones de pesos, cantidad que corresponde a mermas en la producción láctea, de 60 millones de pesos y abortos por 11 millones, involucrando a los bovinos; en tanto que, en los caprinos, las pérdidas anuales se

estiman en cuatro millones de pesos determinados por abortos (NOM-002-SSA2,1994).

#### 1.1.4. Información de brucelosis en humanos

De acuerdo al Boletín Epidemiológico de la Secretaría de Salud el número total de casos de brucelosis en humanos del 2000 al 2005 (Figura 3):

Años	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Número de casos totales	2171	3013	2851	3008	2730	1988
Tasa*	2.18	2.98	2.79	2.89	2.59	1.87

(\*Tasa por cada 100000 habitantes)

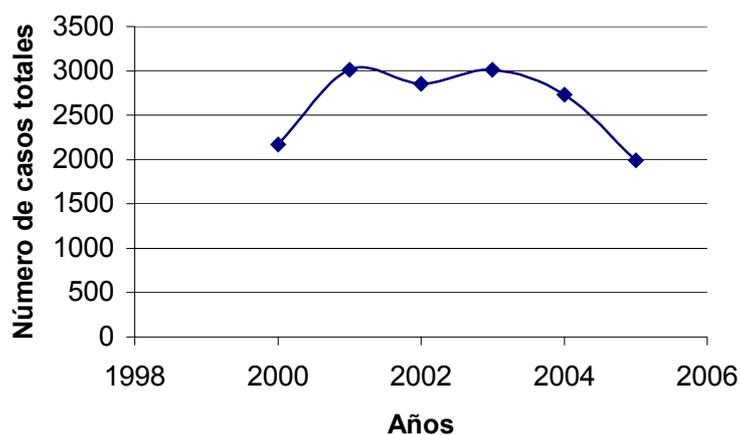


FIGURA 3 . Total de casos de brucelosis en humano por grupo de edad de 2000-2005 (Fuente: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/ Dirección General de Epidemiología SSA, 2006).

La distribución de la brucelosis en humanos de los casos nuevos por grupo de edad:

Años	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Número de casos nuevos*	935	1224	130	1285	1074	811
Edades	25-44	25-44	25-44	25-44	25-44	25-44

(\*Por cada 100000 habitantes)

En el 2002 se presentó una incidencia de 55.38 en edades entre 25-44 años en el siguiente cuadro se muestran la incidencia del 2000-2005 por grupo de edad:

Años	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Incidencia	4.15	5.49	55.38	4.7	3.92	3.20
Edades (años)	45-49	45-49	25-44	50-59	50-59	60-64

(\*Por cada 100000 habitantes)

En el 2006 los estados que presentaron mayor casos fueron: Coahuila con 52 masculino y 76 en femenino, Nuevo León con 47 masculino y 135 femenino, Guanajuato con 41 femenino y 79 en masculino.

Las fuentes que notificaron más casos de brucelosis humana:

Años	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Instituciones	IMSS-ORD	IMSS-ORD	IMSS-ORD	IMSS-ORD	IMSS-ORD	Secretaría de Salud
Número de casos en la población en general*	145	238	216	282	343	146
Principales estados con mayor número de casos	Coahuila	Sinaloa	Sinaloa	Nuevo León	Coahuila	Nuevo León

(\*Por cada 100000 habitantes)

En la figura 4 se observa el número de casos de brucelosis en humanos del 2005 reportados por las principales instituciones. La principal institución que notificó 146 casos procedentes del estado de Nuevo León fue la Secretaría de Salud.

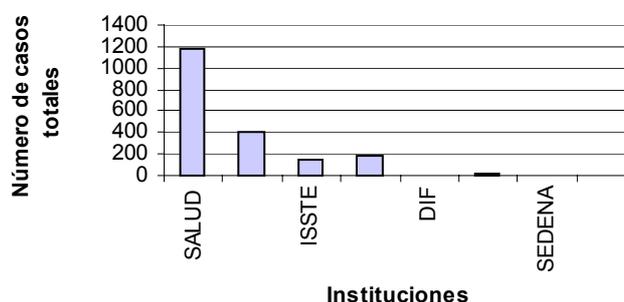


FIGURA 4. Número de casos totales de brucelosis en humanos en 2005 notificados por las principales fuentes institucionales (Fuente: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/ Dirección General de Epidemiología SSA, 2006).

En los últimos años se ha notificado un mayor número de casos en México; en el siguiente cuadro se muestran las diferentes entidades federativas con su respectiva tasa y mes:

Años	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Mes	Marzo	Junio	Julio	Julio	Junio	Mayo
Estado	Nuevo León	Sinaloa	Sinaloa	Sinaloa	Coahuila	Coahuila
Tasa*	6.38	18.82	13.63	21.52	24.61	12.23

(\*Por cada 100000 habitantes)

En el 2002 los estados con mayor prevalencia fueron Coahuila, Chihuahua, Jalisco y Zacatecas (Luna *et. al.*, 2002). Los cinco principales estados que presentaron el mayor número de casos de brucelosis en el 2005 fueron Coahuila, Nuevo León, Guanajuato, Sinaloa, San Luís Potosí (Figura 5).

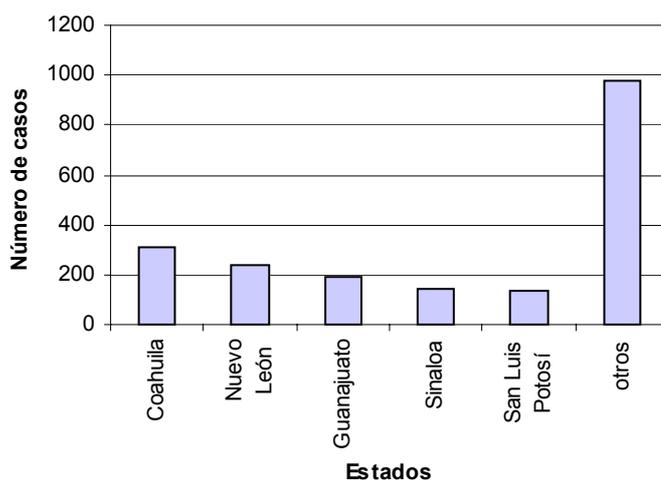


FIGURA 5. Número de casos de brucelosis en humanos por estados de la República Mexicana en el 2005 (Fuente: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/ Dirección General de Epidemiología SSA, 2006).

En la figura 6 se presentan los casos de brucelosis reportados en los meses de enero a diciembre del 2005; donde se observa un efecto estacional el cual fue en el mes de mayo con 225 casos totales (Boletín Epidemiológico de la Secretaría de la Salud, 2005).

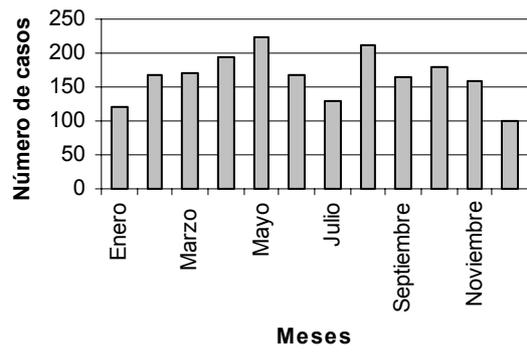


FIGURA 6. Número de casos de brucelosis humana en la República Mexicana por mes del 2005 (Fuente: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/ Dirección General de Epidemiología SSA, 2006).

### **1.1.5. JUSTIFICACIÓN**

Pese a que la presencia de *Brucella* spp. en quesos ha sido ampliamente demostrada, así como la importancia de los quesos como un vehículo en la transmisión de este agente al humano; aún no es claro cómo los factores fisicoquímicos tales como la actividad de agua ( $a_w$ ) y el pH durante los procesos de elaboración y maduración de los quesos de cabra, afectan el desarrollo y la viabilidad de este microorganismo.

### **1.2. HIPÓTESIS**

Los diferentes procesos de elaboración de los quesos fresco de cabra, tipo “panela” y semi-madurados, afectan al desarrollo y la viabilidad de *B. melitensis*.

### **1.3. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la sobrevivencia y viabilidad de *B. melitensis*, en quesos de cabra inoculados durante su elaboración y maduración.

#### **1.3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar las características fisicoquímicas en los quesos frescos y semi-madurados elaborados con leche de cabra.
2. Aislar e identificar *B. melitensis* en quesos frescos y semi-madurados elaborados con leche de cabra.
3. Mediante el método de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (conocido como HACCP por sus siglas en inglés) determinar en qué etapa del proceso *B. melitensis* pierde la viabilidad.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Unidad de análisis

La leche de cabra que se utilizó para la elaboración de los diferentes quesos se obtuvo del Centro de Enseñanza-Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (CEPIPSA-FMVZ-UNAM), ubicado Av. Cruz Blanca Núm. 486, San Miguel Topilejo, Tlalpan. CEPIPSA posee constancia de hato libre de brucelosis, esto es una de las condiciones importantes para la elaboración de los quesos.

### 2.2. Material para la toma de la leche de cabra

Se usaron botellas de boca ancha de vidrio con tapa de rosca limpias, secas, estériles (los envases de vidrio se esterilizaron en una autoclave\* a 121°C durante 15 minutos), sin fugas para las muestras, se marcaron mediante rotuladores de tinta indeleble. Colocando la fecha de la toma de la muestra. La toma de la muestra se realizó usando técnicas asépticas (ICMSF, 1999).

Las muestras fueron transportadas en una hielera y posteriormente se analizaron en el laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Se elaboraron dos tipos de queso fresco “panela” y semi-madurado de acuerdo con la metodología de elaboración propuesta por Scholz (Scholz, 1997).

Se elaboraron quesos frescos y semi-madurados a 24° y 4°C con leche sin pasteurizar y quesos semi-madurados a 24°C con leche previamente pasteurizada se realizaron de manera paralela, es decir, se elaboraron quesos frescos y semi-madurados a 24° y 4°C (con leche sin pasteurizar) y quesos semi-madurados a 24°C (con leche previamente pasteurizada) sin inocular con la cepa 16 M de *B. melitensis* y se elaboraron quesos frescos y semi-madurados a 24° y 4°C (con leche sin pasteurizar) y quesos semi-madurados 24°C (con leche previamente pasteurizada), con leche inoculada con *B. melitensis*.

---

\*Sterilezer Llamato SM510, No. serie B0607, Made in Japan.

Los quesos de cabra inoculados se trabajaron en la Unidad de Bioseguridad Tipo 3 del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### **2.3. Proceso de elaboración del queso fresco**

El proceso de elaboración del queso fresco tipo “panela” se dividió en las siguientes etapas: recepción, templado a 24°C, cuajada por 30 minutos, corte por 10 minutos y desuerado por 18 horas (Scholz, 1997).

Proceso de elaboración del queso fresco tipo “panela” (Figura 7):

1. RECEPCIÓN: la leche se tomó de la ordeña del día, en recipientes de vidrio estériles y se almacenaron en refrigeración a 4°C.
2. TEMPLADO: la leche se templó a una temperatura próxima a los 24°C con el objetivo de tener condiciones óptimas de crecimiento para las bacterias acidolácticas.
3. CUAJADA : se adicionó las enzimas coagulantes o cuajo de forma líquida (2 ml por cada 10 l de leche) se diluyó el cuajo en agua potable y se dejó actuar durante 30 minutos.
4. CORTE: se cortó la cuajada de la leche con una espátula estéril y se dejó reposar durante 10 minutos.
5. DESUERADO: la cuajada se vació en los moldes de aluminio perforados estériles con la finalidad de iniciar la separación del precipitado de caseína del suero o desuerado y se conservaron a temperatura ambiente en recipientes de plástico cerrados durante 18 h.

#### **2.3.1. Queso sin inocular**

Antes de la elaboración del queso fresco, se tomaron 2 muestras de 250 ml de leche. Ambas se colocaron en una incubadora a 37°C durante al menos dos horas para completar el proceso de templado. Posteriormente a una de las muestras de leche (250 ml) se le adicionó 0.05 ml de las enzimas coagulantes de leche (cuajo) diluido con agua (Cuamex<sup>†</sup>, México) y se dejó actuar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente se procedió a la etapa de corte durante la cual se empleó una espátula estéril para seccionar la cuajada. Esta cuajada se transfirió a charolas de aluminio

---

<sup>†</sup> Cuamex cuajo líquido CRH HANSEN de México, S. A. de C. V.

estériles y perforadas para el iniciarse la separación del precipitado de caseína del suero (desuerado), etapa en la que permaneció la cuajada durante 18 horas a temperatura ambiente.

### 2.3.2. Queso inoculado con *B. melitensis*

La segunda muestra de 250 ml fue inoculada con  $25 \times 10^8$  ufc de *B. melitensis*, una vez inoculada se homogenizó con movimientos circulares en contra y a favor de las manecillas del reloj durante al menos 10 minutos. Posteriormente se realizó la cuantificación del inóculo mediante el método de microdilución y plaqueo en medio Farell marca OXOID<sup>‡</sup>. En las etapas de templado, cuajada, corte y desuerado se realizó la cuantificación del inóculo de acuerdo con la NOM-110-SSA1-1994 Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis.

Inmediatamente después se añadió el cuajo y se siguió exactamente el procedimiento de elaboración del queso fresco, tal y como se señaló anteriormente (Figura 7).

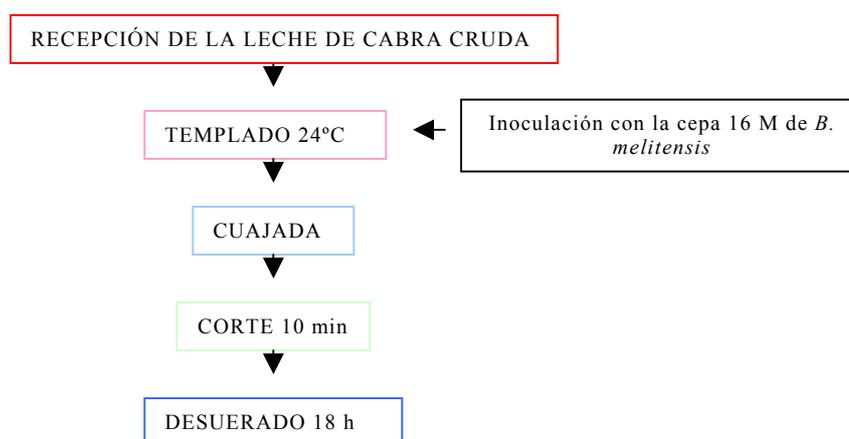


FIGURA 7. Elaboración del queso fresco de cabra tipo “panela”.

### 2.4. Proceso de elaboración del queso semi-madurado a 24°C

Proceso de elaboración del queso de cabra semi-madurado a 24°C:

1. RECEPCIÓN: la leche cabra se tomó de la ordeña del día, en recipientes de vidrio estériles y se conservaron en refrigeración a 4°C.
2. TEMPLADO: la leche se templó con el objeto de crear condiciones óptimas para las bacterias acidolácticas.

<sup>‡</sup> Oxoid Culture Media Supplements Brucella Selective Supplement. Lot 411836. Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England.

3. INCUBACIÓN: se adicionó el cultivo iniciador<sup>§</sup> (260 ml del cultivo iniciador por cada 10 l de leche.). El cultivo iniciador contiene: *Lactococcus lactis* subesp. *Lactis*, *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris*. También se le adicionó las enzimas coagulantes o cuajo de la marca Cuamex XXX<sup>\*\*</sup>, se homogenizó y se dejó incubar durante 24 h a temperatura ambiente.
4. CORTE: el corte de la cuajada se realizó con una espátula estéril. Después del corte se dejó reposar durante 10 minutos.
5. DESUERADO: se colocaron en moldes de aluminio perforados estériles y se dejaron desuerar durante 18 horas.
6. SALMUERA: los quesos de los moldes se colocaron en la salmuera con 18% de sal, pH 5 y  $a_w$  0.823 durante 30 minutos. La duración del baño de sal dependió del tamaño de las piezas y del contenido de cloruro sódico que se desea. Piezas de 40 g se dejaron por 30 minutos.
7. MADURACIÓN I: los quesos se colocaron en moldes secos de aluminio estériles y se almacenaron a 24°C durante 5 días
8. MADURACIÓN II: los quesos se dejaron durante 15 días a 24°C
9. MADURACIÓN III: los quesos se dejaron durante 30 días a 24°C

#### 2.4.1. Queso sin inocular

Antes de la elaboración del queso semi-madurado se tomaron 2 muestras de 500 ml de leche. Ambas se colocaron en una incubadora a 37°C durante al menos dos horas para completar el proceso de templado. Posteriormente, a una de las muestras de leche (500 ml) se le adicionó 13 ml del cultivo iniciador, se homogenizó durante 2 minutos y después se le adicionó 0.1 ml de las enzimas coagulantes de la leche (cuajo), se homogenizó y se dejó actuar durante 24 horas a temperatura ambiente. Inmediatamente se procedió a la etapa de corte durante la cual se empleó una espátula estéril para seccionar la cuajada. Esta cuajada se transfirió a charolas de aluminio estériles y perforadas para el desuerado, etapa en la que permaneció la cuajada durante 18 horas a temperatura ambiente, después se procedió a sumergirlos en la salmuera con una concentración de 18% de sal con un  $a_w$  de 0.823 y un pH de 5 durante 30 minutos. Inmediatamente se transfirieron a un recipiente a temperatura de 24°C para su maduración y se tomaron muestras de las etapas de maduración I, II y III de los quesos tomando en cuenta que los quesos tenían 30 días de maduración; en la etapa de

---

<sup>§</sup> Direct Fermiti Liofilizzati. DOM 3, dosi 4, lotto 19 M. Centro Sperimentale del Latte S.P.A. Italy.

<sup>\*\*</sup> Cuamex cuajo líquido CRH HANSEN de México, S. A. de C. V.

maduración II los quesos se transfirieron a otras charolas de aluminio estériles y perforadas.

#### 2.4.2. Queso inoculado con la cepa 16M de *B. melitensis*

La segunda muestra de 500 ml fue inoculada con  $50 \times 10^8$  ufc de *B. melitensis*; una vez inoculada se homogenizó con movimientos circulares en contra y a favor de las manecillas del reloj durante al menos 10 minutos. Posteriormente, se realizó la cuantificación del inóculo mediante el método de microdilución y plaqueo en medio Farell. En las etapas de templado, incubación, corte, desuerado, salmuera, maduración I, maduración II y maduración III se tomaron muestras para realizar la cuantificación del inóculo de acuerdo con la NOM 110-SSA1-1994 Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis.

Inmediatamente después se le añadió el cultivo iniciador y el cuajo y se siguió exactamente el procedimiento de elaboración del queso semi-madurado tal y como se señaló anteriormente (Figura 8).

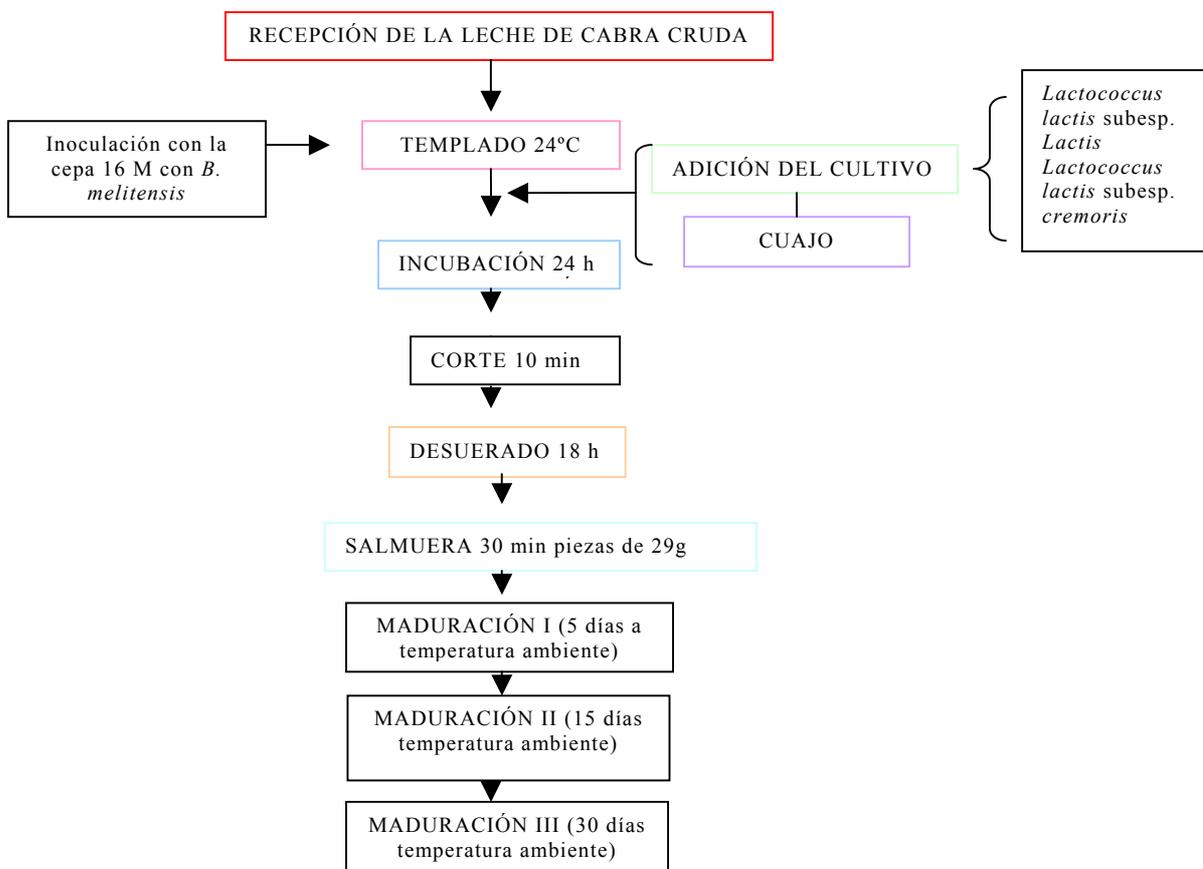


FIGURA 8. Elaboración del queso semi-madurado a 24°C.

## 2.5. Proceso de elaboración del queso semi-madurado a 24°C en condiciones controladas o leche previa pasteurización

La leche de cabra que se utilizó para la elaboración de los quesos semi-madurados a 24°C, se pasteurizó con la finalidad de evitar una contaminación de miceliados en los quesos. La leche se pasteurizó a 63°C durante 30 minutos (Kehagias *et al.*, 1995) para su posterior inoculación con *B. melitensis*. La pasteurización se evaluó mediante la prueba para la detección de fosfatasa en la leche<sup>††</sup> (Veisseyre, 1988).

Proceso de elaboración del queso de cabra semi-madurado a 24°C con leche previamente pasteurizada:

1. RECEPCIÓN: la leche se tomó de la ordeña del día, en recipientes de vidrio estériles y se conservaron en refrigeración a 4°C.
2. PASTEURIZACIÓN: la leche se pasteurizó a 63°C durante 30 minutos.
3. TEMPLADO: la leche se templó con el objeto de crear condiciones óptimas para las bacterias acidolácticas.
4. INCUBACIÓN: se adicionó el cultivo iniciador (260 ml del cultivo iniciador por cada 10 l de leche.). El cultivo iniciador contiene: *Lactococcus lactis* subesp. *Lactis*, *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris*. También se le adicionó las enzimas coagulantes, se homogenizó y se dejó incubar durante 24 h a temperatura ambiente.
5. CORTE: el corte de la cuajada se realizó con una espátula estéril. Después del corte se dejó reposar durante 10 minutos.
6. DESUERADO: se colocaron en moldes de aluminio perforados estériles y se dejaron desuerar durante 18 horas.
7. SALMUERA: los quesos de los moldes se colocaron en la salmuera con 18% de sal, pH 5 y  $a_w$  0.823 durante 30 minutos. La duración del baño de sal dependió del tamaño de las piezas y del contenido de cloruro sódico que se desea. Piezas de 40 g se dejaron por 30 minutos.
8. MADURACIÓN I: los quesos se colocaron en moldes secos de aluminio estériles y se almacenaron a 24°C durante 5 días
9. MADURACIÓN II: los quesos se dejaron durante 15 días a 24°C
10. MADURACIÓN III: los quesos se dejaron durante 30 días a 24°C

---

<sup>††</sup> Lacto-zyma No. 610 Hycel de México, S. A. de C. V. México

### 2.5.1. Procedimiento para la detección de fosfatasa en leche

Se usaron dos tubos, uno se marcó como problema y el otro como control; se les añadieron a cada uno 10 ml de agua destilada a 37 – 39°C y 250 mg de polvo de Lacto-zyma I (No. 610-A)<sup>\*\*</sup> se mezclaron hasta que se disolvió.

Al tubo problema, se le añadió 1 ml de leche de cabra sin pasteurizar y con el tubo control, se procedió de la misma manera, pero con leche de cabra pasteurizada en la cual la fosfatasa había previamente destruida por calentamiento. Para tener mayor seguridad es necesario incubar la mezcla de ambos tubos en un baño maría a 45°C, durante 10 minutos. Se le agregó 250 mg de Lacto-zyma II (No. 610 B) a ambos tubos, se dejaron en reposo durante 10 minutos y se agitaron. A los 3 ó 5 minutos se compararon los colores de los dos tubos con la tabla de colores (Official Methods of Analysis of the Association of Official Agriculture Chemists, 1965; Dairy Science, 1946; Association Oficial Agriculture Chemists, 1948).

La tabla de colores facilita la interpretación en forma esquemática ejemplo:

#### NEGATIVO

Matiz 0: tinte gris a café rojizo



Prueba de control.

Reacción de fosfatasa negativa

#### DÉBILMENTE POSITIVO

Matiz 1: tinte ligeramente azul



Reacción débilmente positiva

#### FUERTEMENTE POSITIVO

Matiz 2: tinte azul intenso



Reacción fuertemente positiva

### 2.5.2. Queso sin inocular

Antes de la elaboración del queso semi-madurado se tomaron 2 muestras de 500 ml de leche. Ambas se pasteurizaron a 63°C por 30 minutos; después ambas se colocaron en una incubadora a 37°C durante al menos dos horas para completar el proceso de

---

<sup>\*\*</sup> Lacto-zyma No. 610 Hycel de México, S. A. de C. V. México

templado. Posteriormente, a una de las muestras de leche (500 ml) se le adicionó 13 ml del cultivo iniciador, se homogenizó durante 2 minutos y después se le adicionó 0.1 ml de las enzimas coagulantes de la leche (cuajo), se homogenizó y se dejó actuar durante 24 horas a temperatura ambiente. Inmediatamente se procedió a la etapa de corte durante la cual se empleó una espátula estéril para seccionar la cuajada. Esta cuajada se transfirió a charolas de aluminio estériles y perforadas para el desuerado, etapa en la que permaneció la cuajada durante 18 horas a temperatura ambiente, después se procedió a sumergirlos en la salmuera con una concentración de 18% de sal con un  $a_w$  de 0.823 y un pH de 5 durante 30 minutos. Inmediatamente se transfirieron a un recipiente y mantuvieron a temperatura de 24°C para su maduración y se tomaron muestras de las etapas de maduración I, II y III tomando en cuenta que los quesos tenían 30 días de maduración; en la etapa de maduración II se transfirieron los quesos a otras charolas de aluminio estériles y perforadas.

### **2.5.3. Queso inoculado con la cepa 16M de *B. melitensis***

La segunda muestra de 500 ml fue inoculada con  $50 \times 10^8$  ufc de *B. melitensis* una vez inoculada se homogenizó con movimientos circulares en contra y a favor de las manecillas del reloj durante al menos 10 minutos. Posteriormente se realizó la cuantificación del inóculo mediante el método de microdilución y plaqueo en medio Farell. En las etapas de templado, incubación, corte, desuerado, salmuera, maduración I, maduración II y maduración III se tomaron muestras para realizar la cuantificación del inóculo de acuerdo con la NOM 110-SSA1-1994 Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis.

Inmediatamente después se le añadió el cultivo iniciador así como el cuajo, se siguió exactamente el procedimiento de elaboración del queso semi-madurado tal y como se señaló anteriormente (Figura 9).

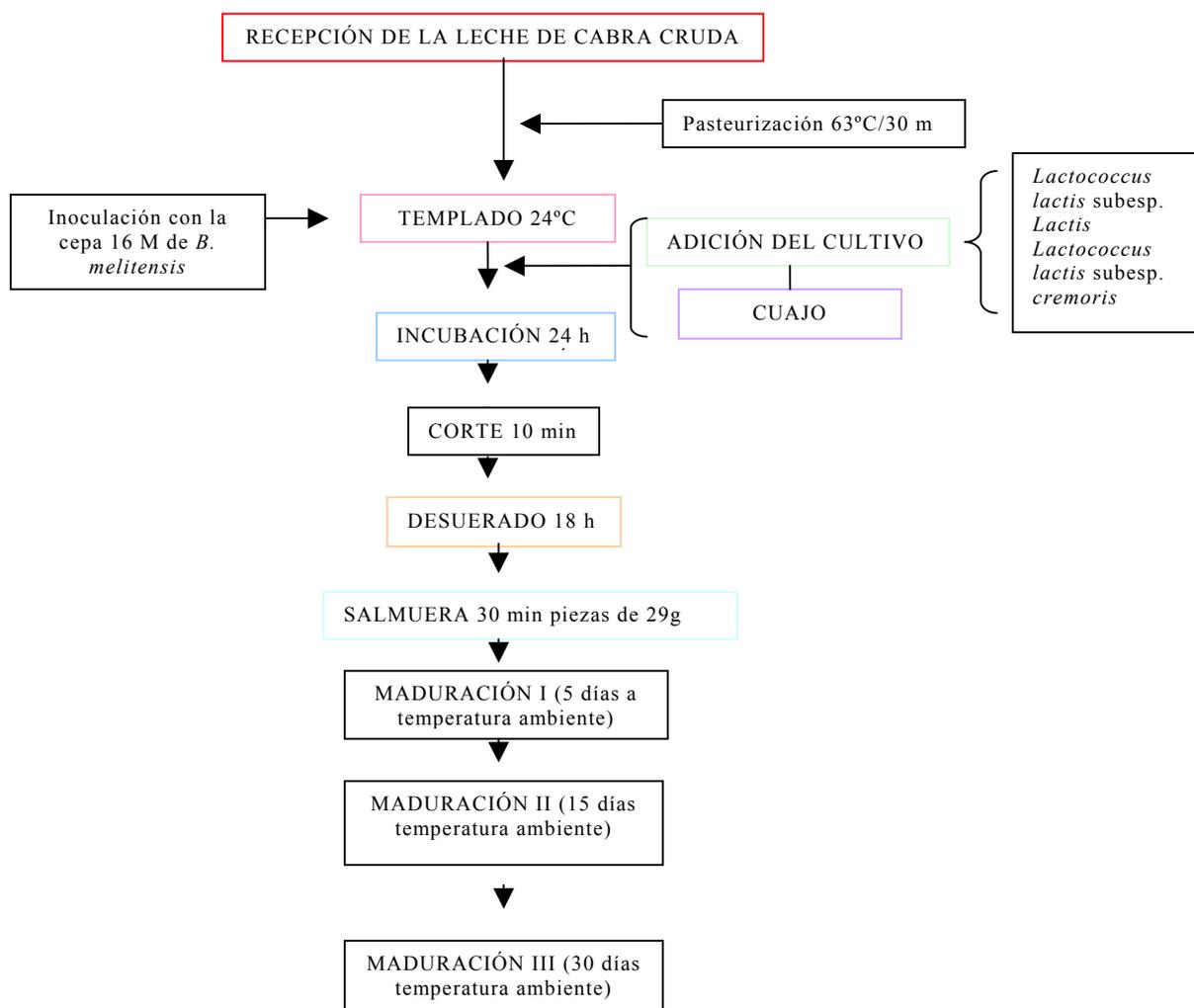


FIGURA 9. Elaboración del queso semi-madurado a 24°C en condiciones controladas.

## 2.6. Proceso de elaboración del queso semi-madurado a 4°C

Se elaboraron quesos semi-madurados a 4°C con la finalidad de evitar contaminación de miceliados en los quesos.

Proceso de elaboración del queso de cabra semi-madurado a 4°C:

10. RECEPCIÓN: la leche se tomó de la ordeña del día, en recipientes de vidrio estériles y se conservaron en refrigeración a 4°C.
11. TEMPLADO: la leche se templó con el objeto de crear condiciones óptimas para las bacterias acidolácticas.
12. INCUBACIÓN: se adicionó el cultivo iniciador (260 ml del cultivo iniciador por cada 10 l de leche.). El cultivo iniciador contiene: *Lactococcus lactis*

subesp. *Lactis*, *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris*. También se le adicionaron las enzimas coagulantes se homogenizó y se dejó incubar durante 24 h a temperatura ambiente.

13. CORTE: el corte de la cuajada se realizó con una espátula estéril. Después del corte se dejó reposar durante 10 – 15 minutos.
14. DESUERADO: se colocaron en moldes de aluminio perforados estériles y se dejaron desuerar durante 18 horas.
15. SALMUERA: los quesos de los moldes se colocaron en la salmuera con 18% de sal pH 5 y  $a_w$  0.823 durante 30 minutos.
16. MADURACIÓN I: los quesos se colocaron en moldes secos de aluminio estériles y se almacenaron a 4°C durante 5 días
17. MADURACIÓN II: los quesos se dejaron durante 15 días a 4°C
18. MADURACIÓN III: los quesos se dejaron durante 30 días a 4°C

### **2.6.1. Queso sin inocular**

Antes de la elaboración del queso semi-madurado se tomaron dos muestras de 500 ml de leche. Ambas se colocaron en una incubadora a 37°C durante al menos dos horas para completar el proceso de templado. Posteriormente, a una de las muestras de leche (500 ml) se le adicionó 13 ml del cultivo iniciador, se homogenizó durante 2 minutos y después se le adicionó 0.1 ml de las enzimas coagulantes de la leche (cuajo), se homogenizó y se dejó actuar durante 24 horas a temperatura ambiente. Inmediatamente se procedió a la etapa de corte durante la cual se empleó una espátula estéril para seccionar la cuajada. Esta cuajada se transfirió a charolas de aluminio estériles y perforadas para el desuerado, etapa en la que permaneció la cuajada durante 18 horas a temperatura ambiente, después se procedió a sumergirlos en la salmuera con una concentración de 18% de sal con un  $a_w$  de 0.823 y un pH de 5 durante 30 minutos. Inmediatamente se transfirieron a un recipiente y mantuvieron a temperatura de 4°C para su maduración y se tomaron muestras en las etapas de maduración I, II y III tomando en cuenta que los quesos tenían 30 días de maduración; en la etapa de maduración II los quesos se transfirieron a charolas estériles y perforadas.

### **2.6.2. Queso inoculado con la cepa 16M de *B. melitensis***

La segunda muestra de 500 ml fue inoculada con  $50 \times 10^8$  ufc de *B. melitensis*. Una vez inoculada se homogenizó con movimientos circulares en contra y a favor de las manecillas del reloj durante al menos 10 minutos. Posteriormente se realizó la

cuantificación del inóculo mediante el método de microdilución y plaqueo en medio Farrell. En cada etapa se tomaron muestras para realizar la cuantificación del inóculo de acuerdo con la NOM 110-SSA1-1994 Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis. Inmediatamente después se le añadió el cultivo iniciador y el cuajo y se siguió exactamente el procedimiento de elaboración del queso semi-madurado tal y como se señaló anteriormente (Figura 10).

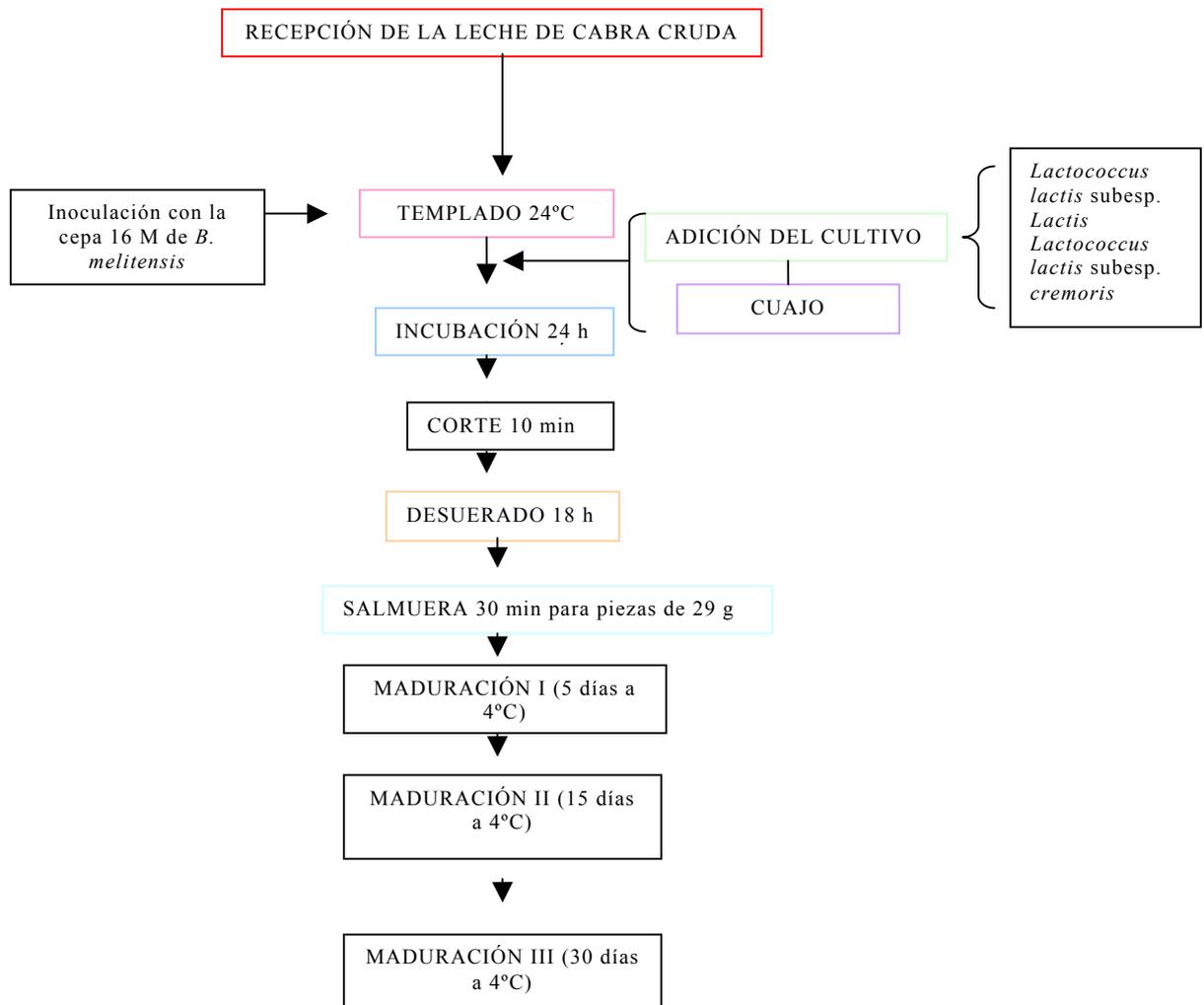


FIGURA 10. Elaboración del queso semi-madurado a 4°C.

## 2.7. Determinación de hongos y levaduras

En cada una de las etapas de elaboración del queso fresco y semi-madurado se determinaron hongos y levaduras de acuerdo a la NOM-111-SSA-1994 Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos (NOM-111-SSA, 1994). Con la finalidad de obtener un producto inocuo y de acuerdo a la anterior norma mencionada indica que un queso maduro solo debe tener como permisible 500 ufc/g de levaduras y hongos miceliados para considerarse apto para el consumo.

## **2.8. Preparación de las unidades de muestras para los análisis fisicoquímicos**

Para las muestras de quesos se realizó cortes radiales desde el centro del queso con una espátula estéril, evitando que la muestra se comprimiera (ICMSF, 1999).

En el queso fresco y semi-madurado sin inocular se realizaron los siguientes análisis fisicoquímicos:

### **2.8.1. Procedimiento para los análisis fisicoquímicos**

#### **2.8.2. Determinación del pH**

Se tomó el pH en cada etapa del proceso de elaboración del queso fresco y queso semi-madurado con tiras reactivas<sup>§§</sup> y potenciómetro<sup>\*\*\*</sup>.

#### **2.8.3. Determinación del $a_w$**

La determinación del  $a_w$  fue realizada en un medidor de la actividad del agua<sup>†††</sup> de acuerdo al Manual de Procedimientos de la Universidad Autónoma Metropolitana, Plantel Iztapalapa<sup>†††</sup>.

## **2.9. Procedimiento para el cultivo bacteriológico**

### **2.9.1. Preparación del inóculo**

Se sembró e incubó la cepa 16 M de *B. melitensis* en agar brucella a 37°C por 48 horas, después se transfirió una colonia y se transfirió a un tubo con 50 ml de caldo brucella<sup>§§§</sup>, se incubó a 37°C con agitación orbital<sup>\*\*\*\*</sup> a 175 RPM<sup>§§</sup> por 18 horas.

Posteriormente se realizó una dilución 1:50 del cultivo original en 50 ml de caldo brucella y se incubó por 22 horas a 37°C con agitación orbital a 175 rpm. Después de

---

<sup>§§</sup> Varillas indicadoras de pH, por Metrix. Laboratorios, S. A. de C. V. México.

<sup>\*\*\*</sup> Orion Modelo 410A USA 1996

<sup>†††</sup> Aqualab Decagon GH303170 CX-1.

<sup>†††</sup> Comunicación por la Dra. Isabel Guerrero Legarreta.

<sup>§§§</sup> BBL, Becton Dickinson and Company. U.S.A.

<sup>\*\*\*\*</sup> Acceso Lab. Incubadora Microbiológica NCR No. serie 92082100196.

la incubación el cultivo se centrifugó<sup>††††</sup> a 4500 gravedades por 10 minutos y se lavó 2 veces con PBS a pH de 7.2 con las mismas condiciones de centrifugación. Después las bacterias se resuspendieron en 25 ml de RPMI<sup>‡‡‡‡</sup> (medio para cultivo celular) con 10% de suero fetal bovino<sup>§§§§</sup> y se dividieron en alícuotas de 1 ml. Asimismo, se realizaron diluciones decimales para cuantificar la concentración del inóculo, se hicieron diluciones de la 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-9</sup>, posteriormente se tomaron 100 µl de cada dilución y se sembraron en agar brucela<sup>\*\*\*\*\*</sup> y se incubaron<sup>†††††</sup> a 37°C por 5 días en aerobiosis (Iáñez, 2005).

### **2.9.2. Preparación de la solución reguladora de fosfatos**

La preparación de la solución concentrada se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en la Norma Oficial Mexicana (NOM-110-SSA1, 1994).

### **2.9.3. Medio de cultivo**

En el laboratorio se procedió a preparar los medios de cultivo: a) Medio Farrell, para el cultivo de *B. melitensis* de acuerdo con la metodología propuesta por Alton (De la Rosa, 2000; Alton *et al.*, 1976), b) Agar brucella y Caldo brucella.

### **2.9.4. Preparación de las muestras para siembra**

Durante el procedimiento de elaboración del queso fresco tipo “panela” de cabra y el queso semi-madurado inoculados con *B. melitensis* se hicieron diluciones de acuerdo a la NOM-110-SSA1-1994 Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis (Alton *et al.*, 1976).

El procedimiento para el aislamiento e identificación de *B. melitensis* se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Alton (De la Rosa, 2000; Alton *et al.*, 1976). Se tomó 10 g y/o 10 ml de la muestra, se colocó en 90 ml de solución reguladora de fosfatos posteriormente se maceró perfectamente y se hicieron diluciones decuples (10<sup>-1</sup> - 10<sup>-8</sup>), se tomó de cada tubo de la dilución 100µl y se

---

†††† Jouan quality system CR 412.

‡‡‡‡ Medio RPMI, Sigma-Aldrich, INC. St. Louis, MO U.S.A.

§§§§ Fetal Bovine Serum, Ivitrogen Corporation, Origin U. S. A.

\*\*\*\*\* BD BBL™ Brucella Agar. Becton Dicknson Microbiology Systems, Sparks MD 21152, USA.

††††† Incubadora bacteriológica, Nuair, UN-3700, no. de serie 54634.

colocó en medio Farell para posteriormente ser sembrados con una asa bacteriológica desechable estéril en forma de “L”.

## **2.10. Siembra en medio de cultivo**

### **2.10.1. Siembra en medio Farell**

Se transfirieron 100 µl de cada una de las diluciones en las cajas con medio Farell estériles, previamente identificada.

Se extendió cuidadosamente la muestra sobre la superficie del medio y se dejaron reposar las cajas sobre una superficie horizontal.

### **2.10.2. Incubación**

Las cajas fueron colocadas en la incubadora, acomodadas en posición invertida perfectamente selladas y fueron incubadas a 37°C, durante 5 días.

### **2.10.3. Lectura de resultados de los cultivos realizados**

El número de colonias identificadas se multiplicó por el factor de dilución (10) y por la inversa de la dilución correspondiente, obteniendo el número de unidades formadoras de colonias por mililitro y/o gramo (ufc / ml ó ufc / g ).

## **2.11. Evaluación del queso madurado de cabra tomado de un centro comercial**

Con la finalidad de tener una referencia de cuales son los parámetros de un queso madurado de cabra se evaluó la  $a_w$ , pH y aislamiento de levaduras y micelizados de un queso comercial.

## **2.12. Procedimiento para el análisis de los Puntos Críticos de Control**

Para determinar los Puntos Críticos de Control de las etapas de elaboración de los quesos frescos, quesos semi-madurados a 24°C y 4°C sin leche previamente pasteurizada y quesos semi-madurados a 24°C con leche previamente pasteurizada, se elaboró un árbol de decisiones (Figura 11) (Almeida *et al.*, 2001)

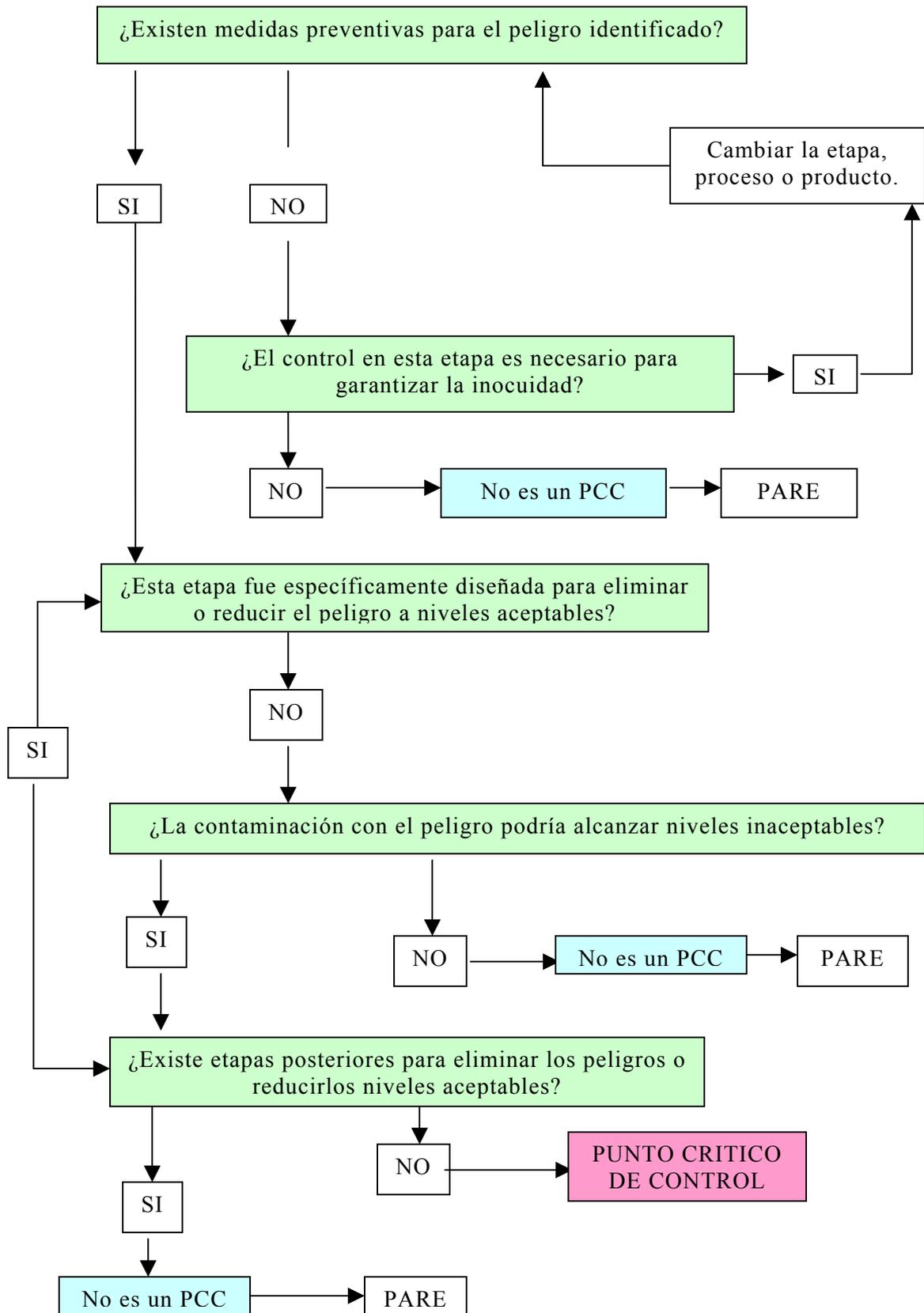


FIGURA 11. Árbol de decisiones.

## 2.13. Análisis Estadístico

Con la información resultante del queso fresco y semi-madurado inoculado y no inoculado, se realizó una regresión de Spearman (Daniel, 1995) para identificar la correlación de las variables de  $a_w$ , pH, con el fin de determinar el momento en que *B. melitensis* no sobrevive en quesos fresco y madurado de cabra.

### 2.13.1. Variables a analizar

- ❖ Variable cualitativa nominal: presencia de *B. melitensis* en quesos frescos de cabra.
- ❖ Variable cualitativa nominal: presencia de *B. melitensis* en quesos madurados de cabra.
- ❖ Variable cuantitativa continua:  $a_w$
- ❖ Variable cuantitativa continua: pH
- ❖ Variable cuantitativa continua: temperatura de maduración

### III. RESULTADOS

#### 3.1. Queso fresco tipo “panela”

Al término de la elaboración en el queso fresco se encontró que la sobrevivencia de *B. melitensis* fue de  $1 \times 10^6$  ufc/g con un  $a_w$  de 0.977 y un pH de 6 en el queso fresco (Cuadro 1); la cantidad de levaduras rebasó los límites permisibles (500 ufc/g) establecidos en la NOM- 121-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias (Cuadro 2).

CUADRO 1. Sobrevivencia de *Brucella melitensis* durante la elaboración del queso fresco tipo “panela”.

Queso fresco	<i>Brucella melitensis</i>	$a_w$	pH
Leche inoculada	$25 \times 10^8$ ufc/ml	0.9738	7
Templado a 24°C	$32 \times 10^6$ ufc/ml	0.9728	7
Cuajada por 30 min	$11 \times 10^6$ ufc/g	0.9732	6
Corte por 10 min	$12 \times 10^6$ ufc/g	0.9712	7
Desuerado por 18 h	$1 \times 10^6$ ufc/g	0.977	6

CUADRO 2. Aislamiento de levaduras y miceliados durante la elaboración del queso fresco.

Etapas	Levadura	Miceliados
Leche	$140 \times 10^2$ ufc/ml	0
Templado	$87 \times 10^2$ ufc/ml	$2 \times 10^2$ ufc/ml
Cuajada	$57 \times 10^2$ ufc/g	0
Corte	$24 \times 10^2$ ufc/g	0
Desuerado	$630 \times 10^2$ ufc/g	0

En la figura 12 se observa gráficamente los valores del  $a_w$  y en la figura 13 los valores del pH con respecto a las diferentes etapas de elaboración del queso fresco.

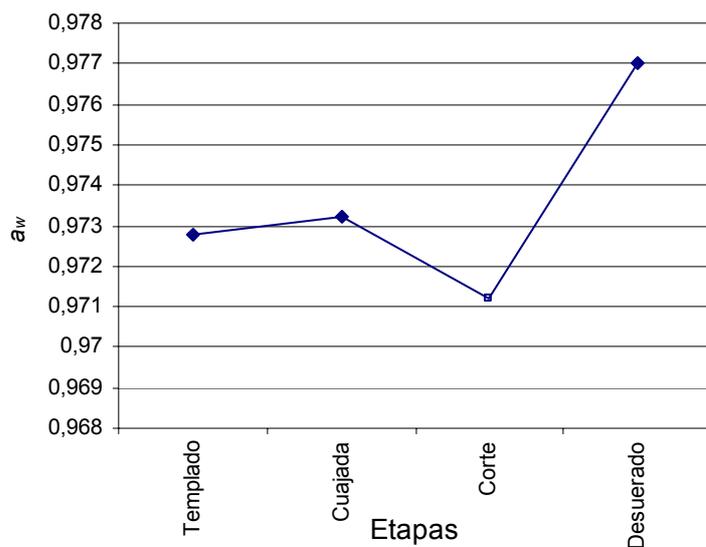


FIGURA 12. Valores del  $a_w$  en las diferentes etapas de elaboración del queso fresco tipo “panela”.

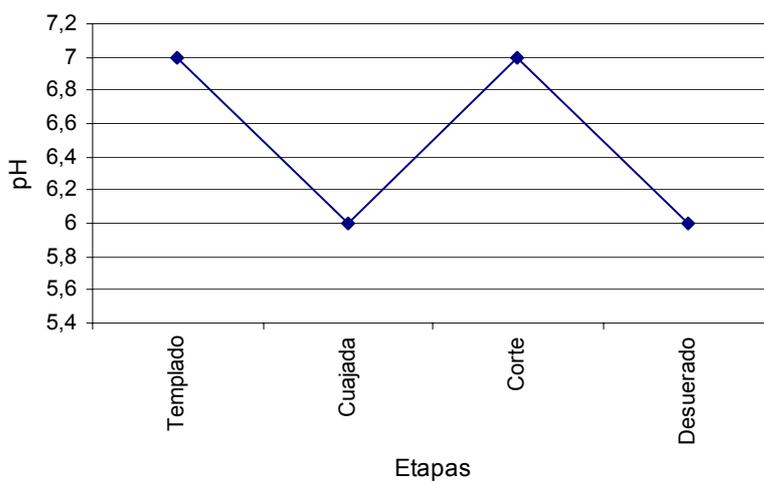


FIGURA 13. Valores del pH en las diferentes etapas de elaboración del queso fresco tipo “panela”.

En el suero de la etapa del corte se encontró una sobrevivencia de *B. melitensis* de  $2.8 \times 10^7$  ufc/ml con un  $a_w$  de 0.9708 y un pH de 7 y en el suero de la etapa desuerado fue de  $1 \times 10^7$  ufc/ml con un  $a_w$  de 0.969 y un pH de 6. (Cuadro 3).

CUADRO 3. Sobrevivencia de *Brucella melitensis* en los subproductos del queso fresco.

Queso fresco	<i>Brucella melitensis</i>	$a_w$	pH
Suero de la etapa del corte	$2.8 \times 10^7$ ufc/ml	0.9708	7
Suero del la etapa del desuerado	$1 \times 10^7$ ufc/ml	0.969	6

Se observó que en el suero de la etapa del corte se encontró una concentración de cantidad de  $2 \times 10^2$  ufc/ml de levaduras y en el suero de la etapa del desuerado fue de  $5 \times 10^3$  ufc/ml; en ninguno de los sueros se aislaron miceliados (Cuadro 4).

CUADRO 4. Aislamiento de levaduras y miceliados en los subproductos del queso fresco.

Etapas	Levaduras	Miceliados
Suero de la etapa del corte	$2 \times 10^2$ ufc/ml	0
Suero de la etapa del desuerado	$5 \times 10^3$ ufc/ml	0

### 3.1.1. Correlación entre la $a_w$ con la sobrevivencia de *B. melitensis*

No se encontró evidencia estadística de que la  $a_w$  esté relacionado con la sobrevivencia de *B. melitensis* ( $P > 0.05$ ) (Cuadro 5), es decir, que la  $a_w$  no influye con la sobrevivencia de *B. melitensis* en el queso fresco.

### 3.1.2. Correlación entre el pH con la sobrevivencia de *B. melitensis*

Se observó que el pH está relacionado con la sobrevivencia de *B. melitensis* ( $P < 0.05$ ) (Cuadro 5), es decir, a un pH 6 en el queso fresco la sobrevivencia es mayor.

### 3.1.3. Correlación entre el tiempo de elaboración con la sobrevivencia de *B. melitensis*

La correlación del tiempo de elaboración con la sobrevivencia de *B. melitensis* no muestra diferencia significativa ( $P > 0.05$ ), es decir, que el tiempo que se utiliza para la producción del producto lácteo no es suficiente para evitar la sobrevivencia en el queso fresco (Figura 14) (Cuadro 5).

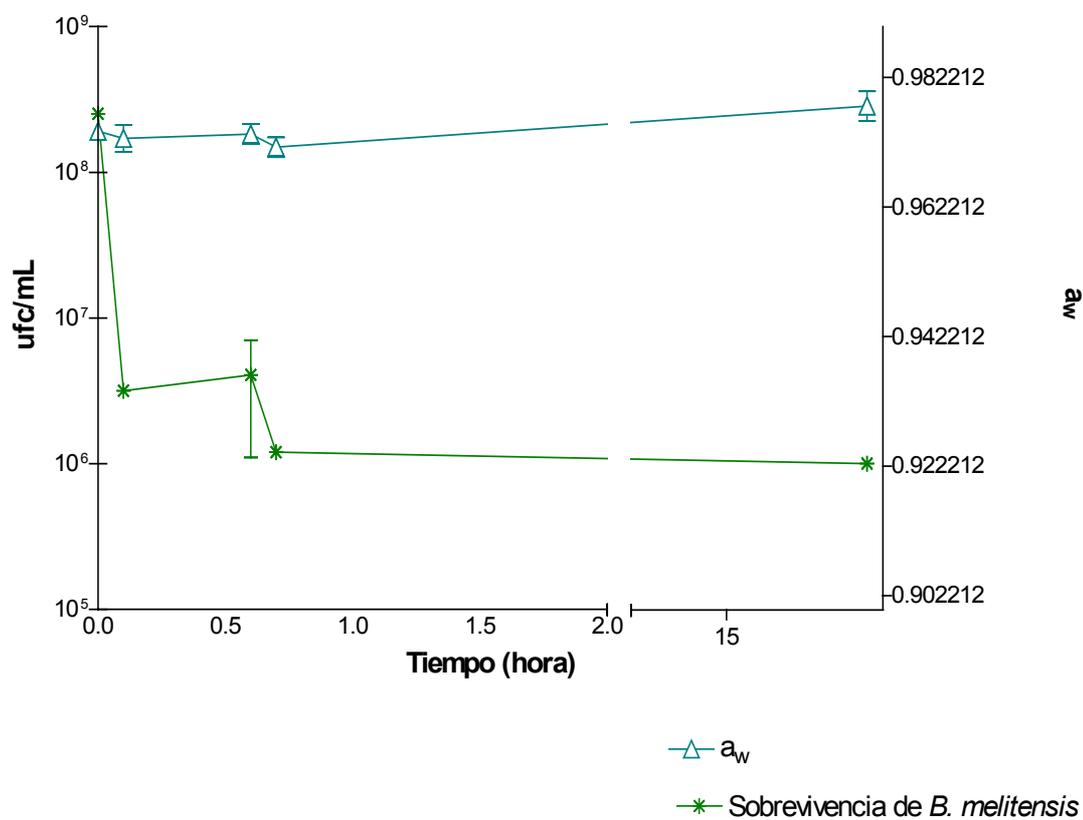


FIGURA 14. Sobrevivencia de *B. melitensis* en queso fresco.

### 3.1.4. Correlación entre el tiempo de elaboración con la $a_w$ del queso fresco

La correlación nos indica que no se halló evidencia estadística ( $P > 0.05$ ) entre el tiempo de elaboración del queso fresco con la actividad de agua, es decir, debido a que su proceso de elaboración es muy rápido, el producto presentó una mayor humedad y por lo consiguiente el tiempo no es suficiente para reducir la actividad del agua en el queso fresco (Figura 14) (Cuadro 5).

### 3.1.5. Correlación entre el tiempo de elaboración con el pH del queso fresco

Se observó que el tiempo de elaboración no es suficiente para modificar el pH en el queso fresco ( $P > 0.05$ ) (Figura 15) (Cuadro 5).

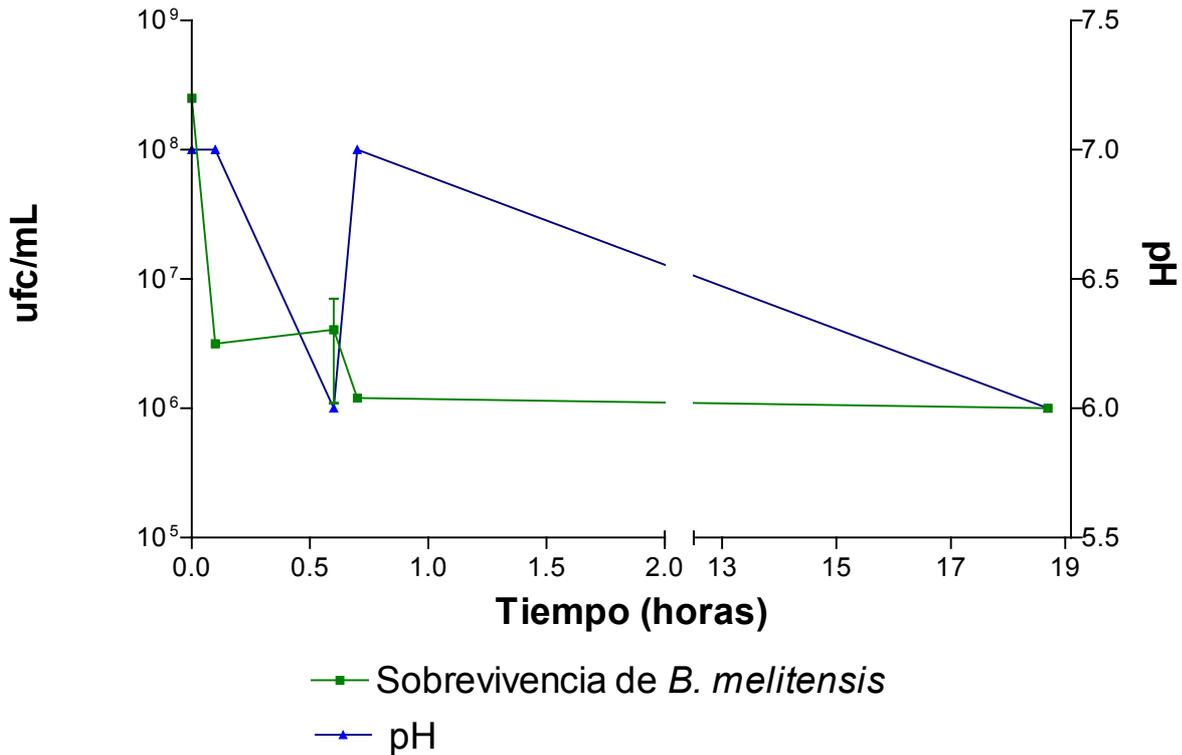


FIGURA 15. Sobrevivencia de *B. melitensis* en queso fresco.

### 3.1.6. Correlación entre el aislamiento de levaduras y miceliados

No se determinó evidencia estadística ( $P > 0.05$ ) de que la presencia de levaduras y miceliados interfieran con la sobrevivencia de *B. melitensis* en el queso fresco (Cuadro 5).

CUADRO 5. Coeficiente de correlación de Spearman en el queso fresco tipo “panela”.

Queso fresco tipo “panela”	n	Coeficiente de correlación $r_s$	Valor crítico para el coeficiente $r_s$	Probabilidad	La correlación es significativa?
			Nivel de significancia		
			0.05		
Correlación entre la $a_w$ con la sobrevivencia de <i>Brucella melitensis</i>	5	-0.3	0.8000	P>0.05	NO
Correlación entre el pH con la sobrevivencia de <i>Brucella melitensis</i>	5	0.9	0.8000	P<0.05	SI
Correlación entre el tiempo con la sobrevivencia de <i>B. melitensis</i>	5	-0.9	0.8000	P>0.05	NO
Correlación entre el tiempo con la $a_w$	5	0.1	0.8000	P>0.05	NO
Correlación entre el tiempo con el pH	5	0.1	0.8000	P>0.05	NO
Correlación entre la presencia de levaduras con la sobrevivencia de <i>B. melitensis</i>	5	-0.1	0.8000	P>0.05	NO
Correlación entre la presencia de miceliados con la sobrevivencia de <i>B. melitensis</i>	5	0.5	0.8000	P>0.05	NO

n = número de muestras

### 3.2. Queso semi-madurado a 24°C

Se encontró que el aislamiento de *B. melitensis* fue posible hasta los 15 días de maduración en una concentración de  $1 \times 10^4$  ufc/g con un  $a_w$  de 0.8999 y con un pH de 4 (Cuadro 6), no se aislaron levaduras ni miceliados en la etapa de maduración II (15 días de elaboración del queso semi-madurado a 24°C) (Cuadro 7), de acuerdo a la NOM-121-SSA1-1994 no rebasó los límites permisibles de 500 ufc/g de levaduras y hongos para quesos madurados.

El queso preparado de manera comercial presentó una  $a_w$  de 0.8568, con un pH de 4.14 y  $5 \times 10^3$  ufc/g y  $1 \times 10^2$  ufc/g de miceliados. A diferencia del queso semi-madurado a 24°C sin leche previamente pasteurizada presentó un  $a_w$  de 0.8762, pH de 4 y cero ufc/g de levaduras y miceliados.

CUADRO 6. Sobrevivencia de *Brucella melitensis* durante la elaboración del semi-madurado a 24°C.

ETAPAS	<i>Brucella melitensis</i>	$a_w$	pH
Leche inoculada	$50 \times 10^8$ ufc/ml	0.981	7
Templado 24h	$10 \times 10^6$ ufc/ml	0.979	7
Incubación 24h	$8 \times 10^6$ ufc/g	0.977	4
Corte 10 min	$1 \times 10^6$ ufc/g	0.9664	4
Desuerado 18h	$2 \times 10^5$ ufc/g	0.9708	4
Inmersión En Salmuera 30m	$1 \times 10^5$ ufc/g	0.92	4
Maduración I a temperatura ambiente	$1 \times 10^4$ ufc/g	0.911	4
Maduración II a temperatura ambiente	$1 \times 10^4$ ufc/g	0.8999	4
Maduración III a temperatura ambiente	0	0.8762	4

CUADRO 7. Aislamiento de levaduras y miceliados durante la elaboración del queso semi-madurado a 24°C.

Etapas	Levaduras	Miceliados
Leche	0	0
Templado 24h	$3 \times 10^1$ ufc/ml	0
Incubación 24h	$1 \times 10^1$ ufc/g	0
Corte 10 min	0	
Desuerado 18h	$22 \times 10^3$ ufc/g	0
Inmersión en salmuera 30min	$12 \times 10^3$ ufc/g	0
Maduración I a temperatura ambiente	$1 \times 10^2$ ufc/g	0
Maduración II a temperatura ambiente	0	0
Maduración III a temperatura ambiente	0	0

En la figura 16 se pueden observar gráficamente los valores del  $a_w$  medidos en las diferentes etapas de elaboración del queso semi-madurado a temperatura ambiente.

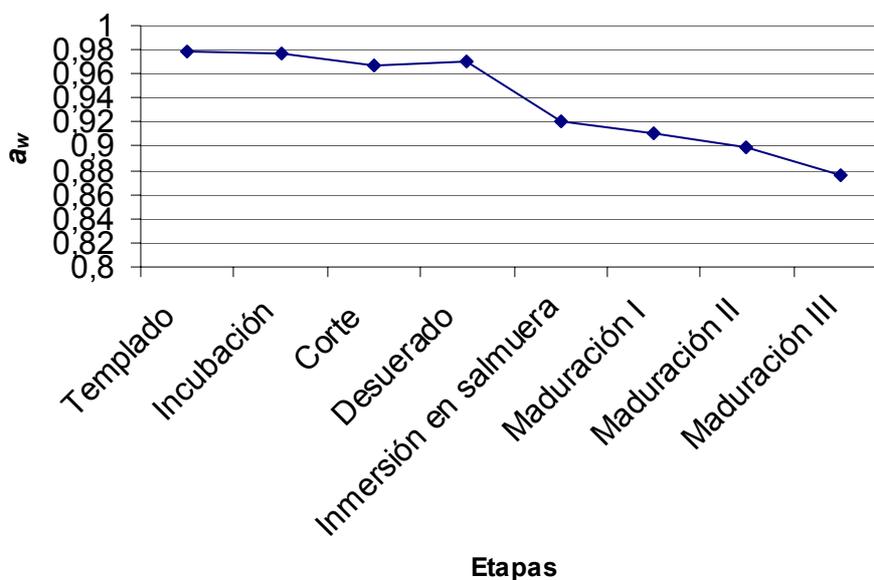


FIGURA 16. Sobrevivencia de *B. melitensis* con relación de las diferentes etapas de elaboración del queso semi-madurado 24°C.

En la figura 17 se observan los valores del pH determinados en las diferentes etapas de elaboración del queso semi-madurado.

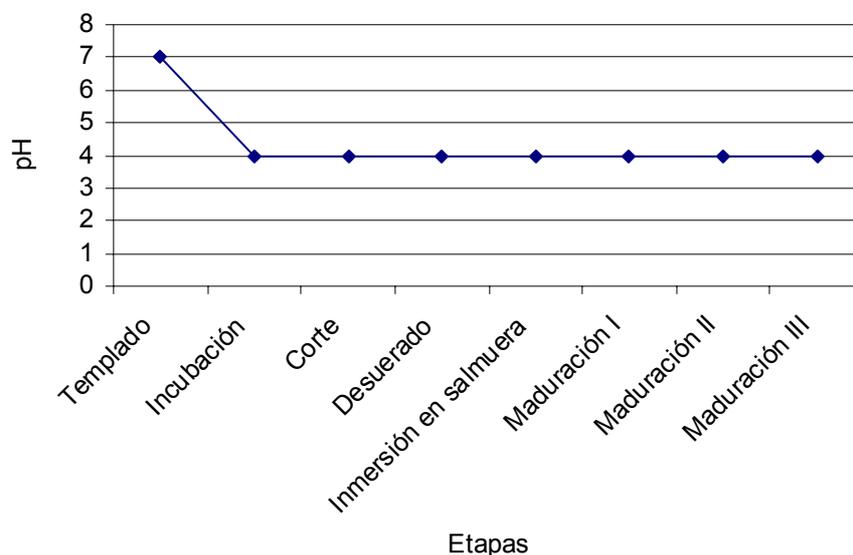


FIGURA 17. Valores del pH con respecto a las diferentes etapas de elaboración del queso semi-madurado a 24°C.

En el suero de la etapa del corte se encontró una sobrevivencia de *B. melitensis* de  $2 \times 10^6$  ufc/ml con un  $a_w$  de 0.9694, con un pH de 4; en el suero de la etapa del desuerado se encontró una sobrevivencia de  $10 \times 10^5$  ufc/ml, con una  $a_w$  de 0.9798 y un pH de 5 (Cuadro 8).

CUADRO 8. Sobrevivencia de *Brucella melitensis* en los subproductos del queso semi-madurado a 24°C.

	<i>Brucella melitensis</i>	$a_w$	pH
Suero de la etapa del corte	$2 \times 10^6$ ufc/ ml	0.9694	4
Suero de la etapa del desuerado	$10 \times 10^5$ ufc/ml	0.9798	5

En el cuadro 9 se observó que en el suero de la etapa del corte se aisló  $8 \times 10^1$  ufc/ml de levaduras y en el suero de la etapa del desuerado  $11 \times 10^3$  ufc/ml de levaduras, no se aislaron miceliados en ninguno de los sueros.

CUADRO 9. Aislamiento de levaduras y miceliados en los subproductos del queso semi-madurado a 24°C.

Étapas	Levaduras	Miceliados
Suero de la etapa del corte	8 x 10 <sup>1</sup> ufc/ml	0
Suero de la etapa del desuerado	11 x 10 <sup>3</sup> ufc/ml	0

### 3.2.1. Correlación entre la $a_w$ con la sobrevivencia de *B. melitensis*

Se encontró que existe evidencia estadística ( $P < 0.01$ ) entre la sobrevivencia de *B. melitensis* con respecto al  $a_w$ , es decir, al disminuir la  $a_w$  en el queso la sobrevivencia es menor (Cuadro 10).

### 3.2.2. Correlación entre el pH con la sobrevivencia de *B. melitensis*

La correlación del pH con la sobrevivencia de *B. melitensis* se encontró evidencia estadística ( $P < 0.01$ ), es decir, al reducirse el pH en el queso semi-madurado a 24°C la sobrevivencia decrece (Cuadro 10).

### 3.2.5. Correlación entre el tiempo de maduración con la sobrevivencia de *B. melitensis*

Al aumentar los días de maduración en el queso semi-madurado a 24°C la sobrevivencia es menor o nula como se observó en el presente trabajo que a los 30 días de maduración ya no se determinó la presencia de *B. melitensis*, estadísticamente esta es una correlación de tipo negativo ( $P < 0.01$ ) (Figura 18) (Cuadro 10).

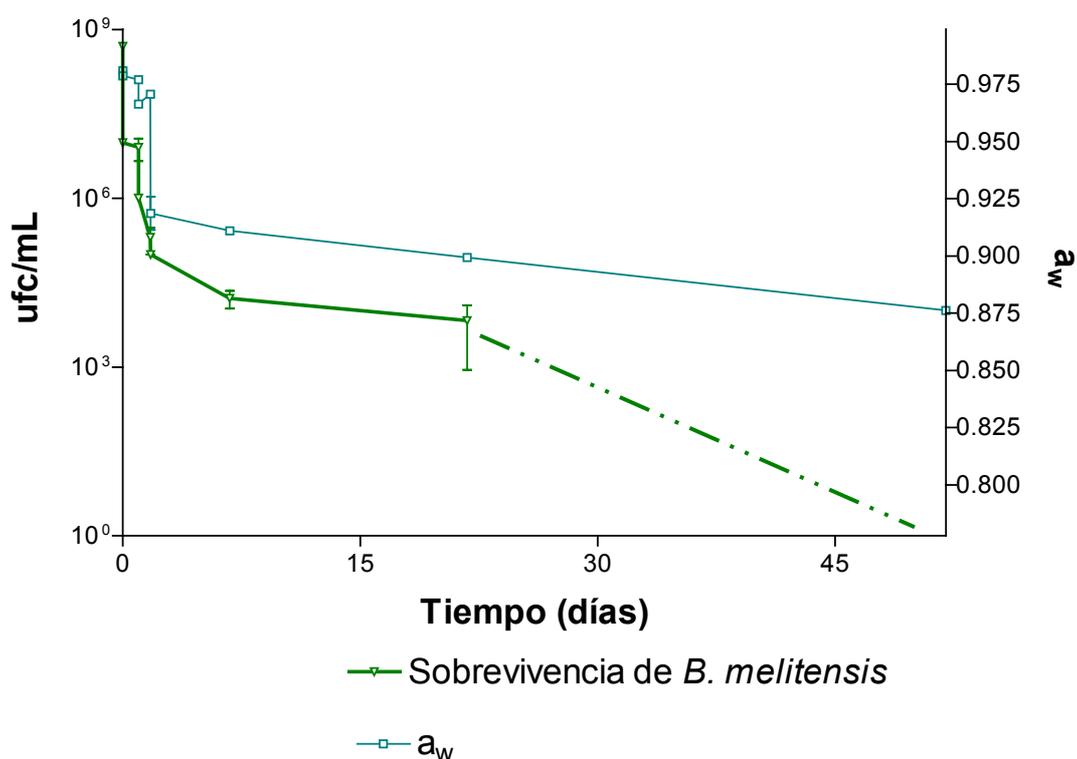


FIGURA 18. Sobrevivencia de *B. melitensis* en queso semi-madurado a 24°C.

### 3.2.4. Correlación entre el tiempo de maduración con la $a_w$ del queso semi-madurado a 24°C

Se observó que conforme se aumentaban los días de maduración en el queso semi-madurado a 24°C la actividad de agua decrecía ( $P < 0.01$ ), estadísticamente es una correlación de tipo negativo (Figura 17) (Cuadro 10).

### 3.2.5. Correlación entre el tiempo de maduración con el pH del queso semi-madurado a 24°C

No se encontró evidencia estadística ( $P > 0.05$ ) de que el tiempo de maduración modificara el pH en el queso semi-madurado a 24°C (Figura 19) (Cuadro 10).

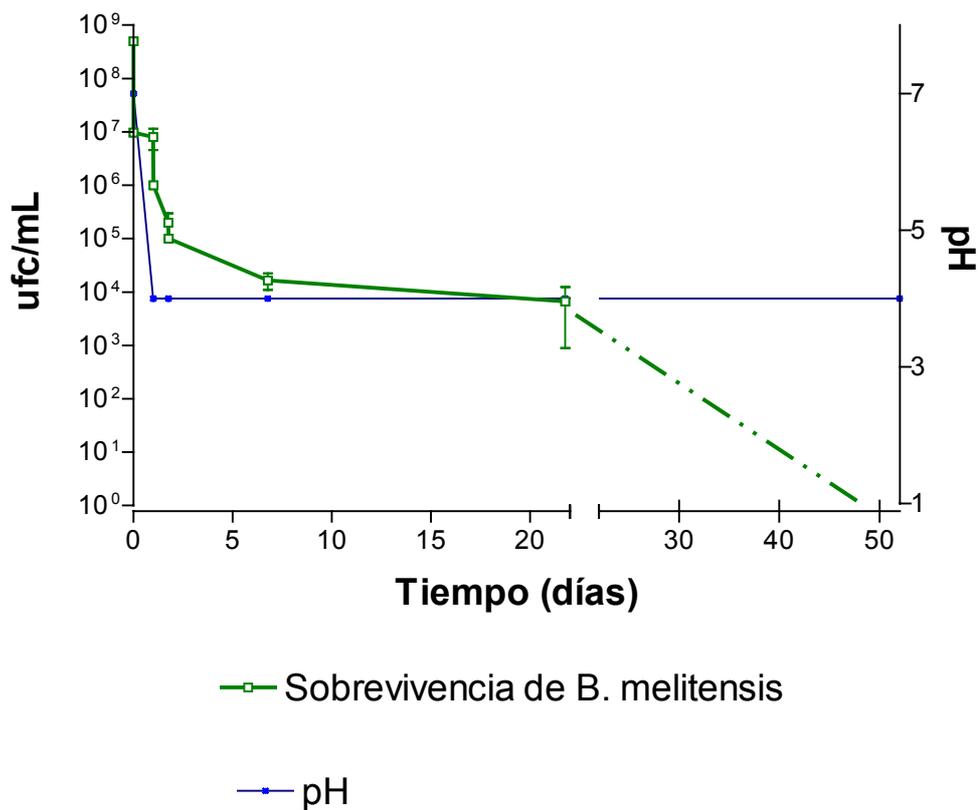


FIGURA 19. Sobrevivencia de *B. melitensis* en queso semi-madurado a 24°C.

### 3.2.6. Correlación entre el aislamiento de levaduras y miceliados

No se encontró ( $P>0.05$ ) que la presencia de levaduras y miceliados en el queso semi-madurado a 24°C modificaran en la sobrevivencia de *B. melitensis* (Cuadro 10).

CUADRO 10. Coeficiente de correlación de Spearman en el queso semi-madurado a 24°C.

Queso semi-madurado a 24°C	n	Coeficiente de correlación ( $r_s$ )	Valor crítico para el coeficiente ( $r_s$ )		Probabilidad	La correlación es significativa?
			Nivel de Significancia			
			0.05	0.01		
Correlación entre la $a_w$ con la sobrevivencia de <i>Brucella melitensis</i>	9	0.979	0.5833	0.7667	P<0.01	SI
Correlación entre el pH con la sobrevivencia de <i>Brucella melitensis</i>	9	0.77	0.5833	0.7667	P<0.01	SI
Correlación entre el tiempo de maduración con la sobrevivencia de <i>B. melitensis</i>	9	-0.99	0.5833	0.7667	P<0.01	SI
Correlación entre el tiempo de maduración con la $a_w$	9	-0.98	0.5833	0.7667	P<0.01	SI
Correlación entre el tiempo de maduración con el pH	9	-0.29	0.5833	0.7667	P>0.05	NO
Correlación entre la presencia de levaduras con la sobrevivencia de <i>B. melitensis</i>	9	0.03	0.5833	0.7667	P>0.05	NO
Correlación entre la presencia de miceliados con la sobrevivencia de <i>B. melitensis</i>	9	0.5	0.5833	0.7667	P>0.05	NO

n = número de muestras

### 3.3. Queso semi-madurado a 24°C (con leche previamente pasteurizada o condiciones controladas)

En el queso semi-madurado se encontró que el aislamiento de *B. melitensis* fue posible hasta la etapa de corte con  $3 \times 10^4$  ufc/g, en las demás etapas no se aisló el microorganismo; en la etapa de maduración III (30 días de maduración) presentó un  $a_w$  de 0.527 y un pH de 5 (Cuadro 11).

CUADRO 11. Sobrevivencia de *Brucella melitensis* durante la elaboración del queso semi-madurado a 24°C (en condiciones controladas).

ETAPAS	<i>Brucella melitensis</i>	$a_w$	pH
Leche		0.9698	7
Pasteurización 63°C /30 min		0.9688	7
Leche inoculada	$50 \times 10^8$ ufc/ml	0.9688	7
Templado 24h	$24 \times 10^4$ ufc/ml	0.9677	7
Incubación 24h	$8 \times 10^4$ ufc/g	0.967	5
Corte 10 min	$3 \times 10^4$ ufc/g	0.9644	5
Desuerado 18h	0	0.9608	4
Inmersión en salmuera 30min	0	0.8754	4
Maduración I a temperatura ambiente	0	0.8462	5
Maduración II a temperatura ambiente	0	0.7454	5
Maduración III a temperatura ambiente	0	0.527	5

En el producto final de la elaboración del queso semi-madurado (etapa de maduración III) no se aislaron levaduras ni miceliados y de acuerdo a la NOM-121-SSA1-1994 se encontró dentro de los límites permisibles (los límites permisibles son 500 ufc/g de levaduras y miceliados) (Cuadro 12).

CUADRO 12. Aislamiento de levaduras y miceliados los subproductos del queso semi-madurado a 24° (condiciones controladas).

Etapas	Levaduras	Miceliados
Leche	$3 \times 10^2$ ufc/ml	$2 \times 10^2$ ufc/ml
Pasteurización 63°C /30 min	0	0
Templado 24h	0	0
Incubación 24h	0	$1 \times 10^3$ ufc/g
Corte 10 min	$1 \times 10^2$ ufc/g	$1 \times 10^3$ ufc/g
Desuerado 18h	$24 \times 10^2$ ufc/g	0
Inmersión en salmuera 30min	$19 \times 10^2$ ufc/g	0
Maduración I a temperatura ambiente	$17 \times 10^2$ ufc/g	0
Maduración II a temperatura ambiente	0	0
Maduración III a temperatura ambiente	0	0

En la figura 20 se observan gráficamente los valores de  $a_w$  con respecto a las diferentes etapas de elaboración del queso semi-madurado y en la figura 21 se observan los valores del pH con respecto a las diferentes etapas de elaboración del queso semi-madurado.

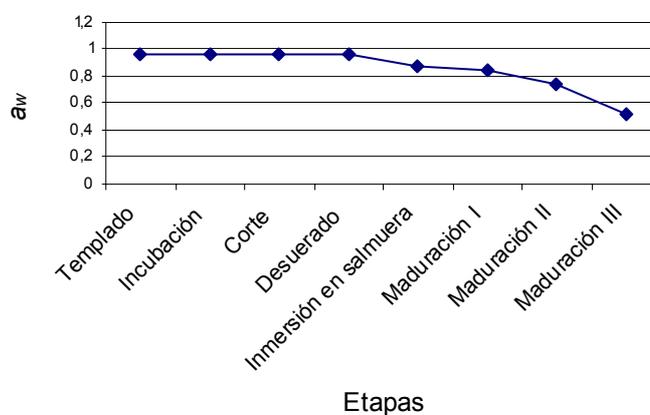


FIGURA 20. Valores de  $a_w$  en las diferentes etapas de elaboración del queso semi-madurado a 24°C (en condiciones controladas).

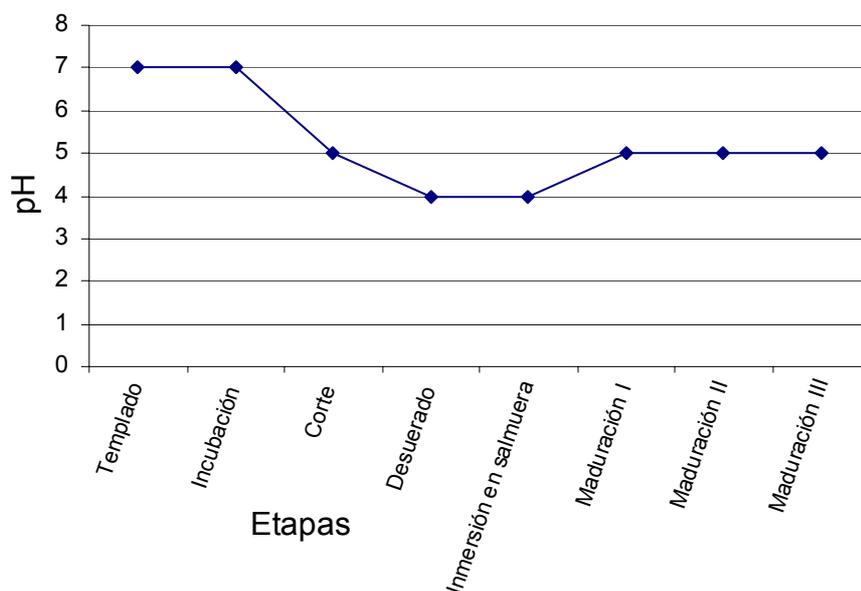


FIGURA 21. Valores del pH en las diferentes etapas de elaboración del queso semi-madurado a 24°C (en condiciones controladas).

En el suero de la etapa del corte se encontró una sobrevivencia de *B. melitensis* de  $6 \times 10^3$  ufc/ml con un  $a_w$  de 0.965 y un pH de 4 y en el suero de la etapa del desuerado se encontró una sobrevivencia de  $1 \times 10^3$  ufc/ml de *B. melitensis* con un  $a_w$  de 0.9664 y un pH de 4 (Cuadro 13).

CUADRO 13. Sobrevivencia de los subproductos del queso semi-madurado (en condiciones controladas).

ETAPAS	<i>Brucella melitensis</i>	$a_w$	pH
Suero de la etapa del corte	$6 \times 10^3$ ufc/ml	0.965	4
Suero de la etapa del desuerado	$1 \times 10^3$ ufc/ml	0.9664	4
Líquido de la salmuera	0	0.823	5

En el cuadro 14 se observa que en el suero de la etapa del corte se encontró 3 levaduras  $\times 10^2$  ufc/ml y 2 miceliados  $\times 10^2$  ufc/ml, sin embargo en el suero de la etapa del desuerado no se aislaron levaduras ni miceliados.

CUADRO 14. Aislamiento de levaduras y miceliados en los subproductos del queso semi-madurado a 24°C (en condiciones controladas).

Étapas	Levaduras	Miceliados
Suero de la etapa del corte	3 x 10 <sup>2</sup> ufc/ml	2 x 10 <sup>2</sup> ufc/ml
Suero de la etapa del desuerado	0	0

### 3.3.1. Correlación entre la $a_w$ con la sobrevivencia de *B. melitensis*

Se encontró evidencia estadística con una  $P < 0.01$  que indicó que al disminuir la  $a_w$  en el queso semi-madurado a 24°C con leche previamente pasteurizada la sobrevivencia de *B. melitensis* fue menor (Cuadro 15).

### 3.3.2. Correlación entre la pH con la sobrevivencia de *B. melitensis*

7

Al disminuir el pH en el queso semi-madurado a 24°C con leche previamente pasteurizada se encontró que la sobrevivencia de *B. melitensis* fue menor con una  $P < 0.01$  (Cuadro 15).

### 3.3.3. Correlación entre el tiempo de maduración con la sobrevivencia de *B. melitensis*

Al incrementarse el tiempo de maduración la presencia de *B. melitensis* fue menor en el queso con una  $P < 0.05$  (Figura 22) (Cuadro 15).

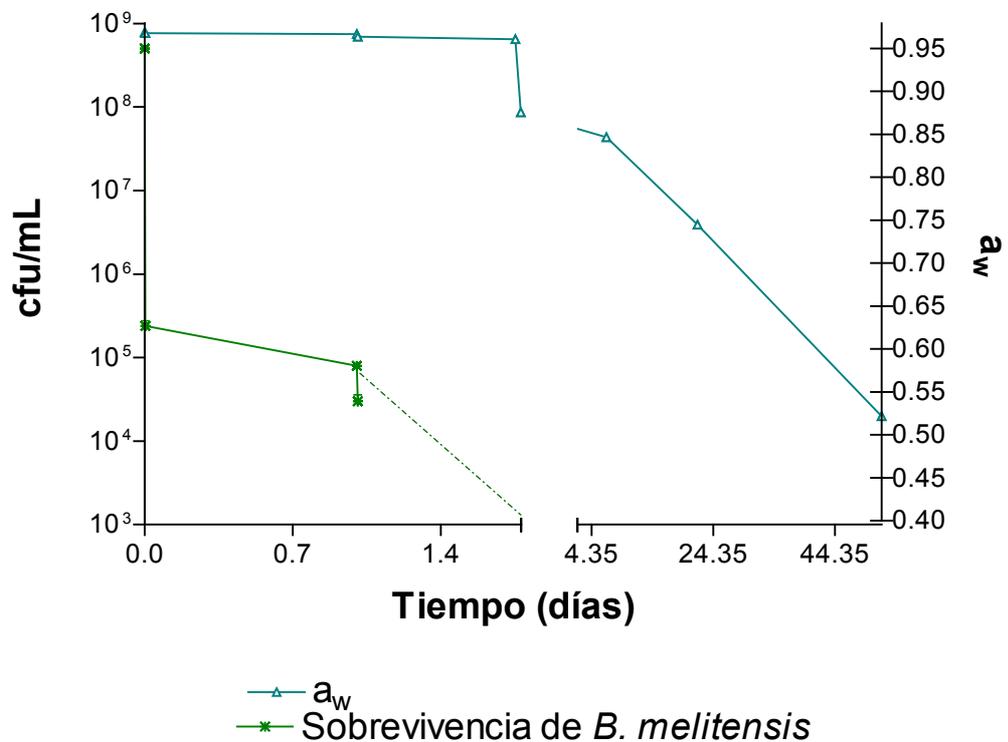


FIGURA 22. Sobrevivencia de *B. melitensis* en queso semi-madurado a 24°C con leche previamente pasteurizada.

### 3.3.4. Correlación entre el tiempo de maduración con la $a_w$ del queso semi-madurado

Al aumentar el tiempo de maduración en el queso semi-madurado a 24°C con leche previamente pasteurizada se disminuyó la  $a_w$  estadísticamente fue significativa con una  $P < 0.01$  (Figura 21) (Cuadro 15).

### 3.3.5. Correlación entre el tiempo de maduración con el pH del queso semi-madurado

No se encontró evidencia estadística ( $P > 0.05$ ) de que el tiempo de maduración este relacionado con la disminución del pH en el queso semi-madurado a 24°C con leche previamente pasteurizada (Figura 23) (Cuadro 15).

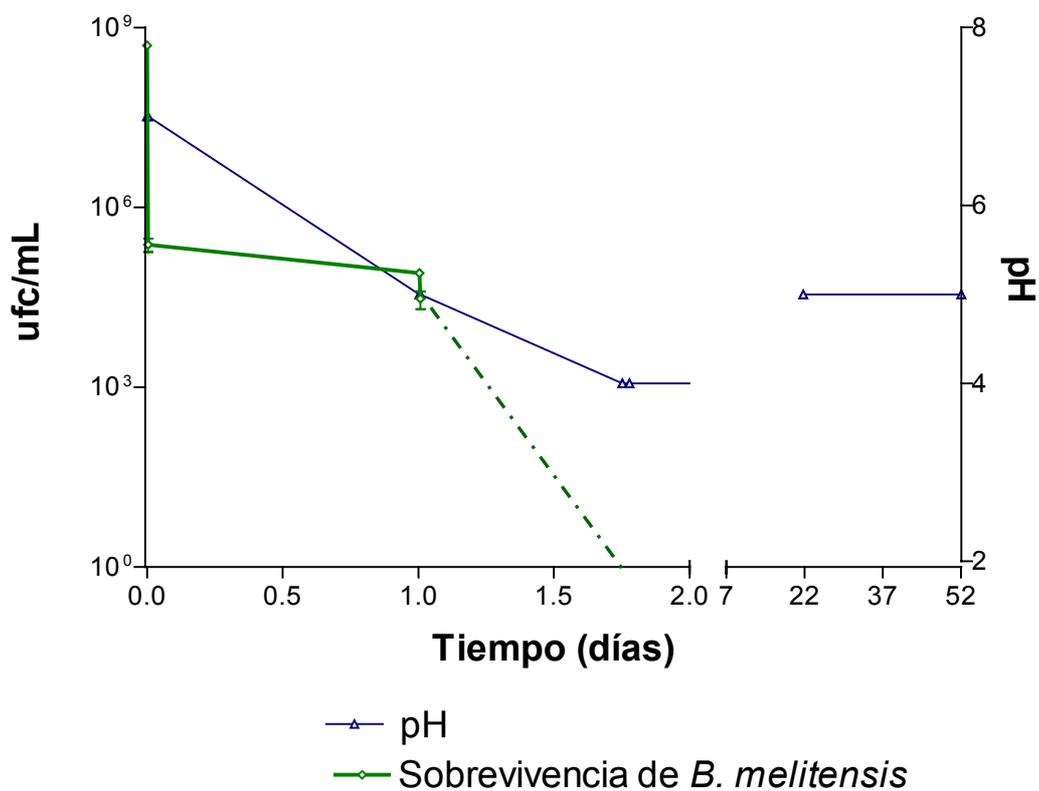


FIGURA 23. Sobrevivencia de *B. melitensis* en queso semi-madurado a 24°C con leche previamente pasteurizada.

### 3.3.6. Correlación entre la presencia de levaduras y miceliados

La presencia de levaduras y miceliados en el queso semi-madurado a 24°C con leche previamente pasteurizada no influyen en la sobrevivencia de *B. melitensis* ( $P > 0.05$ ) (Cuadro 15).

CUADRO 15. Coeficiente de correlación de Spearman en el queso semi-madurado a 24°C (condiciones controladas).

Queso semi-madurado a 24°C	n	Coeficiente de correlación ( $r_s$ )	Valor crítico para el coeficiente ( $r_s$ )		Probabilidad	La correlación es significativa?
			Nivel de Significancia			
			0.05	0.01		
Correlación entre la $a_w$ con la sobrevivencia de <i>Brucella melitensis</i>	9	0.9125	0.5833	0.7667	P<0.01	SI
Correlación entre el pH con la sobrevivencia de <i>Brucella melitensis</i>	9	0.820	0.5833	0.7667	P<0.01	SI
Correlación entre el tiempo de maduración con la sobrevivencia de <i>B. melitensis</i>	9	-0.75	0.5833	0.7667	P<0.05	SI
Correlación entre el tiempo de maduración con la $a_w$	9	-0.99	0.5833	0.7667	P<0.01	SI
Correlación entre el tiempo de maduración con el pH	9	-0.4	0.5833	0.7667	P>0.05	NO
Correlación entre la presencia de levaduras con la sobrevivencia de <i>B. melitensis</i>	9	-0.2	0.5833	0.7667	P>0.05	NO
Correlación entre la presencia de miceliados con la sobrevivencia de <i>B. melitensis</i>	9	0.5	0.5833	0.7667	P>0.05	NO

n = número de muestras

### 3.4. Queso semi-madurado a 4°C

En el caso del queso semi-madurado a 4°C se encontró sobrevivencia de *B. melitensis* hasta la etapa de maduración III con  $1 \times 10^3$  ufc/g con una  $a_w$  de 0.9 y un pH 5 (Cuadro 16).

CUADRO 16. Sobrevivencia de *Brucella melitensis* durante la elaboración del semi-madurado a 4°C.

ETAPAS	<i>Brucella melitensis</i> ufc/ml o ufc/g	$a_w$	pH
Leche inoculada	$50 \times 10^8$	0.974	7
Templado 24 h	$25 \times 10^6$	0.9706	7
Incubación 24 h	$3 \times 10^6$	0.968	5
Corte 10 min	$1 \times 10^6$	0.9668	5
Desuerado 18 h	$2 \times 10^5$	0.9668	4
Inmersión en salmuera 30 min	$6 \times 10^4$	0.9208	4
Maduración I a 4°C	$5 \times 10^4$	0.9174	5
Maduración II a 4°C	$1 \times 10^4$	0.9071	5
Maduración III a 4°C	$1 \times 10^3$	0.9	5

En el producto final de la elaboración del queso semi-madurado a 4°C (maduración III) se encontraron levaduras a una concentración de  $1 \times 10^2$  ufc/g y no se aislaron miceliados, de acuerdo a la NOM-121-SSA1-1994 de hongos y levaduras los valores encontrados no rebasa los límites permisibles en donde mencionan que el límite permisible es de 500 ufc/g. (Cuadro 17).

CUADRO 17. Aislamiento de levaduras y miceliados los subproductos del queso semi-madurado a 4°C.

Etapas	Levaduras	Miceliados
Leche	$35 \times 10^2$ ufc/ml	$2 \times 10^2$ ufc/ml
Templado 24h	$47 \times 10^2$ ufc/ml	0
Incubación 24h	$19 \times 10^3$ UFC/g	0
Corte 10 min	0	0
Desuerado 18h	$8 \times 10^1$ ufc/g	0
Inmersión en salmuera 30min	$50 \times 10^1$ ufc/g	0
Maduración I a 4°C	$45 \times 10^3$ ufc/g	0
Maduración II a 4°C	$31 \times 10^2$ ufc/g	0
Maduración III a 4°C	$1 \times 10^2$ ufc/g	0

En la figura 24 se presentan los valores del  $a_w$  y en la figura 25 los valores del pH con respecto a las diferentes etapas de elaboración del queso semi-madurado a 4°C.

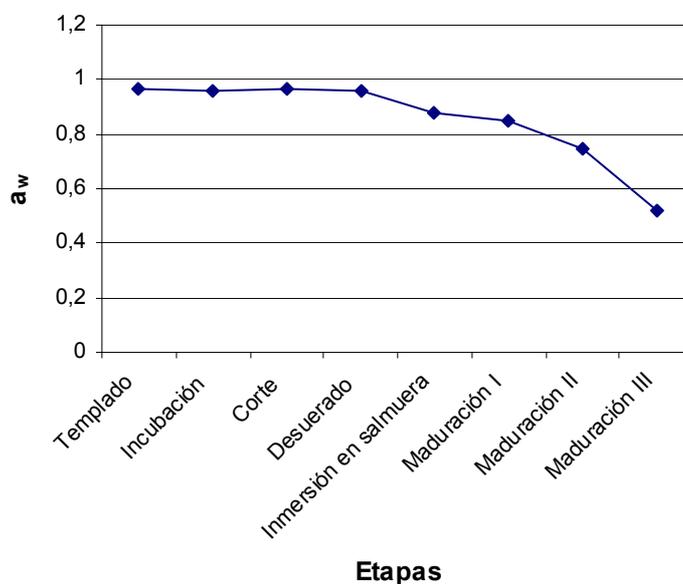


FIGURA 24. Valores de  $a_w$  en las diferentes etapas de elaboración del queso semi-madurado a 4°C

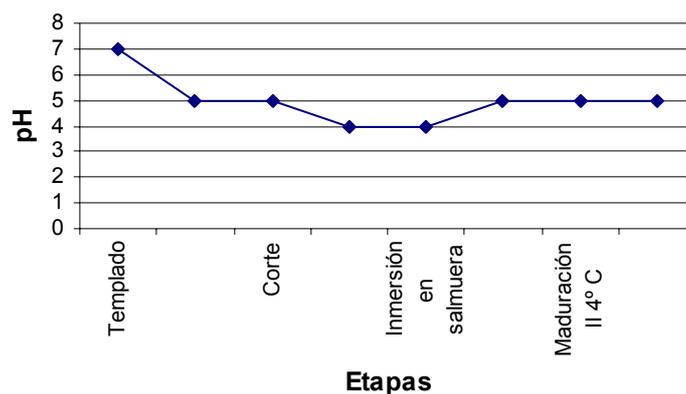


FIGURA 25. Valores del pH en los subproductos del queso semi-madurado a 4°C.

En el suero de la etapa del corte se encontró sobrevivencia de *B. melitensis* de  $2 \times 10^6$  ufc/ml y con  $a_w$  de 0.9652 y un pH de 5 en el caso del suero de la etapa del desuerado se encontró sobrevivencia de *B. melitensis* de  $10 \times 10^5$  ufc/ml con un  $a_w$  de 0.9544 y un pH de 4 (Cuadro 18).

CUADRO 18. Sobrevivencia de los subproductos del queso semi-madurado a 4°C.

ETAPAS	<i>Brucella melitensis</i>	$a_w$	pH
Suero de la etapa del corte	$2 \times 10^6$ ufc/ml	0.9652	5
Suero de la etapa del desuerado	$10 \times 10^5$ ufc/ml	0.9544	4

En el suero de la etapa del desuerado  $4 \times 10^1$  ufc/ml levaduras y 0 ufc/ml de miceliados, en el suero de la etapa del corte no se aislaron levaduras ni miceliados (Cuadro 19).

CUADRO 19. Aislamiento de levaduras y miceliados en los subproductos del queso semi-madurado a 4°C.

Etapas	Levaduras	Miceliados
Suero de la etapa del corte	0	0
Suero de la etapa del desuerado	$4 \times 10^1$ ufc/ml	0

### 3.4.1. Correlación entre la $a_w$ con la sobrevivencia de *B. melitensis*

Se encontró evidencia estadística ( $P < 0.01$ ) con una correlación de tipo positivo. Al disminuir la  $a_w$  en el queso semi-madurado a  $4^\circ\text{C}$  la sobrevivencia de *B. melitensis* es menor (Cuadro 20).

### 3.4.2. Correlación entre el pH con la sobrevivencia de *B. melitensis*

Se encontró que estadísticamente el descenso del pH en el queso no influye con la reducción de *B. melitensis* ( $P > 0.05$ ) (Cuadro 20).

### 3.4.3. Correlación entre el tiempo de maduración con la sobrevivencia de *B. melitensis*

Se determinó que existe evidencia estadística ( $P < 0.01$ ) de que a mayor tiempo de maduración en el queso semi-madurado a  $4^\circ\text{C}$  la sobrevivencia de *B. melitensis* es menor (Figura 26) (Cuadro 20).

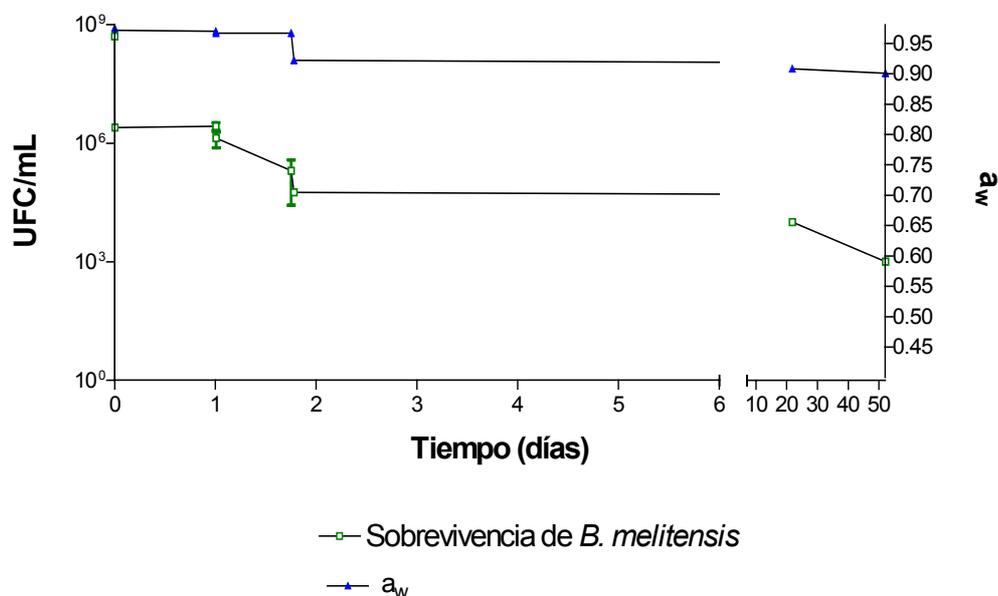


FIGURA 26. Sobrevivencia de *B. melitensis* en queso semi-madurado a  $4^\circ\text{C}$ .

### 3.4.4. Correlación entre el tiempo de maduración con la $a_w$ del queso semi-madurado

Se observó que al incrementar los días de maduración en el queso semi-madurado a 4°C la sobrevivencia de *B. melitensis* es menor, es decir, es una correlación de tipo negativo con una  $P < 0.01$  (Figura 25) (Cuadro 20).

### 3.4.5. Correlación entre el tiempo de maduración con el pH del queso semi-madurado

No se encontró evidencia estadística ( $P > 0.05$ ) de que el tiempo de maduración esté correlacionado con el pH del queso semi-madurado a 4°C (Figura 27) (Cuadro 20).

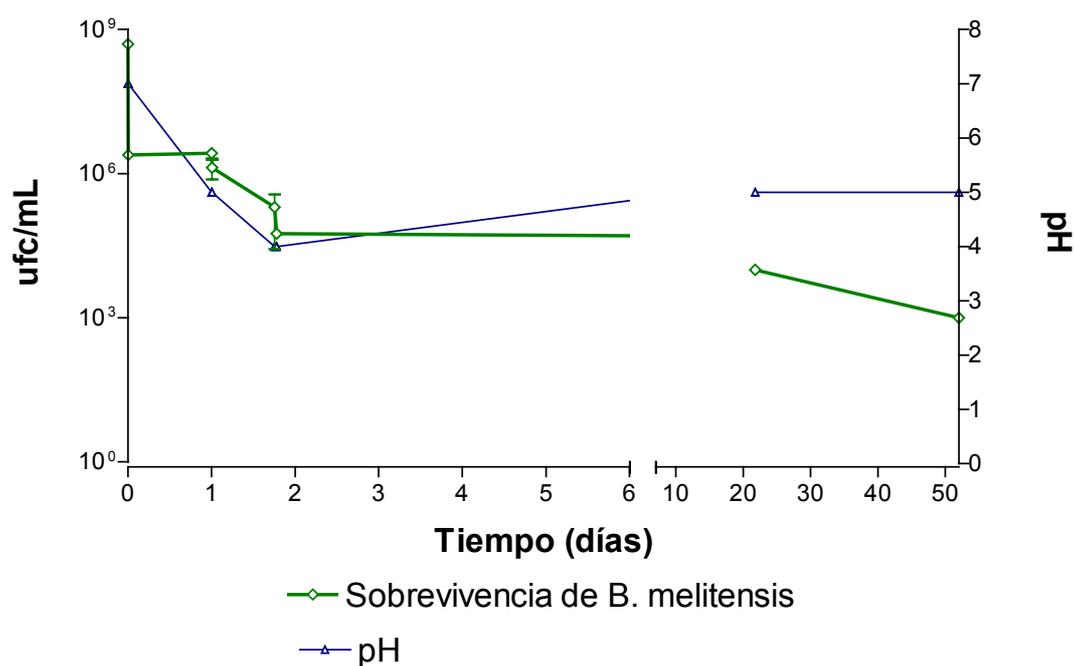


FIGURA 27. Sobrevivencia de *B. melitensis* en queso semi-madurado a 4°C.

### 3.4.6. Correlación entre la presencia de levaduras y miceliados

Estadísticamente ( $P > 0.05$ ) la presencia de levaduras y miceliados intervienen con la con la sobrevivencia de *B. melitensis* en el queso semi-madurado 4°C (Cuadro 20).

CUADRO 20. Coeficiente de correlación de Spearman en el queso semi-madurado a 4°C.

Queso semi-madurado a 4°C	n	Coeficiente de correlación ( $r_s$ )	Valor crítico par el coeficiente ( $r_s$ )		Probabilidad	La correlación es significativa?
			Nivel de Significancia			
			0.05	0.01		
Correlación entre la $a_w$ con la sobrevivencia de <i>Brucella melitensis</i>	9	0.995	0.5833	0.7667	$P < 0.01$	SI
Correlación entre el pH con la sobrevivencia de <i>Brucella melitensis</i>	9	0.5583	0.5833	0.7667	$P > 0.05$	NO
Correlación entre el tiempo de maduración con la sobrevivencia de <i>B. melitensis</i>	9	-1	0.5833	0.7667	$P < 0.01$	SI
Correlación entre el tiempo de maduración con la $a_w$	9	-0.9875	0.5833	0.7667	$P < 0.01$	SI
Correlación entre el tiempo de maduración con el pH	9	-0.4	0.5833	0.7667	$P > 0.05$	NO
Correlación entre presencia de levaduras con la sobrevivencia de <i>B. melitensis</i>	9	0.2	0.5833	0.7667	$P > 0.05$	NO
Correlación entre presencia de miceliados con la sobrevivencia de <i>B. melitensis</i>	9	0.54	0.5833	0.7667	$P > 0.05$	NO

n = número de muestras

### 3.5. Análisis del HACCP en los diferentes quesos

Mediante el análisis del HACCP se determinó que en el queso fresco el punto crítico es la recepción de la leche de cabra (Cuadro 21 y 22).

CUADRO 21. Hoja de análisis de peligros del queso fresco.

Etapas del proceso	Identificar peligros potenciales	Hay un peligro significativo para la inocuidad ? Si/No	Justificar la decisión anterior	Es un PCC? Si/No
Recepción	<i>B. melitensis</i>	Si	El hato de donde se tomó la leche posee un certificado libre de brucelosis. Sin embargo la leche no se somete a ningún proceso de pasteurización, las muestras se conservaron a temperatura de 4°C en frascos estériles.	Si
Templado	No	No	Se conserva en frascos estériles.	No
Cuajada	No	No	Se acidifica el medio mediante la aplicación de enzimas coagulantes (cuajo).	No
Corte	No	No	Se realiza con espátulas estériles.	No
Desuerado	No	No	Se encuentra en condiciones de esterilidad.	No

CUADRO 22. Respuestas al árbol de decisiones del queso fresco.

Etapa	Peligros	Respuesta al árbol de decisiones				PCC
Recepción	<i>B. melitensis</i>	Si	Si	No	-	Si
Templado	No	No	No	-	-	No
Cuajada	No	No	No	-	-	No
Corte	No	No	No	-	-	No
Desuerado	No	No	No	-	-	No

En el queso semi-madurado a 24°C y 4°C se determinó que mediante el HACCP el punto crítico es la maduración III (Cuadro 23, 24, 25y 26).

CUADRO 23. Hoja de análisis de peligros del queso semi-madurado a 24°C.

Etapas del proceso	Identificar peligros potenciales	Hay un peligro significativo para la inocuidad? Si/No	Justificar la decisión anterior	Es un PCC? Si/No
Recepción	<i>B. melitensis</i>	Si	El hato de donde se tomó la leche posee un certificado libre de brucelosis. Sin embargo la leche no se somete a ningún proceso de pasteurización, las muestras se conservaron a temperatura de 4°C en frascos estériles.	No
Templado	No	No	Se conserva en frascos estériles.	No
Incubación	No	No	El cultivo iniciador viene liofilizado.	No
Corte	No	No	Se realiza con una espátula estéril.	No
Desuerado	No	No	Se conservan en recipientes estériles.	No
Salmuera	<i>B. melitensis</i>	Si	La salmuera contiene una concentración del 18% de sal, pH 5 y $a_w$ 0.823, evita la proliferación de los microorganismos.	No
Maduración I	<i>B. melitensis</i>	Si	La adición de la salmuera tiene como objetivo disminuir la $a_w$ modificando la condiciones del producto y afectando el sobrevivencia de los microorganismo	No
Maduración II	<i>B. melitensis</i>	Si	La adición de la salmuera tiene como objetivo disminuir la $a_w$ modificando condiciones del producto y afectando el sobrevivencia de los microorganismo y el tiempo de maduración.	No
Maduración III	<i>B. melitensis</i>	Si	En el producto puede estar presente el microorganismo, sin embargo la disminución del $a_w$ y los tiempos de maduración podrían afectar la sobrevivencia de <i>B. melitensis</i> . El queso es conservado a temperatura de 24°C	Si

CUADRO 24. Respuestas al árbol de decisiones del queso semi-madurado a 24° C.

Etapa	Peligros	Respuesta al árbol de decisiones				PCC
Recepción	<i>B. melitensis</i>	Si	Si	Si	-	No
Templado	No	No	No	-	-	No
Incubación	No	No	No	-	-	No
Corte	No	No	No	-	-	No
Desuerado	No	No	No	-	-	No
Salmuera	<i>B. melitensis</i>	Si	Si	Si	-	No
Maduración I	<i>B. melitensis</i>	Si	Si	Si	-	No
Maduración II	<i>B. melitensis</i>	Si	Si	Si	-	No
Maduración III	<i>B. melitensis</i>	Si	Si	No	-	PPC

CUADRO 25. Hoja de análisis de peligros del queso semi-madurado a 4°C

Etapas del proceso	Identificar peligros potenciales	Hay un peligro significativo para la inocuidad? Si/No	Justificar la decisión anterior	Es un PCC? Si/No
Recepción	Si	Si	El hato de donde se tomó la leche posee un certificado libre de brucelosis. Sin embargo la leche no se somete a ningún proceso de pasteurización, las muestras se conservaron a temperatura de 4°C con frascos estériles.	No
Templado	No	No	Se conserva en frascos estériles.	No
Incubación	No	No	El cultivo iniciador se encuentra liofilizado.	No
Corte	No	No	Se realiza con una espátula estéril.	No
Desuerado	No	No	Se conservan en recipientes estériles.	No
Salmuera	<i>B. melitensis</i>	Si	La salmuera contiene una concentración del 18% de sal, pH 5 y $a_w$ 0.823 evita la proliferación de los microorganismos.	No
Maduración I	<i>B. melitensis</i>	Si	Se conservan los quesos en recipientes con tapa de manera estériles.	No
Maduración II	<i>B. melitensis</i>	Si	La adición de la salmuera tiene como objetivo disminuir la $a_w$ modificando la condiciones del producto y afectando el sobrevivencia de los microorganismo	No
Maduración III	<i>B. melitensis</i>	Si	En el producto puede estar presente el microorganismo, sin embargo la disminución del $a_w$ y los tiempos de maduración podrían afectar la sobrevivencia de <i>B. melitensis</i> , el queso es conservado a 4°C.	Si

CUADRO 26. Respuestas al árbol de decisiones del queso semi-madurado a 4° C.

Etapa	Peligros	Respuesta al árbol de decisiones				PCC
Recepción	<i>B. melitensis</i>	Si	Si	Si	-	No
Templado	No	No	No	-	-	No
Incubación	No	No	No	-	-	No
Corte	No	No	No	-	-	No
Desuerado	No	No	No	-	-	No
Salmuera	<i>B. melitensis</i>	Si	Si	Si	-	No
Maduración I	<i>B. melitensis</i>	Si	Si	Si	-	No
Maduración II	<i>B. melitensis</i>	Si	Si	Si	-	No
Maduración III	<i>B. melitensis</i>	Si	Si	No	-	PPC

## IV. DISCUSIÓN

La inocuidad es un factor importante para obtener un producto con calidad apto para el consumo de la población; en este trabajo el procedimiento usado para la elaboración de los quesos se esquematizó con la finalidad de poder analizar el comportamiento de la bacteria en las diferentes etapas de elaboración de los quesos, así como identificar qué etapa es un Punto Crítico de Control en donde *B. melitensis* es un peligro potencial.

Un punto crítico de control (PCC) se define como la etapa en la que puede aplicarse un control y que es esencial para prevenir o eliminar un peligro relacionado con la inocuidad del queso o reducir hasta un nivel aceptable. La determinación del PCC se realizó por medio de la aplicación de un árbol de decisiones (Figura 11) (Almeida *et al.*, 2001). Existe información en donde se menciona que en 1949 la Food and Drug Administration (FDA) propuso 2 opciones para producir un queso inocuo. La primera era la pasteurización de la leche y la segunda era mantener a los quesos por un período de 60 días a temperatura de 2°C si la leche no es pasteurizada. Sin embargo, se dice que la acidificación (pH 4.5 a 5.3 ) y la concentración de sal (1 a 5%) son factores importantes en la producción de un queso inocuo (Sung and Collin, 2000). Los factores que son importantes para la inactivación de los microorganismos son: las condiciones de manufactura, temperatura, pH, contenido de sal y los prolongados tiempos de maduración (Donaghy *et al.*, 2004).

### 4.1. Efecto del tiempo de maduración en los quesos semi-madurados

En el presente trabajo se encontró que se aisló la bacteria hasta los 15 días de maduración en el caso del queso semi-madurado a 24°C,; en el queso semi-madurado a 4°C, se aisló hasta los 30 días y en el queso semi-madurado a 24°C, con leche previamente pasteurizada, se aisló hasta la etapa del corte, es decir, que en los quesos semi-madurados con leche sin pasteurizar el tiempo de maduración es uno de los factores que favorece una menor sobrevivencia de *B. melitensis*, es decir, que conforme se aumentaron los días de maduración en los quesos semi-madurados a 24°C y 4°C con leche sin pasteurizar, se observó una reducción en la sobrevivencia de *B. melitensis*. Sin embargo, en el queso semi-madurado a 24°C con leche previamente pasteurizada se apreció que en la etapa del desuerado no se aisló la bacteria; con la finalidad de determinar si la presencia de los miceliados tenían algún efecto en este

fenómeno se realizó un análisis estadístico en el que se aplicó la prueba de Spearman correlacionando la presencia de los miceliados con la sobrevivencia de *B. melitensis* y la presencia de levaduras con la sobrevivencia de la bacteria. No se encontró significancia estadística de que la presencia de los miceliados y las levaduras no influyen en la sobrevivencia de *B. melitensis* en el queso.

Claessens *et al.* (1996) encuentran que *B. melitensis* sobrevive hasta los 90 días de maduración en un queso madurado con leche de oveja y cabra y Öztürk *et al.* (1996) en el mismo año mencionan que a partir de quesos de Tulum elaborados con leche de oveja y de vaca inoculados con Rev1, *B. melitensis*, es aislada la bacteria hasta los 21 días, pero no a los 30 días de maduración.

#### **4.2. Efecto de la actividad de agua con la sobrevivencia de *B. melitensis***

La NOM-130-SSA1-1995, menciona que la  $a_w$  es una expresión de la humedad adecuada para el crecimiento de microorganismos y se define como la relación de la presión de vapor de agua del producto y la presión del vapor de agua pura bajo condiciones idénticas de presión y temperatura.

Es importante señalar que las células bacterianas deben ser capaces de adaptarse a los cambios rápidos en sus ambientes acuosos. Se han estudiado algunos mecanismos de adaptación y respuestas bacterianas como la síntesis y transporte de solutos compatibles, reacciones de compensación de pH. El agua es considerada uno de los factores importantes que afectan la sobrevivencia y crecimiento de los microorganismos (Hernández *et al.*, 2003).

De acuerdo al ICMSF (1988) los valores mínimos de la  $a_w$  que permiten el desarrollo de los siguiente microorganismos son: *Pseudomonas* spp. requiere un  $a_w$  de 0.93, *Staphylococcus aureus* de 0.9, *Clostridium botulinum* tipo A de 0.95, *C. botulinum* tipo B de 0.94, *C. botulinum* tipo E de 0.97, levaduras de 0.88, mohos de 0.8.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación el queso semi-madurado a 24°C con leche sin pasteurizar presentó una actividad de agua óptima para el crecimiento de levaduras y mohos el cual presentó un  $a_w$  de 0.8762

Cabe mencionar que está relacionada con la sobrevivencia de los microorganismos la disminución del  $a_w$  en el producto lácteo. Frazier (1993) menciona que a temperaturas óptimas de crecimiento la mayoría de los microorganismos tienen una tolerancia máxima a los valores bajos de  $a_w$ ; mientras que en un medio donde existe aerobiosis los microorganismos aerobios tienden a soportar valores de  $a_w$  más bajos que cuando no existe aire en el mismo. A valores de pH próximos a la neutralidad, la mayoría de los microorganismos son más tolerantes a valores bajos de  $a_w$  que cuando se encuentran en medios ácidos o básicos.

Con la finalidad de disminuir la actividad de agua se usó una salmuera al 18% de sal, que se emplea con la finalidad de fijar moléculas de agua del sustrato y deshidratar la célula microbiana por ósmosis (Frazier, 1993). En este trabajo de investigación se aisló *B. melitensis* a los 15 días de maduración con un  $a_w$  de 0.8999 en el queso semi-madurado a 24°C, es decir, que la disminución de la actividad del agua influyó en la viabilidad de *B. melitensis*. El queso semi-madurado a 4°C presentó aspecto húmedo al final del proceso de elaboración, observándose una sobrevivencia de *B. melitensis* hasta los 30 días de maduración. Por el contrario en el queso semi-madurado a 24°C con leche previamente pasteurizada, con una actividad de agua de 0.527 no sobrevivió *B. melitensis*. Los resultados obtenidos en este estudio se compararon con los experimentos de Kästli y Hausch (1957) citados por el ICMSF, (1996) quienes encuentran una correlación entre la sobrevivencia de *B. abortus* el contenido de agua de los diferentes quesos. Ellos observan que las brucelas sobreviven 6 días en queso Emmental y Gruyère con un contenido de agua de 35%, 15 días en queso Tilsit cuando su contenido de agua es de 41%, 29 días en queso quarterfat con un contenido de agua de 45% y 57 días en queso Munster y Camembert con un contenido de agua mayor de 50%. En estos estudios valoraron quesos inoculados con *B. abortus* a lo que se podrían atribuir las diferencias con los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación.

Así mismo el ICMSF, (1996) menciona que en quesos de oveja que contienen una concentración de 27% de sal, almacenados entre 11 y 14°C las brucelas sobreviven por 45 días; sin embargo en este trabajo no mencionan qué especie de *Brucella* es la que sobrevive. En cambio, en este estudio se encontró que *B. melitensis* sobrevivió en el queso semi-madurado a 24°C elaborado con leche sin pasteurizar sumergido en salmuera al 18% hasta los 15 días.

Diferentes investigadores han realizado trabajos para observar la relación de la sobrevivencia de los microorganismos con respecto a la actividad de agua en los alimentos, por ejemplo: Ryu *et al.*, (1999) encuentran la concentración alta de sodio en la membrana inhibe el choque osmótico afectando la viabilidad de *E. coli* 0157:H7.

Larson *et al.*, (1999) demuestran que la sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* en quesos en salmuera no está correlacionada con el pH, ni con el contenido de sal.

#### **4.3. Efecto del pH con la sobrevivencia de *B. melitensis***

El pH ácido es un factor de estrés ambiental frecuentemente encontrado por *Brucella* durante sus etapas de vida tanto en el ambiente (extracelular) como durante su invasión a la célula. Las brucelas para sobrevivir deben adaptarse a diferentes condiciones dadas en productos lácteos fermentados tales como quesos y yogurt. Estudios previos demuestran que el pH de los productos lácteos juega un papel importante en la sobrevivencia y el crecimiento de *Brucella* spp. Davies and Casey citados por Zúñiga *et al.*, (2005) demuestran que los cambios del pH afectan la sobrevivencia de *B. abortus* en leche y productos lácteos (El-Daher *et al.*, 1990). Así mismo, han encontrado que cuando se inocula leche y sometida a fermentación a un pH de 4 *B. abortus* es capaz de sobrevivir hasta 10 días almacenada a 4°C (Zúñiga *et al.*, 2005). En el presente estudio se realizó una correlación de spearman con la finalidad de observar si el pH era uno de los factores que afectaban la sobrevivencia de *B. melitensis*, y se encontró que en el queso fresco, queso semi-madurado a 24°C con leche pasteurizada y sin pasteurizar existe una correlación del pH de los diferentes quesos con la sobrevivencia de *B. melitensis*, pero no en el caso del queso semi-madurado a 4°C en donde no una hubo significancia estadística ( $p > 0.05$ ).

#### **4.4. Efecto de los miceliados y levaduras en la sobrevivencia de *B. melitensis***

En este estudio se realizó el aislamiento de miceliados y levaduras en los diferentes quesos. La presencia de miceliados y levaduras en los quesos es considerada como un indicador sanitario, es decir, que su presencia se relaciona con la posible presencia de microorganismo patógenos o de sus toxinas, debido a que las prácticas de manufactura fueron inadecuadas durante la producción, proceso, almacenamiento y distribución (Almeida *et al.*, 2001). En el presente estudio de investigación se correlacionó la

presencia de miceliados y levaduras con la sobrevivencia *B. melitensis* con la finalidad de observar si la presencia de miceliados y levaduras interfieren con la sobrevivencia de *B. melitensis*, no se encontró evidencia estadísticamente que indique que los miceliados y levaduras afectan con la sobrevivencia de *B. melitensis* en los quesos.

#### **4.5. Temperatura de almacenamiento de los quesos semi-madurados**

En este trabajo se encontró que a diferentes temperatura de almacenamiento de los quesos semi-madurados se presentaban diferentes texturas en el producto final, por ejemplo: en el queso semi-madurado a 24°C en leche sin pasteurizar se presentó un aspecto más seco con una actividad del agua de 0.8762, en cambio en el queso semi-madurado a 4°C se presentó una textura ligeramente húmeda ( $a_w$  0.9) y en el queso fresco se observó que su textura es muy suave con una actividad de agua 0.977.

#### **4.6. Aplicaciones del suero del subproducto de los quesos**

En el presente trabajo de investigación se tomaron muestras del suero del corte y suero del desuerado con la finalidad de la cuantificación de brucelas con los sueros. Se encontró que estos subproductos contienen cantidades importantes de brucelas viables por lo que son un peligro potencial para personas que estén trabajando en el proceso de elaboración de los quesos y para los animales cuya dieta es suplementada con suero de leche (Cuadros 3, 8, 13 y 18).

Se ha visto que someter el subproducto a un proceso de calentamiento se desnaturalizan las proteínas presentes, es decir, que las proteínas se despliegan, perdiendo su estructura y por lo tanto también sus propiedades funcionales (Grasselli, 1997), esto servirá para eliminar las brucelas.

También sirve como alimento para los cerdos; sin embargo, Esteves *et al.*,(2001) mencionan que cuando se alimentan cerdos en recría con suero de queso y grano sólo, se observa una disminución del crecimiento debido a la insuficiencia en aminoácidos esenciales, principalmente lisina.

Caminotti citado por Esteves *et al.*, (1993) se menciona que se prohíbe la eliminación de suero en cursos de agua y estanques porque trae problemas encauzarlo en zanjas y lagunas construidas para tal fin pues el ácido láctico impermeabiliza el suelo, cuestión

que impide la filtración, formándose así, espejos putrefactos que inciden negativamente en la conservación del ambiente, esto es un peligro potencial si el suero se encuentra contaminado con la bacteria.

## V. CONCLUSIONES

El presente trabajo aporta un estudio sistematizado enfocado al HACCP sobre la sobrevivencia de *B. melitensis* en las diferentes etapas de elaboración de los quesos frescos y semi-madurados a 24°C y 4°C sin leche pasteurizada y quesos semi-madurados a 24°C con leche previamente pasteurizada con la finalidad de identificar los PCC durante la elaboración y maduración de quesos, del cual se desprenden las siguientes conclusiones:

En el queso fresco los valores de  $a_w$  se mantuvieron constantes y por lo tanto fue posible determinar la presencia de *B. melitensis*. No obstante que la prueba estadística no se estableció una correlación entre la actividad del agua y la sobrevivencia de *B. melitensis*, se identificó que el PCC para controlar la presencia de *B. melitensis* es desde la etapa de recepción, esto quiere decir que debemos contar con leche que provenga de hatos libres de brucelosis.

El PCC para controlar la presencia *B. melitensis* en los quesos semi-madurados sin leche pasteurizada es la etapa de maduración III.

En el queso semi-madurado a 24°C sin leche previamente pasteurizada se observó que la viabilidad de *B. melitensis* se vió afectada.

En el queso semi-madurado a 4°C no se afectó la viabilidad de la bacteria debido a que su temperatura de almacenamiento fue menor y presentó una actividad de agua de 0.9. Se encontró una mayor sobrevivencia de *B. melitensis*, una de las razones que podría explicar este fenómeno es porque el producto presentó una mayor humedad.

En el queso semi-madurado a 24°C con leche previamente pasteurizada se observó que la viabilidad de *B. melitensis* fue afectada pero no por el tiempo de maduración, ni por la actividad de agua, este fenómeno probablemente se debe a otros factores que no incluimos en este trabajo, pero que pueden estar actuando como antagonistas para la sobrevivencia de *B. melitensis*.

La actividad de agua parecer tener un efecto directo sobre la sobrevivencia de *B. melitensis* por esta razón en los quesos frescos, que tienen valores de  $a_w$  por encima de 0.899 es muy probable encontrar *B. melitensis* cuando está presente en la leche con la

que estos quesos son elaborados. Mientras que en los quesos madurados los valores de la actividad de agua son menores a 0.899 esto parece tener un efecto en la presencia de *B. melitensis* ya que no fue posible realizar aislamientos en el producto terminado a pesar de que patógeno fue inoculado en la leche con la que se elaboró el producto.

La disminución del número de *B. melitensis* en quesos semi-madurados no se puede atribuir a un solo factor, entre ellos los más importantes que se discutieron son la actividad de agua, temperatura de almacenamiento, pH, la adición de la salmuera y el proceso de maduración; estos factores tienen un comportamiento dinámico durante el proceso de elaboración de los quesos semi-madurados por lo que sería difícil evaluarlos por separado siendo que todos contribuyen en la sobrevivencia de *B. melitensis*.

El elaborar quesos frescos y semi-madurados aplicando el HACCP e identificando los Puntos Crítico de Control abre un campo de estudio para identificar la sobrevivencia de *B. melitensis* en las diferentes etapas de elaboración y tiempos de maduración de los quesos. Al elaborar un HACCP tienen que tomarse en cuenta los pre-requisitos: Procedimientos Operacionales Estándar e Higiene (SSOP) y Buenas Prácticas de Manufactura (GMP) que son fundamentales para aplicación del plan HACCP en una empresa.

Es necesario realizar más estudios para evaluar la sobrevivencia de *B. melitensis* y continuar realizando estudios sobre el efecto que tiene la actividad acuosa, y el tiempo de maduración de los productos lácteos con la finalidad de observar el comportamiento de la sobrevivencia de *B. melitensis* en los diferentes quesos de cabra.

## VI. REFERENCIAS

1. Almeida CR, Bejarano OND, Cuellar JA. GMP. Buenas Prácticas de Manufactura. HACCP. Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control. HACCP: Herramienta esencial para la inocuidad de alimentos. Buenos Aires: INPPAZ OPS/OMS, 2001. 113-153, 237-263.
2. Alton GG, Jones LM, Pietz DE. Las técnicas de laboratorio en la brucelosis. FAO OMS, 1976.
3. Association Official Agriculture Chemists. 1948; 31, 306.
4. Boletín Epidemiológico de la Secretaría de la Salud. [serial online] 12 de Agosto de 2004; [6 screens]. Available from URL: <http://www.dgepi.salud.gob.mx>
5. Bonilla CCA. Evaluación nutricional del queso de leche de cabra, cruda y pasteurizada por efecto del sistema de alimentación. (tesis de licenciatura). México (DF). México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM, 2005. 1-57.
6. Bourgeois CM, Larpent JP. Microbiología alimentaria II. Zaragoza (España): Acribia 1995. 229-239.
7. Clasesens I, Ring C. [Survival periods of *Brucella* in White cheese.] Überlebenszeiten von Brucellen in Weisskäse. Molkerei-Zeitung Welt der Milch 1996; 50: 33-34.
8. Clavero MRS, Brackett RE, Beuchat LR, Doyle MP. Influence of water activity and storage conditions on survival and growth of proteolytic *Clostridium botulinum* in peanut spread. Food Microbiol 2000; 17: 53-61.
9. Dairy Science. 1946; 29, 737.
10. Daniel WW. Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences. 6<sup>th</sup> ed. Canada: John Wiley & Sons, Inc, 1995. 742-749.
11. De la Rosa AJ. Zoonosis: Manual de Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio. México: INDRE, 2000. 35-62.
12. Delgado HC. Desde mesopotamia hasta nuestros días. Tecnología del queso. [serial online] (cited 2005 Jul 10) Enero 2004; [2 screens]. Available from URL: <http://www.tecnologiadelqueso.com/noticias/20001.php>
13. Donaghy JA, Totton NL, Rowe MT. Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during manufacture and ripening of cheddar cheese. Appl Environ Microbiol 2004; 70: 4899-4905.

14. El-Daher N, Na'was T, Al-Quaderi S. The effect of the pH of various dary products on the survival and growth of *Brucella melitensis*. Ann Trop Med Para sitol 1990; 84:523-528.
15. Esteves LR, Cervellini JE, Braun RO. Desempeño productivo de cerdos en el período de crecimiento – terminación, alimentados con ración seca restringida y lactosuero. VI Encuentro Regional sobre nutrición y producción de especies monogástrica. Habana Cuba 2001. [serial online] (cited 2005 Jul 24) Nov-Dic 2001; [2 screens]. Aavailable from URL: <http://www.sian.info.ve/porcinos/publicaciones/viencuent/estevez.htm>
16. Frazier WC. Microbiología de los alimentos. Zaragoza (España): Acribia, 1993. 3-21.
17. Gorvel PJ, Moreno E. *Brucella* intracellular life: from invasión to intracellular replication. Vet Microbiol 2002; 90:281-297.
18. Grasselli M, Navarro AA, Fernández HML, Miranda MV, Camperi SA, Osvaldo C. ¿Qué hacer con el suero del queso?. Ciencia hoy. Revista de Divulgación científica y Tecnológica de la Asociación Ciencia. [serial online] (cited 2005 Jul 24) Nov-Dic 1997; [2 screens]. Aavailable from URL: <http://www.cienciahoy.org.ar/hoy43/index.htm>
19. Hernández CR, Cruz RM, Seoane A, García JM. The aquaporin gene aqpX of *Brucella abortus* is induced in hyperosmotic condiction. Microbiol 2003; 149: 3185-3192.
20. Iáñez E. Ciclo celular y crecimiento. [seial online] 9 de Mayo de 2005; [1 screen] [cited 2005 Nov 15]. Aavailable from URL:[http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/12crecimiento.htm#\\_Toc58934317](http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/12crecimiento.htm#_Toc58934317)
21. ICMSF. Ecología microbiana de los alimentos. Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos. Vol. 1 Zaragoza (España): Acribia, 1980. 74-105.
22. ICMSF. Microorganismos de los alimentos. Ecología microbiana de los productos alimentarios. España: Acribia, 1998. 495-498, 516-529.
23. ICMSF. Microorganismos de los alimentos. Métodos de muestreo para análisis microbiológicos. Principios y aplicaciones específicas. Vol 2ª seg. ed. Zaragoza (España): Acribia, 1999. 39-74, 145-153.
24. ICMSF. Microorganismos in foods. Microbiological specifications of food pathogens. Great Britain: Blackie academic & Professional, 1996. 36-44.

25. Kehagias C, Koulouris, Koumoutsos G, Samona A, Malliou S. Effect of various starters on the quality of cheese in brine. *Food Microbiol* 1995; 12: 413-419.
26. Ko J, Splitter GA. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16:65-78.
27. Köhler S, Porte F, Jubier MV, Ouahrani BS, Teyssier J, Pierre LJ. The intramacrophagic environment of *Brucella suis* and bacterial response. *Vet Microbiol* 2002; 2389: 1-11.
28. Lanciotti R, Sinigaglia M, Gardini F, Vannini L, Guerzoni E. Growth/no growth interfaces of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* in model systems based on water activity, pH temperature and ethanol concentration. *Food Microbiol* 2001; 18: 659-668.
29. Larson AE, Johnson EA, Nelson JH. Survival of *Listeria monocytogenes* in Commercial Cheese Brines. *J Dairy Sci* 1999; 82:1860–1868
30. López MA, Contreras RA. *Brucella*. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. [serial online] (cited 2004 Sept 7); [19 screens]. Available from: URL:[http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CPITULO\\_10/Capitulo10pdf](http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CPITULO_10/Capitulo10pdf)
31. López MA, Migranas OR, Pérez MA, Magos C, Salvatierra IB, Tapia CR, Valdespino JL, Sepúlveda J. Seroepidemiology of brucellosis in Mexico. *Salud Publica Mex* 1992; 34: 230-210.
32. Luna MJE, Mejía TC. Brucellosis in Mexico: Current status and trends. *Vet Microbiol* 2002; 90:19-30.
33. Meljem MJ, Flores LJJ. Control sanitario de los productos lácteos como medida de prevención de brucelosis. III Foro Nacional Brucelosis Memorias Acapulco, Guerrero México 20 y 21 de Julio 1998; 33-45.
34. Moreno E, Cloeckert A, Moriyón I. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol* 2002; 90:209-227.
35. NOM-002-SSA2-1994, Para la prevención y control de la brucelosis en el hombre, en el primer nivel de atención, publicada el 30 de noviembre de 1995, para quedar como NOM-022-SSA2-1994, Para la prevención y control. [serial online] 22 de Agosto de 2004; [10 screens]. Available from URL: <http://www.economia.gob.mx>

36. NOM-110-SSA1-1994 Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis. [serial online] 22 de Agosto de 2004; [15 screens]. Available from URL: <http://www.economia.gob.mx>
37. NOM-111-SSA-1994 Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. [serial online] 22 de Agosto de 2004; [11 screens]. Available from URL: <http://www.economia.gob.mx>
38. NOM-121-SSA-1994, Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias. [serial online] 22 de Agosto de 2004; [11 screens]. Available from URL: <http://www.economia.gob.mx>
39. NOM-130-SSA1-1995, bienes y servicios. alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias. [serial online] 22 de mayo de 2006; [10 screens]. Available from URL: <http://www.economia.gob.mx>
40. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agriculture Chemists. 1965; 220-236.
41. Öztürk GY, Nazli B. [Studies on the presence of *Brucella melitensis* in Tulum cheese made from artificially-infected milk.] Deneysel olarak enfekte edilen sütle yapılan tulum peynirlerinde *Brucella melitensis*'in mevcudiyeti üzerine araştırmalar. Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 1996; 27: 123-142.
42. Potter N. Ciencia de los alimentos. México: Edutex, 1984. 379-429.
43. Rodríguez TA, Orduño DA, Ariza CX, Moriyón UI, Díaz GR, Blasco MJM, Almaraz GA, Martínez NF, Ruíz CC, Abad RR. Manual de brucelosis. Junta de Castilla, 2001. [serial online] 22 de Agosto de 2004; [149 screens]. Available from URL: <http://www.jcyl.es/jcyl-client/jcyl/cs/dgspc/tkContent?idContent=23005>
44. Rodríguez-Jerez JJ. La vulnerabilidad del queso fresco [seial online] 22 de Agosto de 2002 [cited 2004 febrero 13]; [1 screens]. Available from URL: [http://www.consumaseguridad.com/web/es/sociedad\\_y\\_consumo/2002/08/22/3051.php](http://www.consumaseguridad.com/web/es/sociedad_y_consumo/2002/08/22/3051.php)
45. Ryu JH, Deng Y, Beuchat LR. Survival of *Excherichia coli* O157:H7 in dried beef powder as affected by water activity, sodium chloride content and temperature. Food Microbiol 1999; 16: 309-316.
46. Saldarriaga OA, Ossa JE, Rugeles MT. Respuesta inmune y estrategias de evasión durante la infección con *Brucella* spp. Rev Col Cienc Pec 2002;15:180-187.
47. Scholz W. Elaboración de quesos de oveja y cabra. España: Acribia, 1997. 1-52.

48. Sistema de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera Última actualización 20/02/02 Sistema de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), SAGARPA [serial online] 12 de Agosto de 2004; [6 screens]. Available from URL: <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/indexovino.htm>
49. Sistema de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. Producción pecuaria en México 2000 – 2005. Última actualización: 18/11/03. Sistema de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), SAGARPA [serial online] 12 de Agosto de 2004; [6 screens]. Available from URL: <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/indexovino.htm>
50. Spahr U, Schafroth K. Fate of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in swiss hard and semihard cheese manufactured from raw milk. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67:4199-4205.
51. Suárez GF, López MA. Control de la brucelosis animal y su repercusión en la bioseguridad alimentaria. Memorias del XXVI congreso Nacional de Buiatria; 2002 julio 11-13; Acapulco (Guerrero). México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos AC, 2002: 130-153.
52. Sung N, Collins TM. Effect of three factors in cheese production (pH, sal and heat) on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 334-1339.
53. Veisseyre R. Lactología Técnica. Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche. Zaragoza: Acribia, 1988. 16-45.
54. Velásquez MO, Domínguez OJ, Lecuona OLA. La brucelosis como problema de Salud Pública en México. III Foro Nacional Brucelosis Memorias Acapulco, Guerrero México 20 y 21 de Julio 1998; 13-16.
55. Zúñiga EA, Mota GL, Sánchez MM, Santos LE, Filardo KS, López MA. Survival of *Brucella abortus* in milk fermented with a yoghurt starter culture. *Rev Latinoam Microbiol* 2005; 47:88-91.