



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

CALIDAD E INOCUIDAD DE QUESOS DE LECHE DE CABRA  
PRODUCIDOS EN MUNICIPIOS DE SAN LUIS POTOSÍ, MÉXICO

## TESIS

Que para optar por el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

## PRESENTA

LETICIA BLANCO DE BRITTO VELHO

## TUTORA PRINCIPAL

M.C. LAURA HERNÁNDEZ ANDRADE  
INIFAP

## COMITÉ TUTORAL

DRA. SUSANA MENDOZA ELVIRA  
FES UNAM  
DR. JOSÉ JUAN MARTÍNEZ MAYA  
FMVZ UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX.

MARZO, 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## INDICE

Resumen	4
I. Introducción	6
II. Antecedentes	7
II.1 Consumo de leche de cabra en México	7
II.2 Consumo de queso de cabra en México	7
II.3 Sistemas de producción caprina en México	8
II.4 Sistemas de producción caprina en el Estado de San Luis Potosí	8
II.5 El cuajo	9
II.6 Inocuidad de los productos lácteos y microorganismos comunes en las Enfermedades Transmitidas por Alimentos en México	10
II.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	16
III. Justificación	17
IV. Hipótesis	17
V. Objetivo General	18
VI. Objetivos Específicos	18
VII. Material y Métodos	19
VII.1 Estrategia General	19
VII.2 Muestreo	20
VII.3 Análisis microbiológico	21
VII.4 Detección de Salmonella mediante PCR	29
VII.5 PCR	29
VII.6 Análisis de datos	31
VIII. Resultados	31
VIII.1 Identificación de posibles factores de riesgo	31
VIII.2 Resultados bacteriológicos de muestras de leche de cabra	33
VIII.3 Resultados bacteriológicos de muestras de quesos artesanales de leche de cabra	39
VIII. 4 Resultados bacteriológicos de muestras de cuajo	46
IX. Discusión	47
IX. 1 Leche	47
IX. 2 Queso	49
IX. 3 Cuajo	52
X. Recomendaciones	53
XI. Conclusiones	53
XII. Referencias	55
XIII. Anexos	62
XIII. 1 Anexo 1	62

XIII. 2 Anexo 2	64
XIII. 3 Anexo 3	64

64
64

## **RESUMEN**

La inocuidad y calidad de los productos lácteos en México es un tema de estudio muy importante, dado el alto índice de enfermedades transmisibles alimentarias, por el consumo de dichos productos, ya sea por una incorrecta fabricación del

productor y/o por mal manejo por parte del consumidor. En el 2019, México reportó 76, 670 casos de salmonelosis, 31,011 casos de intoxicaciones alimentarias bacterianas y 1,633 casos de brucelosis por el probable consumo de leche cruda. El objetivo de este trabajo fue estudiar la calidad e inocuidad de los quesos frescos de leche de cabra elaborados en 4 municipios de San Luis Potosí, México. Se analizaron quesos, mediante la cuenta de bacterias mesofílicas, enterobacterias, de mohos y levaduras, análisis bacteriológicos de *Listeria monocytogenes*, *Brucella spp.*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. La leche y los quesos presentan altos conteos de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de mesófilos aerobios y coliformes totales, superando lo recomendado por la NOM-243-SSA-2010 y por la NMX-F-728-COFOCALEC-2017, en el caso de coliformes totales del conteo de leches del municipio de Villa Arista fue significativamente más alto que otros municipios; los conteos de coliformes de los quesos fueron similares. En el queso se identificaron: *Staphylococcus coagulasa negativo* SCN (91%), *Klebsiella aerogenes* (57%), *E. coli* (52%), *Citrobacter freundii* y *Streptococcus dysgalactiae* con 31%, *Proteus spp.* y *Morganella spp.* con 4%. Se aislaron levaduras *Candida krusei* y *Candida tropicalis* con 17% y 9%, respectivamente. No se aislaron *Brucella spp.*, *Salmonella spp.*, ni *Listeria monocytogenes*. En la técnica de PCR se detectó *Salmonella spp.* en dos muestras de queso. Los microorganismos patógenos aislados en la leche y queso denotan contaminación que provocan enfermedades al hombre. La elaboración de los quesos se realiza con leche sin pasteurizar, cuajo natural y cuajo comercial y no mantienen una cadena fría correcta. La relación entre la gran deficiencia de buenas prácticas de manufactura y pecuarias con la calidad sanitaria de la leche y quesos, muestra una correlación entre la baja implementación de las buenas prácticas y los altos valores de los indicadores sanitarios obtenidos. Es necesaria la capacitación de los productores para implementar buenas prácticas, y así mejorar la calidad sanitaria de los quesos.

## **ABSTRACT**

The safety and quality of dairy products in Mexico is a very important subject of study, given the high rate of food communicable diseases, due to the consumption of said products, either due to incorrect manufacture by the producer and/or mishandling by the consumer. In 2019, Mexico reported 76,670 cases of salmonellosis, 31,011 cases of bacterial food poisoning, and 1,633 cases of brucellosis due to the probable consumption of raw milk. The objective of this work

was to study the quality and safety of milk and fresh goat milk cheeses made in 4 municipalities of San Luis Potosí, Mexico, by counting mesophilic bacteria, enterobacteria, molds and yeasts, bacteriological analysis of *Listeria monocytogenes*, *Brucella spp.*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Milk and cheeses presented high counts of CFU of aerobic mesophiles and total coliforms, exceeding that recommended by NOM-243-SSA-2010 and by NMX-F-728-COFOCALEC-2017, in the case of total coliforms in the count of milk in the municipality of Villa Arista was significantly higher than other municipalities; the cheese counts were similar. In the cheese were identified: *Staphylococcus coagulase negative* SCN (91%), *Klebsiella aerogenes* (57%), *E. coli* (52%), *Citrobacter freundii*, *Streptococcus dysgalactiae* with 31%, *Proteus spp.* and *Morganella spp.* with 4%. *Candida krusei* and *Candida tropicalis* yeasts were isolated with 17% and 9%, respectively. *Brucella spp.*, *Salmonella spp.*, and *Listeria monocytogenes* were not isolated microbiologically. *Salmonella spp.* was detected in the PCR technique in two cases of cheese samples. Pathogenic microorganisms isolated from milk and cheeses indicate contamination that causes human illness. The cheeses are made with unpasteurized milk, natural and commercial and they do not maintain a correct cold chain. The relationship between the great deficiency of good manufacturing and livestock practices with the sanitary quality of milk and cheeses shows a correlation between the low implementation of good practices and the high values of the sanitary indicators obtained. Producers must be trained to implement good practices and thus improve the sanitary quality of cheeses.

## I. INTRODUCCIÓN

En el año 2015, la Organización Mundial de la Salud (OMS) informó que una de cada 10 personas es afectada por una Enfermedad Transmisible por Alimentos (ETA), (Ruiz *et al*, 2016). En México, en el reporte acumulado del año 2019 el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), reportó 76, 670 casos de ETAs por *Salmonella spp.* incluyendo *Salmonella enterica serotipo Typhi* y *Salmonella paratyphi*; además, reportó 31,011 casos de intoxicaciones alimentarias bacterianas y 1,633 casos de brucelosis por el probable consumo de leche cruda; cabe destacar que el Estado de San Luis Potosí está en segundo lugar con más casos de brucelosis en el 2019 con 189 casos. (SINAVE, 2020).

Derivado de ello, es posible decir que la inocuidad y calidad microbiológica de los productos lácteos en México ha sido un tema de estudio importante, dado el alto índice de ETAs por el consumo de dichos productos, ya sea por una incorrecta elaboración y/o manejo por parte del consumidor. Estudios al respecto han encontrado principalmente bacterias como *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes*, las cuales contaminan los alimentos por malas prácticas pecuarias, de limpieza, de manufactura y un mal manejo de la cadena fría en la comercialización. Así mismo, en los estudios en los que se han encontrado estos patógenos, se ha recomendado a los productores la implementación de medidas higiénicas para conseguir un producto de calidad e inocuo para el consumo (Torres Vitela *et al*, 2012). La brucelosis se identifica como un problema de salud animal por las implicaciones económicas en la ganadería nacional, que forma parte de las enfermedades de reporte obligatorio para la Organización Mundial de Salud Animal (OIE), es importante identificarla como una zoonosis (enfermedades transmitidas de animales a humanos) que se debe atender de forma conjunta entre dependencias federales.

Para que el procesamiento de estos quesos sea inocuo, se requiere utilizar leche pasteurizada y cuajo registrado por las autoridades competentes, tales como la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) y el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad. En el caso del cuajo natural, debido a los usos y costumbres, les hacen creer que la microbiota natural le confiere un sabor y olor mejor al queso, frente al que se elabora con leche pasteurizada (Oliver *et al*, 2009). Sin embargo, se ha comprobado que el consumo de subproductos de leche cruda de vaca puede provocar que se contraigan enfermedades como: Salmonelosis, Listeriosis, Tuberculosis, Brucelosis y Campilobacteriosis (Potter *et al*, 1984). Inclusive, se han tenido registros de algunos brotes en México de salmonelosis por el consumo de quesos hechos con leche de cabra cruda (Coddy *et al*, 1999; Torres Vitela *et al*, 2012).

## **II. ANTECEDENTES**

### **II. 1. Consumo de leche de cabra en México**

A nivel mundial, la leche de cabra (*Capra hircus*) es consumida principalmente como un producto fluido sin que medie una transformación de la misma en otros derivados lácteos. Se estima que existen más personas en el mundo que consumen leche de cabra, que las que consumen otro tipo de leche (Chacón 2005). La leche de cabra es consumida de forma fluida y producida en su mayoría por países en desarrollo, como la India y parte de África, donde se ubica el 95% de la población caprina (Chacón, 2005); en México su consumo per cápita en el periodo 2004-2013 fue de 1.4 litros (Torres, 2016), ya que la leche de cabra no tiene esa popularidad, los mexicanos tienen una percepción negativa sobre su olor y sabor. Cabe mencionar que dicha leche tiene una mayor concentración de

nutrientes (vitaminas y minerales) que la de la vaca. La leche de cabra es consumida de forma fluida por personas que tienen alergia a la proteína Alfa S1 de la caseína (ya que tiene una concentración menor que la leche de vaca); también es consumida por personas con problemas de digestibilidad, ya que una de sus características es el menor tamaño de sus glóbulos grasos (2  $\mu\text{m}$  en la leche de cabra contra un promedio de 3-5  $\mu\text{m}$  en la de vaca) (Chacón, 2005).

La leche constituye un producto altamente perecedero, que además puede ser vehículo de bacterias patógenas para el hombre (*Brucella spp.*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, etc.) (RSA-CONICET, 2019).

## **II. 2. Consumo de queso de cabra en México.**

En México, el consumo per cápita anual de queso de cabra es de apenas 2.2 Kg, el cual se considera muy bajo al ser el principal productor de ganado caprino del continente Americano (Ministerio de Agricultura de Chile, 2011); esto se debe a que la población tiene una mayor aceptabilidad a los productos lácteos de origen bovino, ya que estos son más conocidos y distribuidos por todo el país. El consumo de leche de cabra se da, principalmente, como en dulces, cajeta, quesos frescos y maduros artesanales; estos quesos son vendidos en supermercados o a nivel de carretera, ésta última es característica de los estados del Bajío, principalmente en Querétaro, ya que se ha incrementado la producción de vinos y por consecuencia, la venta de quesos de cabra como acompañamiento.

En el queso, la presencia de microorganismos patógenos depende principalmente de la higiene durante el ordeño de las cabras, además la calidad de la leche como materia prima, de su tratamiento térmico, la limpieza de la quesería, la calidad de los cultivos, del manejo de la cuajada durante el procesamiento, de la temperatura de almacenamiento, transporte y de la distribución del queso (RSA-CONICET, 2019).

## **II. 3. Sistemas de producción caprina en México**

La población de caprinos en México en 2019 fue de 8,749,589 cabezas y en el Estado de San Luis Potosí presentaron una población de 700,995 cabezas (SIAP, 2020); es importante señalar que es una actividad de complemento, característica de las zonas marginales del país, donde algunos productores no implementan las Buenas Prácticas Pecuarias (BPP) ni las Buenas Prácticas de Higiene y Manufactura (BPHyM), como rutinas higiénicas del ordeño y la pasteurización de la leche, así como el uso de cuajo natural en la elaboración de quesos frescos, por creencias de que el sabor de la leche cambia y no es aceptado por los consumidores (Oliver *et al*, 2009).

La mayor población caprina en México, se encuentra en las zonas áridas, las cuales, abarcan más del 50% de la superficie nacional y más de la mitad de esta es cubierta por vegetación xerófila.

El 64% de las cabras del país se concentra en los sistemas de producción característicos de las zonas áridas y semiáridas y el 36% restante en la región templada del país (Cantú *et al.*, 1989).

La producción caprina se divide en diferentes tipos de sistemas:

**Sistema extensivo:** Este sistema de producción requiere de grandes extensiones de terreno ya que las cabras se alimentan pastoreando a voluntad en forma seminómada o sedentaria. Presenta la ventaja de abaratar costos en la alimentación e instalaciones pero generalmente sus rendimientos productivos son menores.

**Sistema intensivo:** Este sistema requiere de instalaciones para una producción estabulada, y de la provisión de concentrados alimenticios de gran valor proteico y energético. Presenta la desventaja de requerir mayores costos, pero facilita el manejo de los animales y se obtienen mejores índices productivos en producción de carne y leche.

**Semi-intensivos:** Este sistema representa una combinación de los anteriores. Los animales pastorean y ramonean, en la tarde-noche, se estabulan y se les proporciona un suplemento alimenticio. Requiere la inversión en instalaciones y alimentos concentrados. Generalmente, presenta mejores rendimientos productivos que el sistema extensivo (Arechiga *et al.* 2008).

#### **II. 4. Sistemas de producción caprina en el Estado de San Luis Potosí.**

El sistema de producción dominante en el Norte del Estado de San Luis Potosí, es el semi-intensivo; sus objetivos de producción son la producción de cabritos, donde se ordeña a la cabra durante un tiempo corto y cuya actividad principal es la venta de cabritos mamonos de corta edad, que consumen únicamente leche, y son vendidos a la edad de destete, cuyo mercado principal es la Ciudad de Monterrey, con un peso aproximado de 10kg y 45 días de edad.

En este sistema predominan animales con diversos grados de mestizaje de las razas Nubia y Granadina, los rebaños son manejados por un pastor y su alimentación es a base de arbustos y plantas xerófilas en terrenos áridos y accidentados, no es común la complementación alimenticia en la época de escasez de forraje ni la aplicación de programas de medicina preventiva; la mayor mortalidad ocurre en animales pequeños durante invierno y primavera (Arechiga *et al.* 2008).

La producción de leche caprina se realiza en la mayor parte en los municipios del Norte del Estado de San Luis Potosí, que incluyen los municipios de: Matehuala, Villa de Arista, Cerritos, Villa Juárez y Guadalcázar, normalmente se hace en forma estacional, concentrándose en la temporada de lactancia a partir de enero-febrero, donde gran parte de la producción se usa para la elaboración y venta de queso frescos, que se venden en las mismas localidades, sin considerar, en general, buenas medidas higiénicas durante el ordeño. En estas granjas, los pezones de las cabras no son lavados y desinfectados, además de que tampoco

se lleva a cabo el presellado y el despunte de las glándulas mamarias y en ocasiones, ni el lavado de las manos de los ordeñadores entre cada cabra a ordeñar.

En muchos casos, tampoco se cuenta con agua potable, por lo que el lavado de los utensilios y manos se lleva a cabo con agua que no es potable.

La elaboración del queso artesanal incluye, en casi todos los casos, de la utilización de cuajo natural para su fabricación, tratando de mantener de forma ancestral el método de procesamiento.

## **II. 5. El cuajo**

El cuajo es una sustancia que contiene enzimas peptidasas, que se utiliza para cuajar la leche y elaborar quesos. Los cuajos principalmente utilizados en el mercado son los de origen animal y sintéticos. El cuajo de origen animal se extrae de la mucosa del abomaso de las crías lactantes de los rumiantes (vaca, borrega, y en este caso, cabras). El cuajo contiene principalmente la peptidasa quimosina, también conocida como renina, la cual causa la proteólisis de la caseína (proteína de la leche), provocando la coagulación de la leche y formando la cuajada. (RSA-CONICET, 2019).

Tradicionalmente, se ha utilizado cuajo animal para la elaboración de quesos artesanales (Harboe *et al.*, 2010). Las dificultades para contar con el cuajo animal, junto con el aumento de precio de las preparaciones comerciales de la enzima, han favorecido el desarrollo de otras enzimas coagulantes, tanto de origen animal (quimiocinas bovinas, ovinas y caprinas) (Fox *et al.*, 2017), como de origen microbiano (proteasas fúngicas, etc.) o vegetal como el cardo (flores de *Cynara cardunculus*) (Harboe *et al.*, 2010). La renina tiene como función coagular la leche en el estómago de los lactantes. El cuajo se puede considerar como un preparado enzimático funcional que es eficaz y naturalmente adaptado a los fines de la quesería (Crabbe, 2004), que actúa sobre los enlaces peptídicos de las proteínas hidrolizándolas (precipitándolas). Se encuentra en distintas presentaciones: líquido, polvo o pastillas y se le añade en las cantidades adecuadas. El cuajo debe mezclarse con agua antes de aplicarlo a la leche en una relación 1:40 (un ml de cuajo por 40 ml de agua limpia). (RSA-CONICET, 2019).

La calidad del cuajo animal, en términos de su inocuidad ha sido estudiada por Palladino *et al.* (2012 y 2016), quien determinó que el cuajo obtenido por deshidratación y ahumado en Argentina, alcanza valores que aseguran la conservación del mismo sin desarrollo de ningún tipo de microorganismo y sin generar compromiso con la inocuidad alimentaria. Mientras tanto, otros autores señalan que la utilización de cuajos naturales, demuestran tener altos niveles de patógenos e indicadores microbiológicos que demuestran ser un peligro para la salud de quienes consumen esos quesos (RSA-CONICET, 2019).

La utilización de cuajo animal, en la fabricación de quesos artesanales elaborados con leche de cabra, es una práctica común entre los productores de la región Norte del Estado de San Luis Potosí, México.

## II. 6. Inocuidad de los productos lácteos y microorganismos comunes en las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) en México

La producción y elaboración de alimentos, así como su conservación hasta el consumo, con una adecuada calidad higiénico sanitaria debe ser un requisito indispensable para permanecer en el mercado. Esta adecuada calidad puede ser definida como una suma de atributos ó características que dan satisfacción al consumidor y cumplimiento de las normas vigentes que permitan la seguridad biológica y mitigación del riesgo de microorganismos patógenos, aumentando además su vida útil (control de microorganismos alteradores). (RSA-CONICET, 2019).

Las ETAs constituyen un importante problema de salud pública dado su incremento, debido a la dinámica en la comercialización de los alimentos a nivel mundial, aspecto que ha facilitado formas de transmisión, la aparición de grupos poblacionales vulnerables, el aumento de la resistencia a los antimicrobianos y el impacto socioeconómico que ocasionan. La calidad higiénico-sanitaria de un alimento se logra con la implementación de buenas prácticas a través de toda la cadena de transformación del alimento, desde la medicina preventiva en los animales para abasto hasta el consumidor. La incidencia de las ETAs es un indicador directo de la calidad higiénico-sanitario de los alimentos y se ha demostrado que la contaminación de estos puede ocurrir durante su procesamiento o por el empleo de materia prima contaminada, pues algunas bacterias patógenas para el hombre forman parte de la flora normal o bien por animales infectados (González *et al*, 2005).

A la fecha se han descrito más de 250 ETAs. Entre las bacterias comúnmente reconocidas como causantes de ellas en México se encuentran especies de los géneros *Campylobacter*, *Salmonella* y *E. coli* (González *et al*, 2005).

Se han realizado varios estudios en México sobre la inocuidad de productos lácteos, donde se ha comprobado que los quesos frescos son los vehículos principales para agentes patógenos que representan un riesgo severo para la salud del ser humano (Torres-Vitela *et al*, 2012; Guzmán-Hernández *et al*, 2016; Morales *et al*, 2012; Soto *et al*, 2015 Ortiz *et al* 2008; Velázquez *et al*. 2016).

Para el auxilio y la prevención de riesgos en el manejo inadecuado o presencia de contaminación de los alimentos, de manera sencilla, rápida y económica, se utiliza la identificación de los microorganismos indicadores, ya que su detección puede resultar efectiva y brindar información oportuna. Los principales microorganismos indicadores suelen ser:

- Mesófilos aerobios totales.
- Hongos y levaduras.
- Coliformes totales.
- Coliformes fecales.
- *Staphylococcus aureus*.
- *Salmonella spp.* (Palma, 2015)

Los mesófilos aerobios totales incluyen todos los microorganismos capaces de desarrollarse en presencia de oxígeno a una temperatura entre 20°C y 45°C especialmente, entre 30°C y 40°C. El recuento de microorganismos aerobios mesófilos, estima la microflora total sin especificar los tipos de microorganismo existentes y refleja la calidad sanitaria de los productos analizados, indicando además de las condiciones higiénicas de la materia prima y la forma como fueron manipulados durante su elaboración. El recuento elevado generalmente se asocia a una excesiva contaminación de la materia prima, deficiente manipulación durante el proceso de elaboración e indica la posibilidad de que existan patógenos (Palma, 2015 y RSA-CONICET, 2019).

Para su determinación se utiliza el método de recuento en placas, que se basa en la presunción de que cada célula bacteriana puede crecer en un medio sólido formando colonias y que cada colonia presente en la placa proviene de una célula bacteriana, por lo cual la cantidad de colonias presentes corresponden a la cantidad de bacterias viables presentes en el alimento. Teniendo en cuenta la dilución realizada antes de la siembra, se obtiene la concentración bacteriana del alimento por mililitro.

Otro indicador de prácticas higiénicas inadecuadas ya sea de producción o de manufactura, es el grupo de los microorganismos coliformes, que es el más ampliamente utilizado en la microbiología de los alimentos y su conteo en placa nos ayuda a la:

- Detección de prácticas sanitarias deficientes en el manejo de los animales y en la fabricación de los alimentos, como el queso.
- Evaluación de la calidad microbiológica de un producto.
- Evaluación de la eficiencia de prácticas sanitarias e higiénicas del equipo de ordeño.
- Calidad sanitaria del agua y hielo utilizados en las diferentes áreas del procesamiento de alimentos. (Palma, 2015 y RSA-CONICET, 2019)

Los coliformes totales son un grupo de bacterias que comprenden todos los grupos de bacilos Gram negativos aerobios y anaerobios facultativos, no formadores de esporas, que se caracterizan por su capacidad para fermentar la lactosa con producción de ácido y gas, más o menos rápidamente (24h) y con una temperatura de incubación alrededor de 37°C.

Los coliformes se encuentran en el intestino del hombre y animales, así como también en el suelo, plantas, etc., por lo que su hallazgo en muestras de leche cruda está relacionado con la contaminación de origen fecal y, por lo tanto, es un indicio de la posible presencia de microorganismos patógenos de dicho origen (RSA-CONICET, 2019).

En un estudio hecho en leche cruda de cabra, en el Estado de Puebla, se identificó que el 50% de las muestras superaron los límites máximos permitidos de Bacterias Coliformes Totales de la NOM-243-SSA1-2010 (<10UFC/mL o gr) (Morales *et al*, 2012). Otro estudio en quesos frescos vendidos en la CDMX,

mostró aislamientos de Coliformes Totales (CT) en cantidades superiores a los recomendados, en un 13% de las muestras (Velázquez *et al.* 2016).

También es de gran importancia cuantificar los mohos y levaduras en los alimentos, puesto que, al establecer la cuenta de estos microorganismos, permite su uso como un indicador de prácticas sanitarias inadecuadas durante la producción y el almacenamiento de los productos, así como el uso de equipos desinfectados inadecuadamente, (Camacho *et al.*, 2009 y NOM-111-SSA1-1994).

Los mohos y levaduras están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se pueden encontrar formando parte de la flora normal de un alimento, o como agentes contaminantes, y en los equipos desinfectados inadecuadamente, provocando el deterioro fisicoquímico de los alimentos, debido a la utilización en su metabolismo de los carbohidratos, ácidos orgánicos, proteínas y lípidos, originando mal olor, alterando el sabor y el color en la superficie de los productos contaminados. Además, los mohos y levaduras pueden sintetizar metabolitos tóxicos termoresistentes, capaces de soportar algunas sustancias químicas, así como la irradiación y presentan capacidad para alterar sustratos desfavorables, permitiendo el crecimiento de bacterias patógenas (Camacho *et al.* 2009).

Otros microorganismos de gran importancia en la supervisión de la inocuidad de los alimentos son: *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella spp* y *Staphylococcus Coagulasa Negativa (SCN)* y *Staphylococcus aureus*.

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y está constituido por bacilos gram-negativos, generalmente móviles por flagelos peritricos, anaerobios facultativos y no esporulados. No fermentan la lactosa, intracelulares facultativos, que se han agrupado en las especies *S. enterica* y *S. bongori*; siendo *S. entérica* y subespecies: *S. enteritidis* y *S. typhimurium* las más patógenas, poseen un amplio rango de hospederos y la mayoría de las veces generan una enfermedad gastrointestinal en el ser humano. Esta bacteria es una de las más importantes al hablar sobre la inocuidad de los alimentos (Barreto *et al.* 2016). Su incidencia es más frecuente en quesos frescos elaborados con leche cruda (sin pasteurizar). Algunos estudios han encontrado *Salmonella spp.* en dichos productos en varios puntos de venta en México, como en un mercado de la Ciudad de México donde se tiene la referencia de una frecuencia de 2.5% en los quesos (54 muestras), de las cuales las más representativas fueron *S. montevideo* (22.5%), *S. anatum* (16.9%) y *S. typhi* (1.5%) (Torres-Vitela *et al.*, 2012); en un estudio en Guadalajara, Jalisco, en queso panela y adobera, se identificaron 142 cepas de *Salmonella spp.* Otro estudio realizado en el Estado de Tabasco, en 52 quesos frescos artesanales de leche cruda, 2 muestras salieron positivas a *Salmonella spp.* (Guzmán-Hernández *et al.*, 2016).

La salmonelosis es considerada una zoonosis de distribución mundial y de origen alimentario. La vía de transmisión es fecal-oral a través de vehículos como alimentos y agua contaminada con heces humanas o animales, así como por materiales y utensilios de cocina contaminados o por contacto directo de persona

a persona. Se ha demostrado asociación epidemiológica en los siguientes alimentos: carne de res, de aves, carne de cerdo, huevos, leche y productos lácteos sin pasteurizar y pescado. Por lo tanto, las medidas preventivas para evitar que *Salmonella* llegue a los alimentos y en minimizar/ controlar su proliferación y contaminación cruzada, son: prácticas higiénico sanitarias tanto en el proceso del alimento (pasteurización), en su transportación (cadena fría) y consumo de productos lácteos pasteurizados (Barreto *et al*, 2016).

Otro microorganismo importante en la industria lechera es *Escherichia coli*, la cual es un indicador de proceso que evidencian el grado de implementación de las BPHyM (OMS, 2018).

*Escherichia coli* pertenece a un grupo de bacterias fermentadoras de lactosa presentes en el intestino del ser humano y otros animales, siendo, la gran mayoría, inocuas en ellos. Sin embargo, hay algunas cepas productoras de toxinas, llamadas verotoxinas o toxinas de tipo shiga que pueden causar cuadros gastrointestinales graves en el ser humano. La infección que provoca *E.coli* es una zoonosis de origen alimentaria (OMS, 2018).

En el estudio de Torres-Vitela, *et. al.* en México, se observó una frecuencia del 20% de quesos panela con *E. coli* cepa O157:H7 y 4% en el queso adobera. Otra investigación llevada a cabo en Culiacán, Sinaloa donde se muestrearon 75 quesos frescos, se encontró que el 94% fueron positivos a *E. coli* (Soto *et al*, 2015). En México con respecto a *Escherichia coli*, se ha aislado en el 1.33% de quesos artesanales, donde se utilizó la pasteurización de la leche en su elaboración (Ortíz *et al* 2008) y 68.75% en quesos elaborados con leche no pasteurizada (Gutiérrez *et al* 2008).

*Escherichia coli* puede transmitirse al hombre a través de los alimentos por varias vías:

- En origen, en las unidades de producción ganaderas por una falta de higiene; a través del contacto directo con animales o canales infectadas con *E.coli* o indirectamente a través de los alimentos de origen animal y del agua contaminados. La presencia de *E.coli* en los alimentos de origen animal es debida a contaminación de origen fecal.
- En proceso de preparación de alimento, por falta de higiene e inadecuada manipulación, provocando una contaminación cruzada en los rastros o en las fases finales de transformación de los alimentos y en la preparación y cocinado de los alimentos en el hogar.
- Por las personas, quienes manipulan los alimentos pueden ser portadoras de *E.coli*, de forma que al manipular los alimentos, sin tener en cuenta unas buenas prácticas de higiene, contaminan los alimentos.
- Por el agua, ya que el riego puede estar contaminado con estiércol, contaminando frutas y verduras.
- Para controlar su crecimiento hay que mantener los alimentos refrigerados con temperaturas de 0-4°C y considerar que durante la congelación se inactiva

con temperaturas menores a los  $-18^{\circ}\text{C}$ . Son termorresistentes, pero se pueden eliminar con un tratamiento térmico a  $65^{\circ}\text{C}$  (OMS, 2018).

*Listeria monocytogenes* provoca una enfermedad zoonótica de gran relevancia, es otro de los microorganismos de importancia en estos productos al tener un alto nivel de patogenicidad. Estudios sobre esta bacteria, la identificaron en un 18% de muestras (Torres-Vitela 2012); otro estudio detectó 9.3% de 75 muestras positivas de quesos frescos a dicho microorganismo (Soto *et al*, 2015).

Las bacterias del género *Listeria spp.* son bacilos gram-positivos cortos, regulares, no esporulados ni ramificados, que suelen observarse en disposición individual o formando filamentos de 6-20 mm de longitud. Presentan de 1 a 5 flagelos peritricos que les confieren movilidad a  $28^{\circ}\text{C}$ . Las especies de *Listeria spp.* están muy extendidas en el medio ambiente. Se han aislado del suelo, materia vegetal en putrefacción, aguas residuales, comida animal, pollo fresco y congelado, alimentos frescos y procesados, queso, leche no pasteurizada, desechos de los rastros, así como en el tracto digestivo de humanos y animales asintomáticos. Debido a su amplia distribución, este microorganismo tiene muchas oportunidades de contaminar alimentos en los distintos pasos de la producción alimentaria, siendo ésta la vía más frecuente por la que el ser humano adquiere la infección (Elika, 2006)

*Brucella spp.* es un género de bacterias que provocan una zoonosis, se encuentra en los animales y se transmite al ser humano, principalmente, por consumo de alimentos derivados de animales infectados, como leche cruda y quesos frescos elaborados con leche cruda, produciendo la enfermedad conocida como Brucelosis.

*Brucella*, posee una gran capacidad para sobrevivir y persistir en el ambiente. El principal tratamiento para inactivarla durante la transformación de los alimentos es la pasteurización o tratamientos térmicos superiores a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Se han realizado varios estudios (Ontiveros *et al* 2008; Velázquez *et al* 2016; Gutiérrez *et al* 2008) para su identificación en leche y en sus derivados como los quesos frescos y yogurt, mismos que tuvieron un resultado negativo a las pruebas de aislamiento tanto para *Brucella spp.* y *Listeria monocytogenes*, lo que indica que existe una correcta pasteurización de la leche y/o un rebaño libre de brucelosis.

*Staphylococcus spp.* es un género de bacterias gram-positivas productoras de enterotoxinas termoestables ampliamente distribuido en el medio ambiente y presente en las mucosas de los animales y personas, se transmiten al ser humano a través de alimentos contaminados, provocando problemas de salud como diarrea, vómito, endocarditis, neumonía o infecciones de la piel (Ruiz *et al*, 2013). Los *Staphylococcus Coagulasa Negativa* (SCN) son en la actualidad los microorganismos más aislados en animales de ordeño y se consideran patógenos emergentes en infecciones de mastitis (Pyörälä & Taponen, 2009). Se encuentran en la piel sana del pezón y en las manos del ordeñador, son denominados microorganismos oportunistas, ya que habitan en zonas donde les es sencillo colonizar el canal del pezón y penetrar hasta el tejido secretor de la glándula

mamaria (Fernández *et al*, 2012). Hay más de 50 especies de *Staphylococcus* coagulasa negativo (Pyörälä & Taponen, 2009). Las especies más comunes aisladas de mastitis son *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. hyicus* y *S. simulans*. Especies como *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans* y *S. warneri*; pertenecen a la flora bacteriana normal de la piel del pezón, mientras *S. xylosus* y *S. sciuri* entre otras parecen provenir del medio ambiente (Rivera-Salazar *et al*, 2011).

Las infecciones por SCN pueden causar procesos graves y persistentes en la ubre, lo que provoca un aumento en el recuento de células somáticas y una disminución en la calidad y producción de la leche debido al daño causado en el tejido secretor (Pyörälä & Taponen, 2009).

También se ha observado que en este microorganismo el pH ácido, la elevada actividad del agua y la concentración de cloruro de sodio (NaCl) favorece su crecimiento en el queso fresco (Merchan *et al*, 2016).

## II.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Esta técnica de diagnóstico permite producir *in vitro*, grandes cantidades de una secuencia de ADN concreta sin recurrir a la clonación en un organismo huésped. Se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar cadenas de ADN, para lo cual se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas, alternadas para separar las cadenas de ADN recién formadas entre sí, tras cada fase de replicación y a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas. (Martínez *et al*, 2004).

Las aplicaciones de la PCR son prácticamente ilimitadas:

- Permite realizar muchos estudios de expresión genética
- Secuenciación directa de secuencias amplificadas
- Detección de mutaciones
- Seguimiento de la efectividad del tratamiento de enfermedades
- Diagnósticos de enfermedades genéticas e infecciosas
- Ciencia forense: identificación de restos biológicos, determinación de paternidad, pruebas periciales en criminalística
- Arqueología y paleontología (Martínez *et al*, 2004).

La PCR es un proceso que consta de tres pasos:

1. Desnaturalización: La primera reacción consiste en la desnaturalización del ADN, separándose las dos cadenas por ruptura de los enlaces de hidrógeno; las condiciones típicas de desnaturalización son 95°C por 30 segundos.
2. Alineación: La segunda reacción consiste en la hibridación de los primers. Para ello se baja la temperatura y las condiciones serán tales que se facilitará la unión de los primers a las cadenas.

3. Extensión: La tercera reacción se efectúa a 72°C, temperatura a la cual la polimerasa lleva a cabo su acción, insertando los diferentes nucleótidos complementarios en el orden que le va indicando la cadena que actúa como molde (Martínez *et al*, 2004).

Los tres pasos anteriores constituyen un ciclo. La repetición de este ciclo unas 40 veces, por ejemplo, permite obtener, como resultado de un experimento de amplificación, millones de copias del fragmento de interés.

Un primer, oligonucleótido o cebador es una secuencia corta de ADN de cadena simple que se utiliza en el PCR; se utiliza un par de primers para hibridar con el ADN de la muestra y definir la región del ADN que será amplificada (González *et al*, 2014).

Para encontrar bacterias del género *Salmonella spp.*, se utiliza un fragmento de 204 pares de bases (pb) del gen OMPC; este gen es el responsable de la proteína C involucrada en la invasión en células epiteliales y se encuentra en todas las bacterias de este género. (Guimarães de Freitas 2008)

En varios estudios se han encontrado patógenos (*Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.*) de la leche y sus productos por el método PCR (Poutou *et al*, 2005; Alcázar *et al*, 2006), se han aislado a partir de muestras de leche cruda y muestras de quesos. Estas técnicas permiten llevar un control más eficiente del proceso de producción, monitorear las prácticas de limpieza e higiene durante su obtención para así, tomar decisiones a corto plazo (Poutou *et al*, 2005).

### **III. JUSTIFICACIÓN**

Los productores de los municipios de Villa de Arista, Cerritos, Villa Juárez y Guadalcazar en San Luis Potosí, México, solicitaron apoyo para mejorar la calidad e inocuidad en su producción y venta de sus quesos. Para ello, en el proyecto se realizó la búsqueda y aislamiento bacteriológico de *Salmonella spp.*, *Brucella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* y el diagnóstico por PCR para *Salmonella spp.* Con los aislamientos microbiológicos que se obtengan, los productores podrán conocer las posibles causas de contaminación en sus productos, incluyendo los factores de riesgo que afectan la producción y aplicar recomendaciones que permitan implementar prácticas sanitarias adecuadas.

### **IV. HIPÓTESIS**

Los quesos elaborados con leche de cabra y cuajo natural no son inocuos al rebasar los límites permitidos de microorganismos de las NOM; se encontrará presencia de algunos microorganismos zoonóticos.

### **V. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la calidad higiénico sanitaria e inocuidad de los quesos frescos de leche de cabra producidos en los municipios de Villa de Arista, Cerritos, Villa

Juárez y Guadalucazar del Estado de San Luis Potosí, México; a través de análisis bacteriológicos y PCR para obtener información que oriente a los productores para que produzcan productos de mayor calidad higiénico-sanitaria e inocuos.

## **VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Conocer la cuenta de bacterias mesófilas aerobias y de coliformes totales de leche y de los quesos como reflejo del manejo sanitario de los productos y prácticas higiénicas.
- Determinar la cuenta de mohos y levaduras de leche y queso como indicador de prácticas sanitarias durante la producción y el almacenamiento de los productos.
- Aislar en la leche, cuajo y queso *Listeria monocytogenes*, *Brucella spp.*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* para conocer una posible contaminación alimenticia.
- Detectar *Salmonella spp.* en los quesos por medio de la técnica de PCR para corroborar el diagnóstico bacteriológico, dada su importancia como zoonosis en la salud pública.
- Determinar los posibles factores de riesgo que afectan la producción del queso.
- Ofrecer recomendaciones a los productores que permitan implementar prácticas sanitarias adecuadas.

## **VII. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **VII. 1. Estrategia General**

Este proyecto se realizó en los municipios de Villa de Arista, Cerritos, Villa Juárez y Guadalucazar del Estado de San Luis Potosí, México (Fig 1).

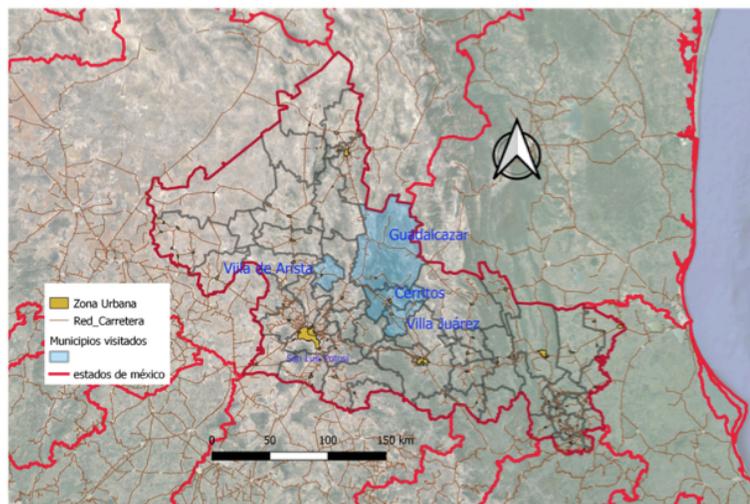


Fig 1. Localización del área de trabajo.

Se aplicó un cuestionario de implementación de BPP (Anexo 1) en cada unidad de producción muestreada; se tomaron muestras de leche, queso de cabra y el cuajo utilizado por dichos productores; se analizaron microbiológicamente y se realizó una PCR para corroborar el aislamiento de *Salmonella spp.*; al tener los resultados de las pruebas microbiológicas e identificar los factores de riesgo que están afectando la producción de quesos, se ofrecieron recomendaciones a los productores que los orienten para obtener quesos de mejor calidad higiénico-sanitaria e inocuos y obtener un mayor costo-beneficio (Fig 2 y 3).

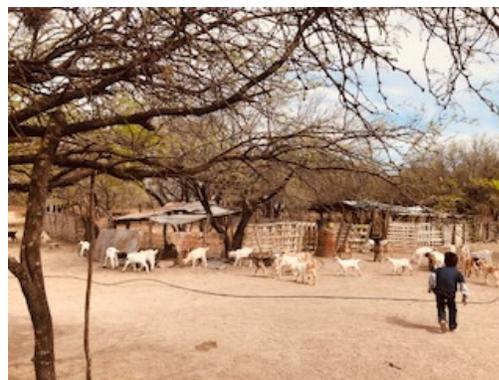


Fig 2 y 3. Corrales de cabras del municipio de Cerrito

## VII. 2. Muestreo

Se realizó un muestreo no aleatorio, de conveniencia a 34 productores de los cuatro municipios antes mencionados, se recolectaron 18 muestras de leche de cabra, 23 muestras de queso fresco de cabra y 11 muestras de cuajo utilizado por los productores, en frascos estériles, como se observa en el Cuadro 1.

Cuadro 1: Relación de productores y número de muestras por municipio en el Estado de San Luis Potosí

Municipio	Productores	Muestra de leche	Muestra de queso	Muestra de cuajo
Villa Juárez	6	5	2	1
Cerritos	11	4	9	6
Villa de Arista	6	1	6	4
Guadalcazar	11	8	6	0
Total	34	18	23	11

La leche se recolectó a nivel de tanque o perola en un frasco estéril. El queso se recolectó en las unidades de producción en bolsas estériles. Se tomó la muestra del cuajo directo en el lugar de la producción de los quesos en un frasco estéril. Se trasladaron las muestras a una temperatura de refrigeración (0-4°C) al laboratorio de bacteriología en el CENID Salud Animal e Inocuidad del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

Durante el muestreo se aplicó un cuestionario a cada productor donde se incluyeron preguntas cerradas a fin de identificar posibles factores de riesgo que afectan la producción de queso, considerando las Buenas Prácticas de Producción (BPP) descritas en el Manual de Buenas Prácticas de Producción de Leche Caprina que publica el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) (SENASICA, 2020) (Fig 4,5 y 6).



Fig 4. Ordeño manual



Fig 5. Cuajo comercial



Fig 6. Refrigeración de quesos

### VII. 3. Análisis microbiológico:

Se realizó de acuerdo a lo descrito en la NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico; se basa en la preparación de diluciones primarias, para obtener una distribución lo más uniforme posible de los microorganismos presentes en la porción de muestra:

- a) Para las muestras de leche y cuajo en las cuales la distribución de microorganismos es homogénea o fácilmente homogeneizable por medios mecánicos (agitación, etc.). Se tomó 1mL de la muestra y se diluyó en 9mL del diluyente, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente.
- b) Para las muestras de queso, a 10g de la muestra, se les adicionó 90mL del diluyente a temperatura de refrigeración, se trituroó el queso con el diluyente en una

bolsa estéril con ayuda de un rodillo hasta que se obtuvo una mezcla homogénea (Fig 7, 8 y 9).

c) Se utilizaron las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  para trabajar con las muestras.



Fig. 7. Muestras de quesos



Fig. 8. Macerado de las muestras



Fig. 9. Muestras para procesar

#### - **Conteo de mesófilos aerobios en las muestras de leche y queso:**

Para la cuantificación de mesófilos aerobios en las muestras se utilizó la metodología de la NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa:

1. Se colocó por duplicado en cajas Petri estériles, 1.0mL de cada una de las diluciones (8) de la muestra.
2. Se fundió el medio de agar estándar en agua destilada y esterilizó a  $121^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.
3. En cada caja de Petri se puso 1mL de inóculo, se vertió de 15.0 a 20.0 mL de agar estándar.
4. Se mezcló cuidadosamente el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis en el sentido de las manecillas del reloj, seis en sentido contrario y seis de atrás hacia adelante, sobre una superficie lisa, teniendo cuidado de no humedecer con el medio la tapa de la caja de Petri.
5. Se permitió que la mezcla en las cajas Petri se solidificará dejándolas reposar sobre una superficie horizontal fría.
6. Se voltearon las cajas y se colocaron en la incubadora a  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  (Fig 10 y 11).
7. Se contaron las colonias con el contador de colonias de cada placa después de 48h de incubación. Seleccionando aquellas placas que contenían entre 10 y 150 colonias y se multiplicó por el inverso de la dilución.
8. Se informaron las unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro (UFC/g o mL).

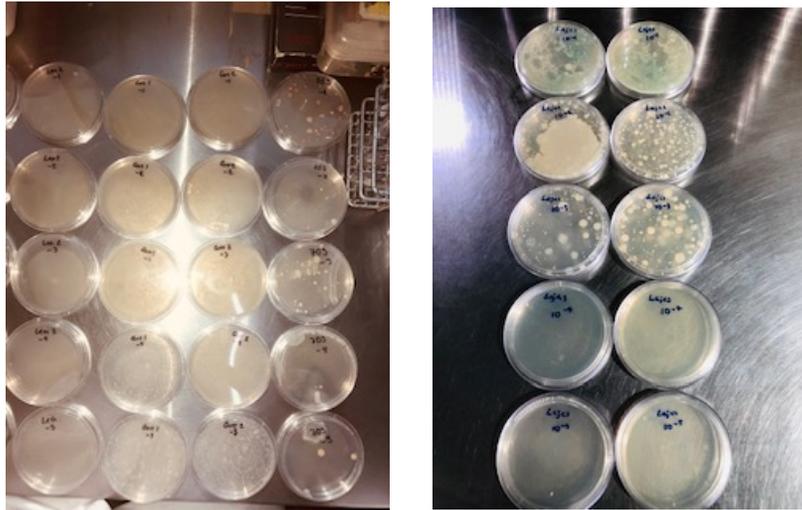


Fig. 10 y 11. Cajas de pruebas de conteo total

- **Conteo de coliformes totales en las muestras de leche y queso:**

Para la cuantificación de coliformes totales en las muestras se utilizó la metodología de la NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa:

1. Se colocó por duplicado en cajas Petri estériles, 1.0mL de cada una de las diluciones (8) de la muestra, utilizando una pipeta estéril.
2. Se fundió el medio de agar rojo bilis violeta en agua destilada.
3. En cada caja de Petri se colocó 1mL de inóculo, se vertió de 15.0 a 20.0mL de agar estándar.
4. Se mezcló cuidadosamente el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis en el sentido de las manecillas del reloj, seis en sentido contrario y seis de atrás hacia adelante, sobre una superficie lisa, teniendo cuidado de no humedecer con el medio la tapa de la caja de Petri.
5. Se permitió que la mezcla en las cajas Petri se solidificara dejándolas reposar sobre una superficie horizontal fría.
6. Se voltearon las cajas y se colocaron en la incubadora a  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24h (Fig 13).
7. Después del periodo especificado para la incubación, se contaron las colonias con el contador de colonias (Fig 12) y se multiplicó por el inverso de la dilución.
8. Se seleccionaron las placas que contenían entre 15 y 150 colonias. Las colonias típicas son de color rojo oscuro, generalmente se encuentran rodeadas de un halo de precipitación debido a las sales biliares.
9. Se informaron las unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro (UFC/g o mL).

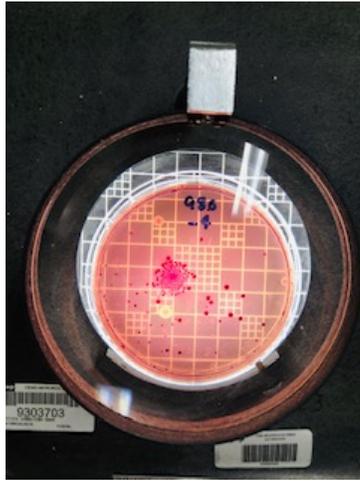


Fig. 12. Conteo con contador de colonias

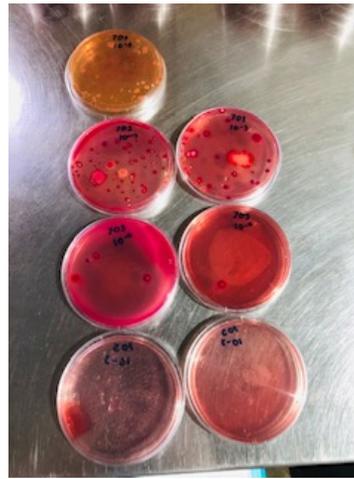


Fig. 13. Cajas de pruebas de coliformes totales

Los resultados obtenidos fueron comparados con lo establecido en la NOM:243:SSA1:2010 Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba y con la NMX-F-728-COFOCALEC-2017 Sistema producto leche-alimentos-lácteos-leche cruda de cabra-especificaciones fisicoquímicas, sanitarias y métodos de prueba.

- **Conteo de mohos y levaduras (MyL) en las muestras de leche y queso:**

Los hongos filamentosos (mohos) y levaduras se cuantificaron de acuerdo a la NOM-111-SSA1-1994 Bienes y Servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos:

1. Se colocó por duplicado en cajas Petri estériles, 1.0mL de cada una de las diluciones (8) de la muestra, utilizando una pipeta estéril.
2. Se fundió el medio de agar papa dextrosa en agua destilada y se esterilizó a  $121^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.
3. Para lograr acidificar los medios a un pH de 3.5, se adicionó por cada 100mL de agar, 1.4mL de ácido tartárico al 10% esterilizado.
4. En cada caja de Petri con 1mL de inóculo, se vertió de 15.0 a 20.0mL de agar papa dextrosa acidificado.
5. Se mezcló cuidadosamente el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis en el sentido de las manecillas del reloj, seis en sentido contrario y seis de atrás hacia adelante, sobre una superficie lisa, teniendo cuidado de no humedecer con el medio la tapa de la caja de Petri.
6. Se permitió que la mezcla en las cajas Petri solidifique, dejándolas reposar sobre una superficie horizontal fría.
7. Se voltearon las cajas y se colocaron en la incubadora a  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  (Fig 14 y 15).
8. Se contaron los hongos y las levaduras por separado de cada placa después de 48h de incubación con el contador de colonias.
9. Se informaron las unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro (UFC/g o mL).



Fig. 14. Hongo en conteo MyL

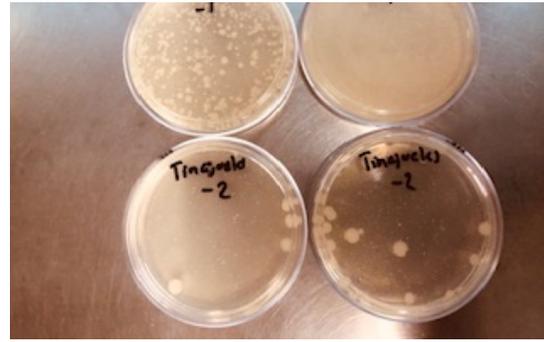


Fig. 15. Levaduras en conteo de MyL

Los resultados obtenidos también fueron comparados con lo establecido en la NOM:243:SSA1:2010.

- **Aislamiento e identificación de microorganismos:**

Para el aislamiento bacteriano cada muestra de leche, queso y cuajo se sembraron en diferentes medio de cultivo:

- Agar Sangre
- Agar MacConkey
- Agar Farrell (Farrell, 1974)
- CHROMagar Salmonella
- Agar Listeria

- **Aislamiento de *Salmonella spp.* según la NOM-114-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos y las colonias sospechosas se sembraron en CHROMagar Salmonella:**

De acuerdo a la NOM-114-SSA1-1994: Se pesó asépticamente 25g de la muestra en bolsa estéril y se adicionó 225 ml del medio de preenriquecimiento estéril (caldo lactosado) (Fig 16). Se mezcló y cubrió el recipiente enroscando suavemente la tapa y se incubaron 24h a 35°C. Se estiraron los productos que fueron pre enriquecidos en el CHROMagar (Fig 17 y 18) y se incubaron las placas 24h a 35°C. Se identificaron las cepas por el color de las colonias: azul (*E. coli*, *Citrobacter freundii* y *Klebsiella pneumoniae*) y morado (*Salmonella spp.*) y se realizó la tinción de Gram a las cepas aisladas. Después las muestras sospechosas se sometieron a las pruebas de oxidasa, catalasa y pruebas bioquímicas en los agares lisina-hierro (LIA) y triple azúcar-hierro (TSI) para determinar la presencia de ácido sulfhídrico.

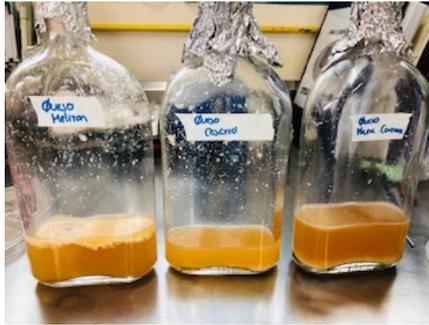


Fig. 16. Pre-enriquecimiento en caldo lactosado



Fig. 17 y 18. Aislamientos sembrados en hromoagar, donde se observan colonias de color azul típicas de *E. Coli* y *Klebsiella aerogenes*

- **Aislamiento de *Brucella spp.* en medio selectivo Farrell (Farrel, 1974):**

1. El medio de cultivo selectivo Farrell, el cual está constituido de una base de agar *Brucella*, suplemento selectivo de antimicrobianos y 5% de suero de ternera estéril.
2. Para preparar las muestras de leche se centrifugaron a 4000rpm durante 15 min con la finalidad de separar la grasa del sedimento. Se realizó la siembra del sedimento en las placas que se inocularon por duplicado para su incubación en presencia y ausencia de CO<sub>2</sub>.
3. Las muestras del queso se maceraron con solución salina fisiológica (SSF) y al igual que la leche, se inocularon por duplicado para su incubación en presencia y ausencia de CO<sub>2</sub>. Las muestras del cuajo se sembraron directamente en el medio por duplicado para su incubación en presencia y ausencia de CO<sub>2</sub>.
4. Se incubaron las placas durante 10 días, unas a 37°C con atmósfera normal y las otras a 37°C con atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Se realizó una revisión diaria de las cajas para ver algún crecimiento sospechoso de *Brucella spp.* (Fig 19).
5. Se realizó la tinción de Gram a las colonias sospechosas.

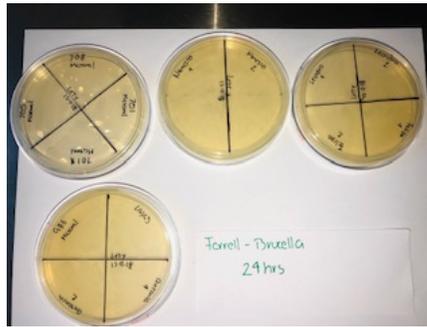


Fig. 19. Muestras sembradas en el medio Farrel

- **Aislamiento de *Listeria spp*:**

• Pre-enriquecimiento de las muestras:

1. Se inocularon 100  $\mu$ l de leche o de cuajo en caldo de enriquecimiento (tubo A), después se tomó 100  $\mu$ l del tubo A y se inoculó en 100  $\mu$ l del mismo caldo (tubo B).
2. Para las muestras de queso, se pesó 10g de la muestra, se adicionó 90mL del diluyente, se trituro el queso con el diluyente en una bolsa estéril con ayuda de un rodillo hasta que se obtuvo una mezcla homogénea y se obtuvo la dilución  $10^{-1}$ , se inoculó 100  $\mu$ l de la dilución  $10^{-1}$  del queso en 100  $\mu$ l del caldo enriquecedor (tubo A), después se tomó 100  $\mu$ l del tubo A y se inoculó en 100  $\mu$ l del mismo caldo (tubo B).
3. Se incubaron por 6h a 35°C.

• Siembra de muestras:

1. De cada tubo (A y B) se sembraron por duplicado 20  $\mu$ l en el agar *Listeria spp* que contenía suplemento (Fig 20).
2. Las cajas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera normal de 24 a 48h.
3. Se observaron las colonias y se realizó tinción de Gram a las colonias encontradas.
4. Se realizaron las pruebas de oxidasa, catalasa y las bioquímicas tradicionales.

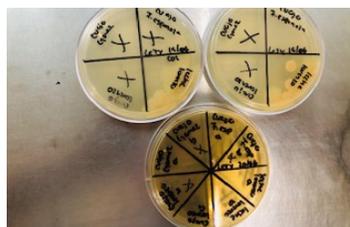


Fig 20. Caja de aislamiento de *Listeria spp*.

- **Aislamiento de *Escherichia coli* en medio MacConkey:**

1. Las muestras de leche, queso y cuajo se sembraron directamente en el agar MacConkey.
2. Las cajas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera normal de 24 a 48h.
3. Las colonias se identificaron por no fermentadoras y fermentadoras de lactosa (Fig 21 y 22).
4. Se realizó la tinción de Gram a las colonias sospechosas.
5. Se realizaron las pruebas de oxidasa, catalasa y las bioquímicas tradicionales (medio lisina y hierro (LIA), medio sulfhídrico indol movilidad (SIM), rojo de metilo, citrato, ureasa, medio indol y ornitina (MIO), reducción de nitratos, medio hierro triple azúcar (TSI) y óxido/fermentación (O/F) para conocer el género y especie de las cepas encontradas (Fig. 23) y (Fig. 24).

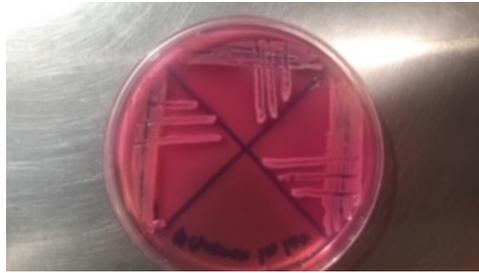


Fig. 21 y 22. Aislamientos de fermentadores de lactosa



Fig 23. Bioquímica de *Klebsiella aerogenes*



Fig 24. Bioquímica de *Escherichia coli*

- **Aislamiento de *Staphylococcus spp.* en agar sangre:**

1. Las muestras de leche, queso y cuajo se sembraron directamente en el agar sangre para identificar las bacterias (Fig 25 y 26).
2. Las cajas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera normal de 24 a 48h.
3. Las colonias que crecieron se separan por el tipo de hemólisis que producían:  $\alpha$  hemólisis (lisis parcial de glóbulos rojos),  $\beta$  hemólisis (lisis total de glóbulos rojos) y  $\gamma$  hemólisis (no hay hemólisis).
4. Se realizó la tinción de Gram.
5. Se realizaron las pruebas de oxidasa, catalasa y óxido/fermentación (Fig 27 y 28) para conocer el género y especie de las cepas aisladas.
6. Para diferenciar *Staphylococcus spp.* se realizó la prueba de coagulasa en tubo.



Fig. 25 y 26. Aislamientos en agar sangre.



Fig 27. Pruebas de óxido/fermentación para cocos +



Fig 28. Pruebas de catalasa y oxidasa

## VII. 4. Detección de *Salmonella* mediante PCR

### VII.4.1. Obtención de ADN

Antes de la extracción del ADN directo de los 23 quesos, se empleó la técnica del lavado del queso para eliminar la grasa (Fig 29 y 30), propuesta por (Akihiko Hirai, 2011) (Anexo 2):



Fig. 29 y 30. Proceso de lavado de queso

Al terminar el lavado de los quesos, se realizó la extracción de ADN con la técnica de CTBA (Anexo 3) (Poutou *et al.* 2005) y se realizaron geles de una concentración de agarosa al 2.5% para observar la integridad del ADN de las muestras de quesos y se vieron por electroforesis (Fig 31 y 32).

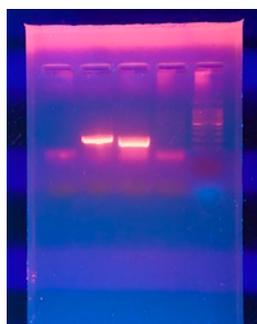


Fig. 31 y 32. Electroforesis de la integridad de ADN de muestras de queso

## VII. 5. PCR

Para determinar la inclusividad de los primers, el ADN obtenido de cultivos puros de *Salmonella typhi* ATCC 19430, *Salmonella sonnei* ATCC 25931 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, fueron sometidos a PCR, y para determinar la exclusividad, microorganismos patógenos genéticamente relacionados con *Salmonella* como *E. coli* ATCC 35218 y como control negativo *Staphylococcus aureus* ATCC 2913, fueron sometidos a PCR, empleando los mismos parámetros y condiciones de amplificación (Guimarães de Freitas, 2008).

Cuadro 2: Primers específicos utilizados del género de *Salmonella spp.*:

Agente	Primer	Secuencia	Tamaño	Referencia
<i>Salmonella spp.</i> , gen <i>ompC</i>	Primer OMPCF Primer OMPCR	(5' ATCGCTGACTTATGCAATCG 3') (5' CGGGTTGCGTTATAGGTCTG 3')	204Kb	Guimarães de Freitas, 2008

Para el PCR de *Salmonella spp* se realizó en un volumen final de 25µL, con la utilización de 23µl de Go Taq® Green Master Mix, 2X, más 2µL de ADN. Se utilizó como control positivo *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y como control negativo *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Se empleó un termociclador, programado de la siguiente manera (Guimarães de Freitas, 2008) (Fig 33 y 34) (Cuadro 3):

Cuadro 3: Programación del PCR

Etapa		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial		95°C	5min
29 ciclos	Desnaturalización	95°C	2min
	Alineación	57°C	2min 30seg

	Extensión	72°C	2min 30seg
	Extensión final	72°C	5min

Después se tomó 15µL de cada producto de PCR y fueron cargados en gel de agarosa al 2% durante 40min a 70V y fotografiado sobre iluminación UV (Camacho *et al*, 2008; Leotta *et al* 2005).



Fig. 33. Termociclador

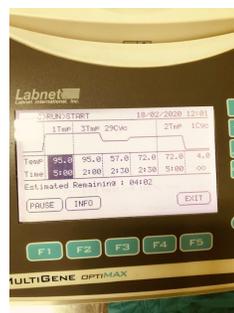


Fig. 34. Ciclo programado para PCR

## VII. 6. Análisis de los datos

Se realizaron medidas descriptivas que se presentan en cuadros y gráficas que muestran la frecuencia de aislamiento de las bacterias, hongos y levaduras, tanto para la leche, queso y cuajo.

Se realizó la prueba de ANOVA y prueba de Tukey comparando las medias de indicadores sanitarios de la leche cruda y de queso de cabra producidos en los diferentes municipios, considerando las BPP incluidas en los cuestionarios utilizados para su identificación.

También se realizaron correlaciones entre la implementación de las BPMeH y la calidad sanitaria de la leche cruda y del queso producido.

## VIII. RESULTADOS

### VIII. 1. Identificación de posibles factores de riesgo

El sistema de producción de las unidades encuestadas, es de pastoreo sin suplementación, todos presentan deficiencias en las instalaciones, contando solo con los corrales utilizados para el ordeño, permiten que los animales estén en pastoreo la mayoría del tiempo, excepto por las noches que son reclutados a los corrales adonde permanecen hasta el ordeño del día siguiente. Aunque el ordeño se realiza en espacios con espacio suficiente entre cabras antes y después del mismo, y aunque cuentan con pendientes y drenaje apropiados, el ordeño se realiza en pisos de tierra sin una limpieza previa y posterior de los corrales.

Al analizar los cuestionarios aplicados a los productores evaluados, se pudo identificar que existen deficiencias importantes en las condiciones higiénico sanitarias que se utilizan para el ordeño de las cabras (Anexo 1).

Todos los productores utilizan agua potable para la limpieza de la ubre y los utensilios requeridos para el ordeño y el almacen de la leche. De las prácticas de ordeño realizadas, se observó que solo se realiza la limpieza de los pezones antes del ordeño, sin realizar el presello previo al ordeño, ni el sellado al final del mismo.

Todos los productores almacenan la leche en tambos que son limpiados diariamente, observando que todos los quesos elaborados son fabricados con la leche sin pasteurizar, para ello utilizan cuajo natural en el 90 % de los encuestados, ya que solo 3 utilizan el cuajo comercial para la fabricación de los quesos.

La leche utilizada para la elaboración de los quesos se mantiene a la intemperie hasta su fabricación, la que sucede pocas horas después del ordeño. Los quesos se mantienen en refrigeración hasta su venta, la cual se realiza en forma local. Ningun productor realiza pruebas microbiologicas de control de calidad, ni a la leche ni al cuajo (Cuadro 4).

Cuadro 4. Resultados de los 34 cuestionarios de BPP aplicados.

Cuestionario	%	Cuestionario	%	Cuestionario	%	Cuestionario	%
Agua potable	100%	Animales están identificados individualmente y se conoce su etapa e historial productivo	0%	El operador usa vestimenta adecuada, limpia y exclusiva para llevar a cabo la ordeña	0%	Pasteuriza la leche para elaborar los quesos	0%
Monitoreo de calidad	0%	El traslado o arreo de los animales se evita golpear o estresar a los animales	100%	Se realiza enjuagado y lavado de los pezones con agua potable	100%	Venta local de quesos	100%
Suficiente	100%	Se controla el crecimiento de pezuñas y pelo	0%	Se usa y aplica correctamente el pre-sello	0%	Realiza alguna prueba microbiológica de sus quesos o de la leche	0%
Pastoreo	100%	Las paredes y piso de la sala de ordeño evitan la acumulación de contaminantes y su fácil limpieza	0%	Se usa y aplica correctamente el sello	0%	Guarda los quesos en refrigeración al finalizar su elaboración	100%
Complementación	0%	La sala o espacio de ordeño se encuentra en ambiente tranquilo y limpia	0%	Se secan los pezones con toallas desechables individuales	0%	Transporta los quesos a temperatura de refrigeración	100%
Corrales de maternidad separados, seguros y limpios	0%	Se dispone de agua potable en todo momento	100%	Se realiza el despunte	100%	Utiliza cuajo comercial	9%
Diseño y limpieza de los corrales reduce el riesgo de mastitis.	0%	La sala o espacio ordeño tiene suelo firme con pendiente a los drenajes y estos son eficientes.	0%	No hay animales domésticos de otras especies dentro de la sala o espacio de ordeño	0%	Conserva el cuajo natural en refrigeración	0%
Diseño de corrales y pasillos permiten el acceso de equipo de limpieza	0%	Los equipos y utensilios antes de iniciar la ordeña se verifica y se encuentran limpios.	100%	Se respetan los tiempos de retiro de productos farmacéuticos	100%	Pasteuriza el cuajo natural	0%
Corrales con espacio suficiente para la carga animal	100%	El operador realiza correctamente el lavado de manos antes de iniciar	100%	Almacena la leche en tambos o cubetas	100%	Realiza pruebas microbiológicas al cuajo	0%
Se evitan lugares de anidación y alimentación de fauna nociva	0%	El operador no tiene heridas, o infecciones aparentes en la piel y esta aparentemente sano	0%	Almacena la leche en refrigeración en temperaturas de 2-4°C	0%		

## VIII. 2. Resultados de muestras de leche de cabra

### Conteos de bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales.

Ninguna de las muestras recabadas cumplen con lo estipulado por la NMX-F-728-COFOCALEC-2017 ni por la NOM:243:SSA1:2010 al rebasar los límites aceptados, en todos los casos.

En el Cuadro 5 se muestran los resultados de las 18 muestras de leche procesada, los recuentos de mesófilos aerobios encontrándose conteos en

promedio de 7,07 log<sub>10</sub> UFC/ml con un máximo de 7,56 log<sub>10</sub> UFC/ml y un mínimo de 5,67 log<sub>10</sub> UFC/ml.

Al evaluar los recuentos de coliformes totales en la leche de los mismos productores se obtuvo en promedio 5,98 log<sub>10</sub> UFC/ml, encontrando un recuento máximo de 7,27 log<sub>10</sub> UFC/ml y uno mínimo de 3,30 log<sub>10</sub> UFC/ml, resultados muy superiores a lo recomendado.

En ambos conteos se encuentran 2 muestras de leche donde no se pudo realizar el conteo (SM).

Cuadro 5. Bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales en muestras de leche de cabra en municipios del Estado de San Luis Potosí.

<b>Muestra</b>	<b>Mesófilos Aerobios log 10</b>	<b>Coliformes Totales log 10</b>
1	7,56	6,18
2	7,51	6,09
3	7,46	6,16
4	7,44	7,12
5	7,14	5,79
6	7,23	6,16
7	7,24	6,05
8	7,11	7,18
9	7,30	7,27
10	5,67	5,18
11	7,38	6,58
12	6,65	5,11
13	7,05	5,65
14	7,04	5,70
15	7,48	6,23
16	SM	SM
17	SM	SM
18	5,88	3,30

Sin Muestra (SM)

Se compararon las medias de los indicadores sanitarios de la leche cruda de cabra producida por municipio, se puede observar en el Cuadro 6 que todos los conteos mostraron un comportamiento similar, excepto el caso de coliformes totales, donde se obtuvo que el municipio de Villa Arista fue significativamente más alto que el resto de los municipios.

Cuadro 6. Comparación de medias de indicadores sanitarios de la leche cruda de cabra producida en diferentes municipios del Estados de San Luis Potosí.

N	Media	Desviación Estándar	Error Estándar
---	-------	------------------------	-------------------

Mesófilos aerobios leche	Cerritos	11	6.718	.548	.165
	Guadalcazar	11	6.831	.605	.182
	Villa Arista	6	6.843	.573	.233
	Villa Juárez	6	7.387	.168	.068
	Total	34	6.895	.559	.095
Coliformes totales leche	Cerritos	11	5.644	.865	.261
	Guadalcazar	11	6.136	.782	.236
	Villa Arista	6	6.768*	.485	.198
	Villa Juárez	6	6.169	.509	.207
	Total	34	6.094	.799	.137
Mohos leche	Cerritos	11	.709	.717	.216
	Guadalcazar	11	.090	.301	.090
	Villa Arista	6	.166	.408	.166
	Villa Juárez	6	.267	.654	.267
	Total	34	.335	.588	.100
Levaduras leche	Cerritos	11	7.111	1.133	.341
	Guadalcazar	11	6.990	.981	.296
	Villa Arista	6	6.940	.958	.391
	Villa Juárez	6	6.677	.642	.262
	Total	34	6.965	.951	.163

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Al realizar el análisis de subconjuntos por medio de la prueba de Tukey, se obtuvo que las poblaciones de mesofílicos se comportaron de manera diferente en los 4 Municipios analizados, aunque la diferencia no es significativa, en el Cuadro 7 se muestra que el Municipio donde se obtuvieron mayores cuentas de mesofílicos fue el de Villa Juárez.

Cuadro 7. Prueba de Tukey en conteos de mesófilos aerobios en leche de cabra en municipios de San Luis Potosí

<b>Mesófilos aerobios leche</b>		
HSD Tukey <sup>a,b</sup>		
Municipio	N	Subconjunto para alfa = 0.05 1
Cerritos	11	6.718
Guadalcazar	11	6.831
Villa Arista	6	6.843
Villa Juárez	6	7.387
Sig.		.083

En el caso del conteo de coliformes totales en el Cuadro 8 se encuentran comportamientos diferentes entre los Municipios, encontrando una muestra que tuvo diferencia significativa, mostrando en general que el Municipio de Villa Arista fue donde hubo mayor presencia de coliformes.

Cuadro 8. Prueba de Tukey en conteos de coliformes totales en leche de cabra

<b>Coliformes totales leche</b>			
HSD Tukey <sup>a,b</sup>			
Municipio	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Cerritos	11	5.644	
Guadalcazar	11	6.136	6.136
Villa Juárez	6	6.169	6.169
Villa Arista	6	6.768	
Sig.		.503	.342

### Resultados de conteos de hongos y levaduras en leche.

Cuadro 9. Resultados de conteos de hongos y levaduras en muestras de leche de cabra

El recuento de hongos y levaduras de las muestras de leche procesadas (18) en los municipios de Villa de Arista, Cerritos, Villa Juárez y Guadalcazar del Estado de San Luis Potosí, se muestran en el Cuadro 9, donde se puede ver que el 77.7% (14/18) de las muestras no tuvo crecimiento de hongos y en las 4 muestras restantes, donde sí se tuvo crecimiento se cumple con lo establecido en la NOM:243:SSA1:2010. El conteo más alto de hongos, fue de 1,60 log<sub>10</sub> UFC/ml. Por el contrario, en el caso del crecimiento de levaduras, se encontró que el 94.4% (17/18) no cumple con lo establecido con la NOM:243:SSA1:2010 y que sólo una muestra de leche correspondiente al 5.5% (1/18), cumple, al tener conteos de 2,52 log<sub>10</sub> UFC/ml.

Muestra	Hongos log 10	Levaduras log 10
1	1,60*	6,40
2	0,00	6,25
3	0,00	6,02
4	0,00	7,54
5	0,00	7,43
6	0,00	7,47
7	0,00	7,55
8	0,00	7,50
9	0,00	7,05
10	1,00*	5,60
11	0,00	4,85
12	0,00	7,32
13	0,00	7,20
14	1,60*	7,40

15	0,00	8,43
16	1,00*	3,45
17	0,00	2,52**
18	0,00	4,98

\* Muestras que no cumplieron con la NOM:243:SSA1:2010

\*\* Única muestra que cumplió con la NOM:243:SSA1:2010

El análisis de subconjuntos por medio de la prueba de Tukey, al considerar los mohos aislados de las leche, mostró que el Municipio de Cerritos presentó los mayores conteos, existiendo diferencia entre los Municipios, pero sin observarse una diferencia estadística significativa (Cuadro 10).

Cuadro 10. Prueba de Tukey en conteos de mohos en leche de cabra

<b>Mohos leche</b>		
HSD Tukey <sup>a,b</sup>		
Municipio	N	Subconjunto para alfa = 0.05 1
Guadalcazar	11	.090
Villa Arista	6	.166
Villa Juárez	6	.267
Cerritos	11	.709
Sig.		.141

En el caso del conteo de levaduras en la leche, había diferencia entre Municipios, observándose que el Municipio de Cerritos presentó las cuentas más elevadas, sin presentar tampoco diferencias estadísticas significativas (Cuadro 11).

Cuadro 11. Prueba de Tukey en conteos de levaduras en leche de cabra

**Levaduras leche**

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

Municipio	N	Subconjunto para alfa = 0.05 1
Villa Juárez	6	6.677
Villa Arista	6	6.940
Guadalcazar	11	6.990
Cerritos	11	7.111
Sig.		.821

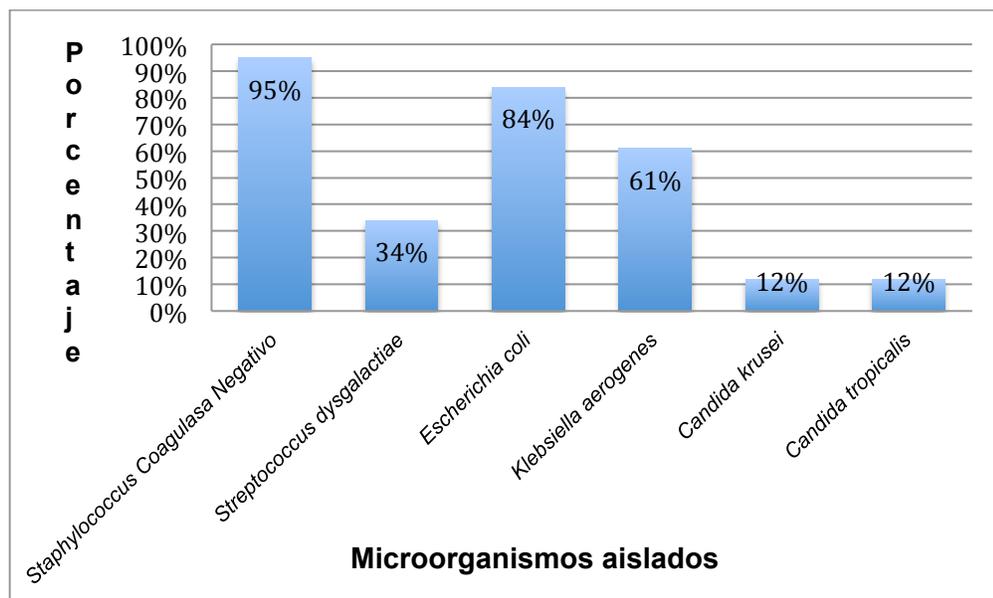
### Resultados de microorganismos aislados en las leches.

En la gráfica 1 se muestran los porcentajes de los microorganismos aislados en las diferentes muestras de leche (18), donde se observa que SCN son los microorganismos más aislados con el 95% (17/18), seguido de *E. coli* con el 84% (15/18), *Klebsiella aerogenes* con el 61% (11/18) y *Streptococcus dysgalactiae* 34% (6/18).

Se aislaron levaduras como *Candida krusei* y *Candida tropicalis* en un 12% (2/18) respectivamente.

No se aisló en ninguna de las muestras *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* ni *Brucella spp.*, respecto a los microorganismos patógenos mencionados en el estudio.

Gráfica 1. Porcentaje de microorganismos aislados en las 18 muestras de leche de los municipios.



### Correlaciones entre la implementación de las BPP y la calidad sanitaria de la leche cruda

Al evaluar la correlación entre la implementación de las BPP y la calidad sanitaria de la leche cruda se puede observar que existe una correlación entre la baja implementación de las buenas prácticas pecuarias y los altos valores de los indicadores, lo que significa que al no implementarse BPP entre los productores de leche los conteos de indicadores de calidad sanitaria en la leche, serán mayores (Cuadro 12).

Cuadro 12. Correlaciones entre la implementación de las BPP y La calidad sanitaria de la leche cruda

Indicador sanitario	Rho de Spearman	Significancia bilateral
Mesofílicos aerobios	0.608	0.023
Coliformes totales	0.612	0.046
Levaduras	.542	0.042

\*. La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral).

### VIII. 3. Resultados de muestras de quesos artesanales de leche de cabra.

#### Conteos de bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales.

Las 23 muestras de quesos artesanales elaborados en los municipios de Villa de Arista, Cerritos, Villa Juárez y Guadalcazar del Estado de San Luis Potosí, arrojan

recuentos de mesófilos aerobios, donde se puede ver que solo 2 muestras el 8.6% (2/23), obtuvieron cantidades por debajo del límite propuesto por la NMX-F-728-COFOCALEC-2017, que indica que el límite máximo debería ser 5 log<sub>10</sub> UFC/g, mientras que las 21 muestras restantes, 91.3%, resultaron con recuentos en promedio de 6,67 log<sub>10</sub> UFC/g y cuentas máximas de hasta 8,17 log<sub>10</sub> UFC/g, rebasando los límites máximos propuestos por la NMX-F-728-COFOCALEC-2017. En los resultados de crecimiento de coliformes totales, también se puede ver que, hay 2 muestras de queso, el 8.6% (2/23), que cumplen con la NOM-243-SSA1-2010 al estar por debajo del límite; mientras que el 91.3% (21/23) de muestras restantes, resultaron con un conteo en promedio de 4,68 log<sub>10</sub> UFC/g y conteos máximos de 7,78 log<sub>10</sub> UFC/g, incumpliendo lo permitido en esa NOM, al estar por arriba del límite establecido, que es de 2 log<sub>10</sub> UFC/g. (Cuadro 13).

Cuadro 13. Resultados de conteos de bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales en muestras de quesos de leche de cabra

Muestra	Mesófilos Aerobios log10	Coliformes Totales log10
1	7,23	6,28
2	7,25	3,31
3	5,26	SM
4	6,83	3,48
5	7,20	3,60
6	7,59	3,70
7	5,94	1,00**
8	7,54	5,45
9	5,70	5,06
10	7,68	6,23
11	6,10	SM
12	6,02	4,00
13	7,05	5,00
14	6,86	6,48
15	7,11	5,48
16	5,39	4,63
17	8,17	6,95
18	6,95	4,36
19	4,90*	1,60**
20	7,20	5,70
21	8,01	7,78
22	4,91*	4,58
23	6,53	3,69

\* Si cumple con lo  
NMX-F-728-COFOCALEC-

\*\* Si cumplió con la NOM-

establecido por la  
2017

243-SSA1-2010

Al comparar las medias de los indicadores sanitarios de la producción de queso artesanal de cabra producida por municipio, se puede observar en el Cuadro 14 que todos los conteos mostraron un comportamiento similar sin existir diferencia significativa entre los municipios analizados.

Cuadro 14. Comparación de medias de indicadores sanitarios del queso de cabra producida en diferentes municipios

		N	Media	Desviación Estandar	Error Estandar
Mesófilos aerobios queso	Cerritos	11	6.537	1.116	.336
	Guadalcazar	11	6.420	.846	.255
	Villa Arista	6	6.954	.695	.283
	Villa Juárez	6	7.043	.970	.396
	Total	34	6.662	.937	.160
Coliformes totales queso	Cerritos	11	5.358	1.726	.520

	Guadalcazar	11	5.367	2.381	.717
	Villa Arista	6	5.564	1.301	.531
	Villa Juárez	6	6.607	.886	.361
	Total	34	5.617	1.794	.307
Mohos queso	Cerritos	11	.545	1.293	.389
	Guadalcazar	11	.923	1.116	.336
	Villa Arista	6	.333	.816	.333
	Villa Juárez	6	.166	.408	.166
	Total	34	.563	1.045	.179
Levaduras queso	Cerritos	11	6.413	1.797	.542
	Guadalcazar	11	6.772	1.141	.344
	Villa Arista	6	6.842	1.861	.760
	Villa Juárez	6	7.401	.639	.261
	Total	34	6.779	1.441	.247

El análisis de subconjuntos por medio de la prueba de Tukey, al considerar los Mesofílicos aerobios aislados del queso, mostró que el Municipio de Villa Juárez presentó los mayores conteos, sin existir una diferencia estadística significativa (Cuadro 15).

Cuadro 15. Prueba de Tukey en conteos de Mesofílicos aerobios de queso de cabra

**Mesófilos aerobios queso**

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

Municipio	N	Subconjunto para alfa = 0.05 1
Guadalcazar	11	6.420
Cerritos	11	6.537
Villa Arista	6	6.954
Villa Juárez	6	7.0436
Sig.		.571

En el caso del conteo de coliformes totales en el queso, existieron comportamientos diferentes entre los municipios, mostrando también, en general, que el Municipio de Villa Juárez fue donde hubo mayor presencia de coliformes (Cuadro 16).

Cuadro 16. Prueba de Tukey en conteos de Coliformes totales de queso de cabra

**Coliformes totales queso**

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

Municipio	N	Subconjunto para alfa = 0.05 1
Cerritos	11	5.358
Guadalcazar	11	5.367
Villa Arista	6	5.564
Villa Juárez	6	6.607
Sig.		.536

## Resultados de conteos de hongos y levaduras.

En el Cuadro 17 se muestra el recuento de hongos y levaduras de las muestras de queso artesanal procesados, de los municipios de Villa de Arista, Cerritos, Villa Juárez y Guadalcazar del Estado de San Luis Potosí, donde se puede ver que el 69.5% (16/23) de las muestras no tienen crecimiento de hongos. También se observa que el 91.3% (21/23) de las muestras cumple con lo marcado por la NOM-243-SSA1-2010 y que los conteos más alto de hongos obtenidos fueron de 3,48 log<sub>10</sub> UFC/g y 4,00 log<sub>10</sub> UFC/g, encontrándose por arriba del límite, que es de 2,69 log<sub>10</sub> UFC/g.

En los resultados obtenidos en el conteo de levaduras se puede observar que ninguna de las muestras (0/23) cumplen con la NOM-243-SSA1-2010, al encontrarse conteos que están por arriba del límite, encontrando conteos de hasta 8,23 log<sub>10</sub> UFC/g y un promedio de 6,35 log<sub>10</sub> UFC/g. (Cuadro 17).

Cuadro 17. Resultados de conteos de hongos y levaduras en muestras de quesos de leche de cabra.

Muestra	Hongos log 10	Levaduras log 10
1	1,00	7,53
2	3,48*	7,28
3	1,70	3,99
4	1,95	6,83
5	0,00	6,08
6	0,00	6,76
7	0,00	5,95
8	4,00*	6,08
9	0,00	6,57
10	0,00	8,81
11	0,00	3,47
12	0,00	3,08
13	0,00	6,61
14	0,00	7,93
15	0,00	8,43
16	2,00	5,47
17	0,00	8,23
18	0,00	6,34
19	0,00	5,08
20	0,00	6,68
21	0,00	7,61
22	0,00	4,49
23	2,00	6,65

\* No cumple con lo establecido por la NOM-243-SSA1-2010

El análisis de subconjuntos por medio de la prueba de Tukey, al considerar los mohos aislados de los quesos, mostró que el Municipio de Guadalcazar presentó

los mayores conteos, existiendo diferencia entre los municipios, pero sin observarse una diferencia estadística significativa (Cuadro 18).

Cuadro 18. Prueba de Tukey en conteos de mohos en queso de cabra

**Mohos queso**

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

Municipio	N	Subconjunto para alfa = 0.05 1
Villa Juárez	6	.166
Villa Arista	6	.333
Cerritos	11	.545
Guadalcazar	11	.923
Sig.		.501

En el caso del conteo de levaduras en el queso, hubo diferencia entre municipios, observándose que el Municipio de Villa Juárez presentó las cuentas más elevadas, sin presentar diferencias estadísticas significativas (Cuadro 19).

Cuadro 19. Prueba de Tukey en conteos de levaduras en queso de cabra

**Levaduras queso**

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

Municipio	N	Subconjunto para alfa = 0.05 1
Cerritos	11	6.413
Guadalcazar	11	6.772
Villa Arista	6	6.842
Villa Juárez	6	7.401
Sig.		.555

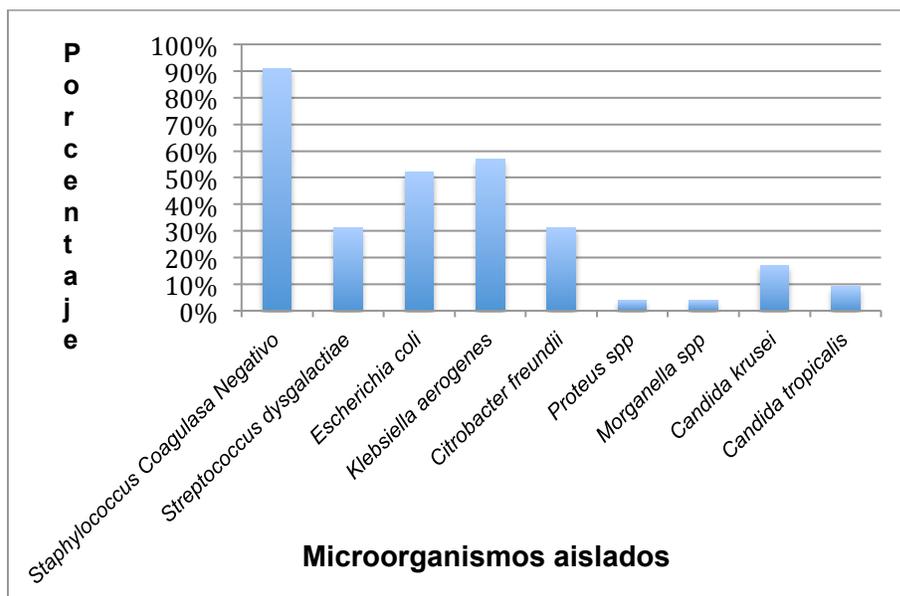
**Resultados de microorganismos aislados de quesos artesanales de leche de cabra.**

En la Gráfica 2 se muestran los porcentajes de los microorganismos aislados en las diferentes muestras de quesos (23), donde se observa que los SCN son los microorganismos más aislados con el 91% (21/23), seguido de *Klebsiella aerogenes* con el 57% (13/23), *E. coli* con el 52% (12/23), *Citrobacter freundii* y *Streptococcus dysgalactiae* 31% (7/23) y *Proteus spp.* y *Morganella spp.* con aislamientos equivalentes al 4% (1/23).

Además se observa que se aislaron levaduras como *Candida krusei* y *Candida tropicalis* con el 17% (4/23) y 9% (2/23), respectivamente.

En la muestras de queso tampoco se aisló *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* ni *Brucella spp.*

Gráfica 2. Porcentajes de microorganismos aislados en las 23 muestras de queso



Al evaluar la correlación entre la implementación de las BPM y la calidad sanitaria de los quesos de cabra, se puede observar que existe una correlación entre la baja implementación de las buenas prácticas de manufactura y los altos valores de los indicadores (Cuadro 20).

Cuadro 20. Correlaciones entre la implementación de las BPM y la calidad sanitaria de los quesos

Indicador sanitario	Rho de Spearman	Significancia bilateral
Mesofílicos aerobios	0.617	0.014
Coliformes totales	0.546	0.045
Levaduras	0.630	0.046

### Detección de *Salmonella spp.* en quesos artesanales por la técnica de PCR

En los quesos artesanales, se observó que solo 2 muestras de queso fresco de leche de cabra el 8.6% (2/23), generaron resultados de amplificación positivos para el gen *ompC* de *Salmonella spp.*, lo que significa que, aunque no se aislaron bacterias de este género en los quesos en los análisis bacteriológicos, si existían al encontrarse por esta técnica utilizada (Figuras 35 y 36).



Figura 35: Determinación de las condiciones para la amplificación simultánea de ADN proveniente de *Salmonella spp* del gen OMP. Carril 1. Testigo positivo de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 Carril 2,3,4 y 5. Muestras de ADN de los quesos muestreados negativos. Carril 6. Testigo negativo *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Carril 7. Testigo negativo de agua. Carril 8. Marcador de peso molecular.

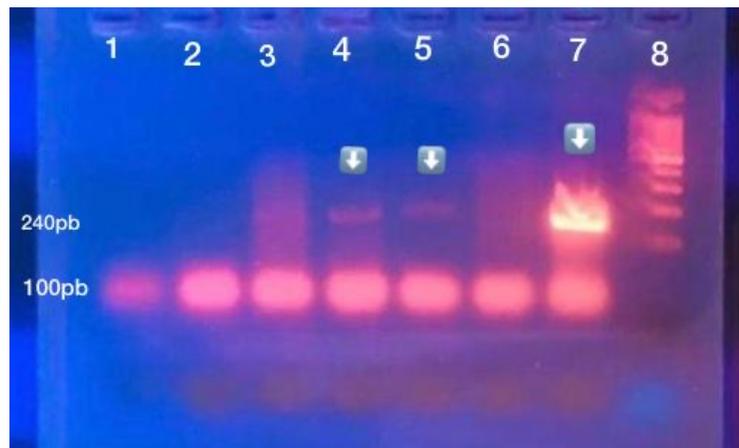


Figura 36: Amplificación de ADN proveniente de *Salmonella spp* del gen OMP. Carril 1. Testigo negativo de agua. Carril 2. Testigo negativo *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Carril 3. Muestra de ADN de queso muestreado negativo. Carril 4 y 5. Muestras de ADN de los quesos muestreados positivos al gen OMP de *Salmonella spp*. Carril 6. Muestra de ADN de queso muestreado negativo. Carril 7. Testigo positivo de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. Carril 8. Marcador de peso molecular.

#### VIII. 4. Resultados de muestras de cuajo.

##### Resultados de microorganismos aislados de cuajos.

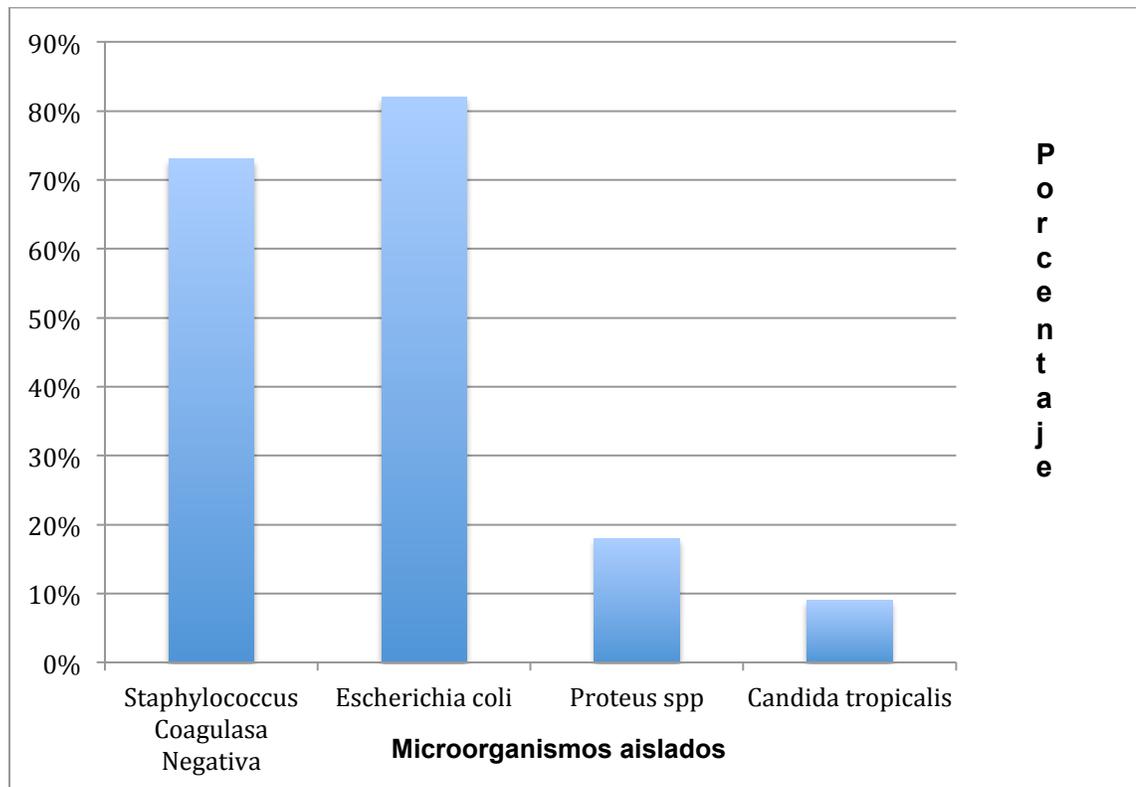
En la Gráfica 3 se muestran los porcentajes de los microorganismos aislados en las diferentes muestras de cuajo obtenidos (11), donde se observa que *E. coli* es el microorganismo más aislados con el 82% (9/11), seguido de *SCN* y *Proteus spp.* con 73% (8/11) y 18% (2/11), respectivamente.

Además se observa que en el cuajo solo se aislaron levaduras del género *Candida tropicalis* con el 9% (1/11), ya que *Candida Krusei* no se encontró en ninguna muestra.

En ninguna de las muestras de cuajo se detectó la presencia de *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* y *Brucella spp.*, respecto a los microorganismos patógenos mencionados en el estudio.

Cabe destacar, sin embargo, que 3 de los cuajos muestreados eran de origen comercial y que no tuvieron ningún aislamiento bacteriano, siendo estos inocuos.

Gráfica 3. Porcentaje de microorganismos aislados en las 11 muestras de cuajo



## IX. DISCUSIÓN

### IX. 1. LECHE

En lo relacionado al recuento de Mesofílicos aerobios y coliformes, en este estudio se comprobó que ninguno de los productores, de la región estudiada, cumple con lo estipulado por la NMX-F-728-COFOCALEC-2017 ni por la NOM:243:SSA1:2010, respectivamente, ya que todas las muestras de leche rebasaron los límites permitidos, situación que pone en manifiesto la existencia de deficiencias en todo el sistema de obtención del producto, es decir, evidencia una insuficiente higiene y desinfección en el establecimiento (Calvinho *et al.*, 1998; 2001). También se demuestra la contaminación microbiana de la leche cruda y las

malas prácticas de manipulación e higiene realizadas, la refrigeración a temperaturas inadecuadas y el prolongado almacenamiento de la leche, que incrementan el número de microorganismos en la leche, desde su obtención hasta llegar al consumidor (RSA-CONICET, 2019). Otras causas por las cuales se puede obtener un nivel alto de conteo de microorganismos indicadores de mala calidad higiénico-sanitaria son el ordeño de pezones sucios o mojados y la imposibilidad de enfriar rápidamente la leche a temperatura inferior a 4-6°C, denotando presencia en la leche de microorganismos mesófilos, en cantidades que superan los niveles permisibles. También es importante considerar, que entre las posibles razones de los altos recuentos de este grupo marcador se pueden mencionar las infecciones de la ubre, la falta de aplicación de correctos protocolos de limpieza y desinfección de los equipos y de los procedimientos de ordeño, así como la utilización de agua de calidad microbiológica inadecuada, sumado a las deficientes condiciones de almacenamiento de la leche (RSA-CONICET, 2019).

En estudio realizado con leche de cabra en Miravalles, Puebla, R. (Morales *et al*, 2012), reporta una media de mesofilos aerobios de 2.82 Log<sub>10</sub> UFC/ml, cantidad por debajo del límite mínimo obtenido en este estudio, cumpliendo con lo establecido en la NMX-F-728-COFOCALEC-2017 que es de 5.0 Log<sub>10</sub> UFC/ml. (Frau. *et al*, 2012) también reporta resultados menores a los obtenidos en este estudio, al tener conteos de mesófilos aerobios en promedio de 5,71 log<sub>10</sub> UFC/ml.

La leche cruda de las cabras, mostró elevados recuentos de coliformes totales, reflejo de las malas condiciones de higiene durante el proceso de ordeño. Cuando se evaluaron los recuentos de coliformes totales se obtuvo en promedio 5,98 log<sub>10</sub> UFC/ml, resultados superiores a los mostrados por Frau *et al* (2012), que reportó un promedio de CT de 3.83 log<sub>10</sub> UFC/g, sobrepasando ambos estudios los límites establecidos en la NOM:243:SSA1:2010. En la investigación realizada en Miravalles, Puebla por R. Morales *et al* (2012), se presentaron resultados contrarios a los obtenidos en este estudio, que muestran que el conteo de CT de mayor cantidad obtenido fue de 2.32 Log<sub>10</sub> UFC/ml.

Sin embargo, se menciona que, la presencia de un número elevado de CT constituye una evidencia patente de la contaminación fecal de la leche y del inadecuado manejo higiénico-sanitario, generalmente debido a la higiene deficiente durante la rutina de ordeño y la falta de limpieza de corrales, sumado a la falta de higiene durante el ordeño, la falta de agua en corrales para limpieza e higiene adecuada de utensilios para el traslado y procesamiento de la leche, además de ser un indicativo de la probable presencia de cepas patógenas ocasionantes de enfermedades infecciosas (Higgins *et al.*, 2007). (Murphy & Boor, 1998, RSA-CONICET, 2019)

Cabe mencionar que altas concentraciones de microorganismos propician un deterioro acelerado del producto, por lo que es necesario mejorar la calidad integral de la leche de cabra, incluyendo la pasteurización antes de su uso, con el fin de ofrecer un producto seguro para la población y una buena materia prima para la elaboración de quesos, razón por la cual es imprescindible además de

contar con animales sanos, implementar buenas prácticas de manejo, higiene y procesamiento durante todo el proceso de producción (RSA-CONICET, 2019).

El recuento de hongos obtenido en este estudio indica, que todas las muestras cumplen con lo estipulado en la NOM:243:SSA1:2010 y que por el contrario, los conteos de las levaduras muestran que solo una muestra está dentro de lo permitido por la misma NOM:243:SSA1:2010. En un estudio (Palladino *et al*, 2011) reportaron cuentas de hongos de 2 a 4 log<sub>10</sub> UFC/ml, las cuales son bastante más altas que las encontradas en este estudio.

Es importante mencionar que solo una muestra de leche, 5.5% (1/18), cumple con lo estipulado en la NOM:243:SSA1:2010 tanto para hongos como para levaduras, a pesar de ello, se encontraron grandes deficiencias durante el manejo del ordeño y el almacenaje de la leche, que denotan falta de higiene en todos los procesos realizados, como se observó en los cuestionarios realizados, donde se mostró que solo se realiza la limpieza de los pezones antes del ordeño, sin realizar el presello, ni el sellado al final del mismo, observándose además que la leche utilizada para la elaboración de los quesos se conserva a la intemperie hasta su fabricación, pocas horas después del ordeño, utilizando leche sin pasteurizar y cuajo natural en el 90 % de los encuestados, ya que solo 3 productores utilizan el cuajo comercial para la fabricación de los quesos.

En las muestras de leche obtenidas en este estudio, se observa que SCN son los microorganismos más aislados con el 95%; (Frau *et al*, 2012) en Tequisquiapan, Qro. aislaron un 63.1% de muestras positivas a SCN, resultados similares a los que reportan (Ruíz R., *et al*, 2013) donde refieren que las especies aisladas con mayor frecuencia en leche de cabra fueron también los SCN con un 63.9% (62/97), en sistemas de producción intensivo y semi-intensivo de cabras con mastitis subclínica. En el estudio de (Salaberry *et al* 2016), se indica que del total de muestras recogidas para análisis microbiológico (94) un 73,8% fue positivo a SCN y que todos estos resultados obtenidos y analizados se reflejan en la obtención de leche con baja calidad higiénico sanitaria.

En el aislamiento de *E. coli* en este estudio se obtuvo un 84%, en Miravalles, Puebla, (Morales *et al* 2012) en un estudio similar, reporta un 40% de aislamiento de dicho microorganismo, poniendo de manifiesto que el uso de agua no potable para la limpieza de los utensilios, los equipos de ordeño, los tanques de refrigeración, la higienización de la ubre y del personal, puede ser una fuente importante de contaminación de bacterias coliformes y *Pseudomonas* spp.

No se aisló en ninguna de las muestras *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* ni *Brucella* spp., respecto de los microorganismos patógenos mencionados en el estudio, denotando el gran esfuerzo del gobierno mexicano en su Campaña Nacional de Brucelosis, mostrando buenos resultados, ya que de ninguna muestra se aisló *Brucella* spp.; coincidiendo con los datos reportados en Suiza e Italia quienes tampoco aislaron este género bacteriano tan importante, de la leche utilizada para los quesos elaborados. (Muehlherr *et al* 2003 y Foschino *et al* 2002).

Otros microorganismos aislados en las muestras de leche fueron *Klebsiella aerogenes* con un 61% y *Streptococcus dysgalactiae* con un 34%, resultados que muestran la posibilidad de ocasionar enfermedades zoonóticas relativas a estos dos agentes patógenos, además de tener relación directa con procesos de mastitis en los rebaños con ordeño manual principalmente, donde la higiene del ordeñador es fundamental para evitar la contaminación de la leche, favoreciendo el crecimiento de los microorganismos e impidiendo obtener productos lácteos con una calidad higiénico-sanitaria adecuada.

En este estudio, también se observa que en la leche se aislaron levaduras como *Candida krusei* y *Candida tropicalis* cursó con el 12% cada una, al tener presencia de mohos y levaduras se muestra la deficiencia en la higiene y almacenamiento de los utensilios que se usan en los procesos de ordeño y almacenaje de la leche y queso con una mala cadena fría (Camacho *et al*, 2009 y NOM-111-SSA1-1994).

Es importante mencionar que, a pesar de que no se aislaron otros microorganismos patógenos, las muestras de leche evaluadas en este estudio presentan altas concentraciones de microorganismos indicadores, mostrando que la presencia de patógenos infecciosos tales como SCN, *E. coli*, *Klebsiella aerogenes* y *Streptococcus dysgalactiae* es factible, representando un alto riesgo para la salud pública.

## **IX. 2. QUESO**

En este estudio, es importante considerar que los quesos aquí evaluados, son elaborados con leche sin pasteurizar, por lo tanto se asocian a altos conteos de UFC de mesófilos aerobios y coliformes totales, encontrándose por arriba de lo recomendado por la NOM-243-SSA-2010 y por la NMX-F-728-COFOCALEC-2017, incluyendo la presencia de los microorganismos patógenos en todas las muestras procesadas. tales como *Escherichia coli*, SCN, *Klebsiella aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Proteus spp.* y *Morganella spp*

Los resultados obtenidos, coinciden con los reportados por otros autores en muestras de quesos con características similares, donde se reporta un promedio de  $8,14 \pm 0,48 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$  de mesofílicos aerobios (González-Montiel *et al* 2015). De igual manera, en el estudio de (Palladino *et al* 2011) se puede apreciar que el recuento promedio para mesófilos aerobios fue de  $7.65 \pm 0.34 \text{ log } 10 \text{ UFC/g}$ .

En otro estudio se muestran conteos de mesófilos aerobios igualmente altos de muestras de quesos de cabra, indicando una nula o baja implementación de prácticas higiénico-sanitarias y, como consecuencia, un riesgo de enfermedad para el consumidor (Vásquez *et al*, 2012).

En los resultados de crecimiento de coliformes totales se tienen coincidencias con los reportados por otros autores en muestras de quesos frescos de cabra y de manufactura artesanal, donde se reportan un promedio de coliformes totales de  $6,94 \pm 0,71 \text{ log}_{10} \text{ UFC/g}$ . (Gonzalez-Montiel *et al* 2015) También, en los estudios de (Durán *et al*, 2010) y de (Palladino *et al*, 2011), reportaron, respectivamente,

3,4 log<sub>10</sub> NMP/g y < 3 log<sub>10</sub> NMP/g de enterobacterias totales en quesos fresco, resultados todos que denotan importantes deficiencias en el manejo de la leche y de los procesos de manufactura y almacenaje. También en Argentina, en un estudio realizado con queso de cabra el 55,9% de los quesos fueron positivos para esta especie microbiana, la cual fue aislada tanto de muestras obtenidas del centro (21,5%) como de la corteza (47,3%) de los quesos (RSA-CONICET, 2019).

Solo una muestra (1/23, 4.3%) obtuvo resultados, tanto de conteo de mesófilos aerobios como de coliformes totales, permitidos, al mismo tiempo, por la NMX-F-728-COFOCALEC-2017 y por la NOM-243-SSA1-2010, aunque también se aislaron, de estas muestras del estudio, otros microorganismos patógenos y se observó además, deficiencias importantes de higiene en la elaboración del producto, así como de su almacenaje para la venta.

En el recuento de hongos de las muestras de queso artesanal procesados, es importante considerar que, aunque sean bajos los crecimientos de hongos obtenidos en este estudio, la elaboración de quesos muestra deficiencias importantes que provocan una gran contaminación del producto y que ponen en peligro a los consumidores, tales como la deficiente limpieza e higienización de los utensilios con que se fabrican estos quesos (RSA-CONICET, 2019).

En los resultados obtenidos en el conteo de levaduras se observa que ninguna de las muestras (0/23) cumplen con la NOM-243-SSA1-2010, al encontrarse conteos que están por arriba del límite, teniendo conteos de hasta 8,23 log<sub>10</sub> UFC/g y un promedio de 6,35 log<sub>10</sub> UFC/g; estos resultados coinciden con el estudio (González-Montiel *et al*, 2015), donde se reportó un promedio de 4,83 ± 0,67 Log<sub>10</sub> UFC/g de levaduras a una temperatura de incubación de 22°C. El estudio (Palladino *et al*, 2011) encontró conteos de hongos en el queso con un promedio menor a los aquí reportados, donde se obtuvo un valor máximo de 1,60 log<sub>10</sub> UFC/g.

Se aislaron en el queso de cabra 91% de muestras positivas a SCN, lo cual es un porcentaje alto si consideramos lo encontrado en un estudio hecho en Venezuela (Rodríguez *et al*. 2015), donde se obtuvo un 46.7% de pruebas positivas a SCN, ambos resultados indican que los aislamientos muestran grandes deficiencias en las prácticas pecuarias y/o de manufactura e higiene durante su proceso, desde la producción hasta almacenamiento.

En este estudio se aislaron de *Klebsiella aerogenes* el 57% de las muestras, seguido del 52% de muestras positivas a *E. coli*, microorganismos asociados a importantes enfermedades zoonótica, que podrían provocar ETAs a los consumidores.

Es importante mencionar que no se encontró *Salmonella spp*, *Brucella spp* ni *Listeria monocytogenes* lo que está acorde con la NOM-243-SSA-2010, que indica que 0 es el límite máximo para estos microorganismos.

Los resultados de la técnica de PCR muestran casos positivos a la presencia de *Salmonella spp* en dos muestras solamente, resultados diferentes a los obtenidos en el estudio microbiológico, donde no se logró aislar dicho microorganismo, situación que se puede deber a que las muestras tomadas para dicha técnica, fueron tomadas de la parte central del queso y existen estudios que muestran la presencia de este género en muestras tomadas del centro de los quesos de 8,7% a diferencia de la obtenida en la toma de muestras de la corteza que ascendió a 33.3% (RSA-CONICET, 2019). Asimismo en el trabajo (Alcázar *et al*, 2006) no se aisló *Salmonella spp.* en ningún queso.

En este estudio, se aislaron otros microorganismos, también importantes, como *Citrobacter freundii*, que tuvo una presencia de 31% de las muestras y que es un microorganismo de mucho interés y cuidado para el ser humano, ya que es muy parecido al género de *Salmonella spp.* y, por lo tanto, puede provocar enfermedades que ocasionen los mismos signos como: diarrea, vómitos, etc.

Otros estudios realizados en Venezuela (Durán *et al.* 2010) mostraron resultados donde también se aislaron *Citrobacter freundii spp.* y *Klebsiella aerogenes* con el 57%, *Streptococcus dysgalactiae* con el 31%, *Proteus spp.* con 4% y *Morganella spp.* con 4%, sin lograr aislamientos del género *Salmonella spp.*, como sucedió en este estudio. Existe también otro estudio donde se logró igualmente aislar de quesos de cabra el género *Morganella spp* (Chávez, 2016).

En este estudio, también se aislaron levaduras como *Candida krusei* y *Candida tropicalis* con el 17% y 9%, respectivamente. mismas que generalmente son asociadas al crecimiento de mohos y levaduras por deficiencias en la higiene y almacenamiento de los utensilios que se usan en los procesos de ordeño y deficiencias en la cadena fría tanto de la leche como del queso Camacho *et al*, 2009 y NOM-111-SSA1-1994).

### **IX. 3. CUAJO**

Los microorganismos aislados en las 11 muestras de cuajo obtenidos, muestran que *E. coli* es el microorganismo más aislados con el 82%, seguido de SCN y *Proteus spp.* con 73% y 18%, respectivamente. *Streptococcus dysgalactiae*, *Klebsiella aerogenes*, *Citrobacter freundii* y *Morganella spp.* no tuvieron crecimiento en ninguna muestra de cuajo. En el estudio (Bonafede 2017), los 6 cuajos analizados tuvieron porcentajes de aislamientos parecidos a los de este estudio, con un 100% de *E. coli*, <1,0 10<sup>2</sup> SCN y 100% *Streptococcus spp.* Así mismo en el estudio realizado por (Celis 2019), se analizaron muestras de cuajo bovino dónde se aisló *E. coli* en el 100% de las muestras, pero al igual que en este estudio, de ninguna muestra se aisló *Salmonella spp.*

En ninguna de las muestras de cuajo se detectó la presencia de *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* y *Brucella spp.* respecto a los microorganismos patógenos mencionados en el estudio, resultados similares a otros autores, que mostraron que en sus respectivos trabajos no se aislaron *Salmonella spp*, ni *L.*

*monocytogenes*, ni *Brucella spp.*, en ninguna de las muestras. (Moatsou *et al*, 2004; Moschopoulou *et al*, 2007; Palladino *et al*, 2011)

En los cuajos estudiados en este trabajo se observa que solo se aislaron levaduras *Candida tropicalis* con el 9%, ya que *Candida Krusei* no se encontró en ninguna muestra. Cabe destacar, sin embargo, que 2 de los cuajos muestreados eran de origen comercial y que no tuvieron ningún aislamiento bacteriano, siendo estos inocuos, por lo que su utilización, además, podría lograr estandarizar sabores y texturas de los quesos fabricados (RSA-CONICET, 2019).

La utilización de cuajo animal, en lugar de la utilización de preparados comerciales, en la fabricación de quesos artesanales elaborados con leche de cabra, es una práctica común entre los productores de la región Norte del Estado de San Luis Potosí, México, lo que denota una práctica ancestral, que pasa de una generación a otra, pensando siempre que su utilización le dará un mejor sabor al queso, situación que es totalmente errónea, porque no consideran la calidad higiénico sanitaria y el peligro del consumo de este tipos de quesos artesanales elaborados con cuajo natural. La utilización de cultivos comerciales ha demostrado obtener el mismo tipo de queso y con sabores aceptados, sin problema, por los consumidores en otras regiones del país.

## **X. RECOMENDACIONES**

A partir de los resultados obtenidos, los productores de los municipios de Villa de Arista, Cerritos, Villa Juárez y Guadalcázar del Estado de San Luis Potosí, México, deberán mejorar las instalaciones para descanso y ordeño de las cabras, colocando pisos de cemento con drenajes adecuados para evitar acumulaciones de agua y establecer estrategias para la mejora y el control de la calidad del queso de cabra que produzcan, que inicien, desde el proceso de ordeño para obtener la leche, realizando una limpieza e higiene de los pezones adecuada, procurando realizar el presello y pruebas de conteo de células somáticas en cada cabra, después el despunte y el lavado de manos constante entre cada cabra, y al finalizar el ordeño realizar el sellado, considerando después las buenas prácticas de manejo de la leche, procurando el filtrado de la leche utilizando material y utensilios adecuados y limpios, usando POES incluso para los utensilios y equipo de almacén, así como, la recomendación de enfriar la leche adecuadamente a menos de 4°C, lo más rápido posible.

Durante el proceso de elaboración del queso, es necesario primero, realizar la pasteurización de la leche, seguido de la utilización de cuajo comercial, que son inocuos y no contaminan los quesos, durante el proceso de elaboración, siempre logrando la utilización de equipo y utensilios muy limpios, siguiendo las BPM mínimas recomendadas por el SENASICA en el Manual de leche de cabra, para finalmente poder buscar la certificación de leche de cabra como lo marca Dirección General de Inocuidad de SENASICA, SADER.

Estas recomendaciones permitirán a los productores, sin lugar a dudas, obtener un producto inicial, la leche, que ayude a la aumentar la cantidad de queso con

una mejor calidad higienico sanitaria, que permitirá que mayor número de clientes conozcan sus productos y los consuman con seguridad, sin temor a provocar enfermedades causadas por su consumo y por lo tanto también mejorarán sus ingresos y habrá cada vez mas productores que traten de imitar tales acciones en general y así, sin lugar a dudas, se mejorará la producción de quesos de toda la región.

## **XI. CONCLUSIONES**

Las explotaciones lecheras en los municipios del Norte del Estado de San Luis Potosí, que incluyen los municipios Villa de Arista, Cerritos, Villa Juárez y Guadalcazar, que destinan su producción a la elaboración de quesos artesanales, son mayoritariamente familiares (siguiendo una tradición familiar) y de baja escala productiva (entre 5 a 60 litros diarios).

La mayoría de los productores no cuentan con instalaciones, equipamiento ni utensilios específicos para este tipo de actividad, que aseguren la inocuidad de la materia prima.

Los establecimientos dedicados a la producción y ordeño de cabras destinados a la elaboración de quesos artesanales son, en términos generales, pequeños y cuentan con instalaciones inadecuadas, acordes con sus escasos recursos económicos.

En la mayoría de estos establecimientos se ordeña manualmente en corral de piso de tierra, no están mecanizados y además no cuentan con protocolos de limpieza y rutinas de ordeño y ningún productor pasteuriza la leche para la elaboración de los quesos, además las condiciones de producción primaria caprina no son óptimas para la producción de leche, y a su vez en muchos casos no se tiene acceso a agua segura, tanto para la producción de leche, como para la elaboración de quesos. Estos factores son de relevancia para asegurar la inocuidad de los quesos.

Los quesos artesanales elaborados con leche caprina, presentan una elevada probabilidad de no ser aptos para el consumo humano y tienen cierto riesgo de generar efectos adversos en los consumidores.

Se aislaron tanto de la leche, como del queso de cabra, microorganismos patógenos importantes, tales como *Escherichia Coli*, SCN, *Streptococcus dysgalactiae*, *Klebsiella aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Proteus spp.* y *Morganella spp.*, que denotan contaminación de la leche y del queso y que provocan enfermedades al hombre y que ponen en riesgo su salud.

No se aislaron microorganismos patógenos como *Brucella spp.*, *Salmonella spp.*, ni *Listeria monocytogenes*, situación que permite tanto la permanencia de los fabricantes de queso, como de los quesos en el mercado, ya que no se han presentado aún brotes de zoonosis importantes causantes por enfermedades transmitidas por alimentos.

La elaboración de los quesos, presenta una gran deficiencia de buenas prácticas de manufactura y pecuarias en su elaboración, además de no mantener una cadena fría correctamente en su comercialización generando además gran contaminación de los mismos antes de su consumo.

Es necesaria la organización y capacitación de los productores, respecto a que se implementen buenas prácticas de manejo en el ordeño de las cabras y se utilicen

buenas prácticas de higiene que mejoren la calidad sanitaria de los quesos, de acuerdo a los límites establecidos en las NOM-243-SSA1-2010 y NMX-F-728-COFOCALEC-2017.

## **XII. REFERENCIAS**

1. Akihiko Hirai, Akiko Nakama, Takashi Chiba and Akemi Kai (2011) Development of a method for detecting *Coxiella burnetii* in cheese samples, Public health, J Vet Med Sci 2012 Feb; vol 74(2), pp175-80.
2. Alcázar Montañez Claudia D, Alonso Morales Rogelio A, Núñez Espinosa Fernando y Salud Rubio Lozano María (2006) Detección de Salmonella spp y Listeria Monocytogenes en quesos frescos y semimadurados que se expenden en vía pública en a ciudad de México, Rev Veterinaria México Vet. Méx., 37 (4), pp 417-429
3. Aréchiga, C.F.; Aguilera, J.I.; Rincón, R.M.; Méndez de Lara, S.; Bañuelos, V.R.; Meza-Herrera, C.A. (2008) Situación actual y perspectivas de la producción caprina ante el reto de la globalización Tropical and Subtropical Agroecosystems, vol. 9, núm. 1, pp. 1-14 Universidad Autónoma de Yucatán Mérida, Yucatán, México
4. Barreto Marlen, Castillo-Ruiz Mario y Retamal Patricio (2016) Salmonella enterica: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile, Universidad Autónoma de Chile. Rev. chil. infectol. vol.33 no.5 Santiago, pp 547-557
5. Bonafede, Mauro (2017), Coagulantes en la industria láctea artesanal: análisis del cuajo de cabrito en la tecnología quesera del noroeste Argentino (Tesis de licenciatura), Universidad Nacional del Litoral, Argentina.
6. Calvinho L.F., ; Canavesio, V.R., Aguirre, N. (1998) Análisis de leche del tanque de frío: una herramienta para detectar problemas y proponer soluciones. Publicación Miscelánea No 89, pp 73-74.
7. Calvinho L.F., ; Canavesio, V.R., Aguirre, N. (2001) Análisis de leche del tanque de frío, Chacra vol 243, pp 70.
8. Camacho A., Giles M., Ortegón A., Pelao B., Serrano B., Velazquez O. (2009) Técnicas para el análisis microbiológicos de alimentos, 2da edición, pp 1-17 Facultad de Química, UNAM

9. Cantú, R.E., Colín, N.M., Contreras, M., García, J. (1989). Estudios sobre la estacionalidad reproductiva de los machos caprinos de las razas Saanen y Alpina. En: Memorias de la V Reunión Nacional sobre Caprinocultura. Zacatecas, México, pp 67
10. Celis, Maria (2019), Determinación de parámetros para la obtención y conservación de cuajo bovino en el Distrito de Cajamarca (Tesis de Licenciatura), Universidad Nacional de Cajamarca, Perú.
11. Chacón Villalobos, Alejandro. (2005). Aspectos nutricionales de la leche de cabra (*Capra hircus*) y sus variaciones en el proceso agroindustrial. *Agronomía Mesoamericana*, vol. 16, núm. 2, julio-diciembre, pp. 239-252.
12. Chávez-Oberto, Víctor; Delgado, Darjis; Ruiz, Leonardo; Carrero, Lilia; Chirino-Zárraga, Carmen (2016) Aislamiento de *Morganella morganii morganii* en leche de cabra: a propósito de un caso de mastitis subclínica, *Revista Científica*, vol. XXVI, núm. 2, marzo-abril, pp. 80-85 Universidad del Zulia Maracaibo, Venezuela
13. Cuddy, S. H., S. L. Abbott, A. A. Marfin, B. Schulz, P. Wagner, K. Robbins, J. C. Mohle-Boetani, and D. J. Vugia (1999). Two outbreaks of multidrug-resistant *Salmonella* serotype Typhimurium DT104 infections linked to raw-milk cheese in northern California. *JAMA (J. Am. Med. Assoc.)* vol 281, pp1805–1810.
14. Crabbe, M.J.C. (2004) Rennets: General and molecular aspects. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, third edition, volume 1: General aspect. Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P., Eds. Elsevier Ltd. San Diego, California, U.S.A. pp 19-45.
15. Duran Luis, Sánchez Cecilia, Palmero Johny, Chaparro Luis, Garcia Tonny y Sánchez Edward (2010) Caracterización fisicoquímica y microbiológica de quesos de cabra en Carora, estado Lara, Venezuela, *Zootecnia Trop.* v.28 n.4, pp 467-475.
16. ELIKA, Fundación Vasca de Seguridad Alimentaria. (2013). Fecha descriptiva de *Brucella*. Sitio web: <https://seguridadalimentaria.elika.eus/wp-content/uploads/2018/01/11.Brucella.pdf>
17. ELIKA, Fundación Vasca de Seguridad Alimentaria. (2016). Fecha descriptiva de *Listeria monocytogenes*. Sitio web: <http://www.elika.net/datos/riesgos/Archivo21/Listeria.pdf>
18. I.D.Farrell (1974) The Development of a New Selective Medium for the Isolation of *Brucella abortus* from Contaminated Sources *Research in Veterinary Science*, Volume 16, Issue 3, May, Pages 280-286

19. Fernández Bolaños, Omar Fernando, Trujillo Graffe, José Eduardo, Peña Cabrera, John Jaiver, Cerquera Gallego, Jefferson y Granja Salcedo, Yury Tatiana (2012) Mastitis bovina: generalidades y métodos de diagnóstico, Revista Veterinaria REDVET
20. Foschino R, Invernizzi A, Barucco R & Stradiotto K.(2002) Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year. J Dairy Res. J Dairy Res, vol 69(2), pp 213-25
21. Fox Patrick. Timothy P. Guinee Timothy M. Cogan Paul L.H. McSweeney. (2017). Fundamentals of Cheese Science. Ireland: Springer
22. Frau, Florencia; Graciela Font; Raul Paz; Nora Pece (2012) Composición físico-química y calidad microbiológica de leche de cabra en rebaño bajo sistema extensivo en Santiago del Estero (Argentina) Revista de la Facultad de Agronomía, La Pata, Vol 111 (1), pp 1-7
23. González Flores, Rojas Herrera (2005), Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico, Salud Pública México, Vol. 47, pp 5.
24. González-Montiel Lucio, Franco-Fernández Melitón Jesús. (2015). Perfil microbiológico del queso de aro consumido en la Cañada Oaxaqueña. Brazilian Journal of Food Technology, vol.18 no.3, p. 250-257.
25. Gonzalez Pedraza, Pereira Sanandres, Soto Varela, Hernández Aguirre y Villareal Camacho (2014), Aislamiento microbiológico de Salmonella spp y herramientas moleculares para su detección, Revista Científica Salud Uninorte, vol 30, No 1, pp 73-94.
26. Guimarães de Freitas Camila, Santana Ángela Patrícia, Caldeira da Silva Patrícia Helena, Picão Gonçalves Vítor Salvador, de Aguilar Ferreira Barros Márcia, Araripe Gonçalves Torres Fernando, Sayori Murata Luci, Perecmanis Simone (2008), Multiplex de PCR para la detección de *Salmonella* Enteritidis, Typhi y Typhimurium en presencia en carne de aves de corral, RIMA, Vol 139, No. 1-2.
27. Gutiérrez Rómulo Amaro, Flores Mendiola Adriana Beatriz, Arias Medina José Alfonso, Hernández Andrade Laura, Santillán Flores Marco Antonio, Ontiveros Corpus María de Lourdes (2008), Prácticas de higiene e inocuidad en la producción de leche y derivados lácteos artesanales en el estado de Morelos, México. INIFAP.
28. Guzmán-Hernández (2016) Los quesos frescos de mexicanos no pasteurizados están contaminados con *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* productora de toxina Shiga no O157 y cepas de *E. coli* uropatógenas potenciales: un riesgo para la salud pública, Revista Internacional de Microbiología de Alimentos, Vol 237, pp 10-16.

29. Harboe, M.; Broe, M.L. and Qvist, K.B. (2010). The production, action and application of rennet and coagulants. In Technology of cheesemaking. Ed 2nd. pp. 98-129. United Kingdom: Wiley-Blackwell.
30. Higgins, J., Hohn, C., Hornor, S., Frana, M., Denver, M. y Joerger, R. (2007). Genotyping of *Escherichia coli* from environmental and animal samples. Journal of Microbiological Methods 70, pp 227-235
31. Leotta G.A., Chinen I., Epszteyn S., Miliwebsky E., Melamed I.C., Motter M., Ferrer M., Marey E., Rivas M. (2005) Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga, Rev. argent. microbiol. v.37 n.1, pp 1-10
32. Martínez A. y E. Rincón. 2004. PCR. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, pp 2-13, sitio web: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>
33. Merchán Castellanos Nuri Andrea, Pineda Gomez Lida Marcela, Cárdenas Parra Astrid Katerine, Gonzalez Neiza Nury Carolina, Otálora Rodriguez Maria Carolina y Sanchez Neira Yaline (2018) Microorganismos comúnmente reportados como causantes de enfermedades transmitidas por el queso fresco en las Américas, 2007-2016, Universidad de Boyacá, Tunja, Boyacá, Colombia. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología, vol 56, pp 1-7
34. Ministerio de Agricultura de Chile, (2011), Boletín de inteligencia de mercado Consejería Agrícola de Chile en México. Núm. 2, pp 1-3
35. Moatsou, G., Moschopoulou, E., Georgala, A., Zoidou, E., Kandarakis, I., Kaminarides, S. and Anifantakis, E. (2004). Effect of artisanal rennet from kids and lambs abomasa on the characteristics of Feta cheese. Food Chemistry, 88, pp 517-525.
36. Morales-Pablo R.; Avalos de la Cruz D.A.; Leyva-Ruelas G.; Ybarra-Moncada Ma. C. (2012). Calidad bacteriológica de leche cruda de cabra en Miravalles, Puebla. Rev, Mex. Ing. Quím, Vol 11, No 1, pp 45-54.
37. Moschopoulou, E., Kandarakis, I. and Anifantakis, E. (2007). Characteristics of lamb and kid artisanal liquid rennet used for traditional Feta cheese manufacture. Small Ruminant Research, 72, pp 237-241
38. Mühlherr J, Zweifel C, Corti S, Blanco J & Stephan R. (2003) Microbiological Quality of Raw Goat's and Ewe's Bulk-Tank Milk in Switzerland. Journal of Dairy Science vol 86(12), pp 3849-3856
39. Murphy S.C, Boor K.J., (1998), Raw milk bacteria tests and elevated bacteria counts on the farm: A review en: Proceeding of the Panamerican

- Congress on Mastitis Control and Milk Quality, Merida, Yucatan, Mexico. Pp 232-235.
40. NMX-F-728-COFOCALEC-2017. Sistema producto leche-alimentos-lácteos-leche cruda de cabra-especificaciones fisicoquímicas, sanitarias y métodos de prueba.
  41. NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
  42. NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
  43. NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
  44. NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.
  45. NOM-114-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos
  46. NOM-243-SSA-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
  47. Oliver, S. P., K. J. Boor, S. C. Murphy, and S. E. Murinda (2009). Food safety hazards associated with consumption of raw milk. *Foodborne Pathog. Dis.* vol 6, pp 793–806.
  48. Ontiveros CL, Hernández AL, Santillán FMA, Flores MAB, Amaro GR, (2008), Determinación de *Brucella Listeria* y micobacterias en leche, queso y yogur de elaboración artesanal en el Estado de Morelos, Congreso Internacional de Inocuidad Alimentaria,
  49. Organización Mundial de la Salud. (2018). Nota descriptiva, E. coli. de OMS Sitio web: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
  50. Palladino PM, Rodríguez HR, Molina RA, Ortigoza G, Moreno K, Chavez M, Mosana MO (2011), Inocuidad microbiológica de cuajos utilizados en la elaboración de quesos de cabra artesanales en el Valle de Amblayo, Provincia de Salta, Argentina. Congreso MICROAL 2012
  51. Palma Parodi, Camilo; Barrionuevo, Sonia; Corradetti, María Alicia (2015) Calidad de leche y queso de cabra. (Tesis de licenciatura) Evaluación de rendimiento quesero, Facultad de Ciencias Veterinarias, pp 23-27.

52. Potter, M. E., A. F. Kaufmann, P. A. Blake, and R. A. Feldman (1984). Unpasteurized milk: the hazards of a health fetish. *JAMA (J. Am. Med. Assoc.)* vol 252, pp 2048–2052
53. Poutou R., Burbano M., Sierra S., Torre K., Carrascal A.K., Mercado M. (2005). Estandarización de la extracción de ADN y validación de la PCR múltiple para detectar *Listeria monocytogenes* en queso, leche, carne de res y pollo. *Revista de facultad de ciencias Universitas Scientiarum*, 9-2, pp 61-78.
54. Pyorala Satu, Taponen Suvi (2009) Coagulase-negative staphylococci emerging mastitis problem, *Veterinary Microbiology*, Volume 134, Issues 1–2, pp 3-8.
55. Rivera-Salazar, Jhoandry; Mujica de Fernández, Isabel; Aranaga-Natera, Velina; Navarro-Ocando, Carlos; Zabala-Díaz, Irene; Atencio-Bracho, Lorena (2011) *Staphylococcus aureus* procedentes de quesos: susceptibilidad a antibióticos y su relación con plásmidos *Revista Científica*, vol. XXI, núm. 3, mayo-junio, pp. 202-210 Universidad del Zulia Maracaibo, Venezuela
56. Rodríguez PJE, Borrás SLM, Pulido MMO, García CDJ. (2015). Calidad microbiológica en quesos frescos artesanales distribuidos en plazas de mercado de Tunja, Colombia. *Rev Cubana Hig Epidemiol*, vol 53 (3), pp 2-8.
57. Rodríguez, R. Virginia, MSC., Calderón, R. Alfonso, MSC., Vergara, G. Oscar (2012) Calidad de leches crudas en tres empresas acopiadoras en Córdoba. *Rev. Colombiana cienc. Anim.* 6(1), pp 103-115.
58. RSA-CONICET (2019) Evaluación de riesgos de quesos artesanales elaborados con leche caprina, Argentina
59. Ruiz RRA, Cervantes ORA, Ducoing WAE, Hernandez AL y Martínez GD (2013) Principales géneros bacterianos aislados de leche de cabra en dos granjas del municipio de Tequisquiapan, Querétaro, México, *Rev. mex. de cienc. pecuarias* vol.4 no.1, pp 93-106
60. Ruiz Matus Cuitlahuac (2016). Enfermedades transmitidas por alimentos. Dirección General de Epidemiología. Salud Pública Mexicana, pp 2-15.
61. Salaberry Sandra, Saldenberg A, Zuniga E, Gonsales F, Melville P, Benites N (2016) Análise microbiológica e perfil de sensibilidade do *Staphylococcus* spp. em mastite subclínica de caprinos leiteiros, *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, ISSN: 0102-0935, Volume/Número/Ano: v. 68, n. 2, pp. 336-344.
62. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). (2020). Formatos oficiales para la evaluación de la conformidad de las Buenas Prácticas Pecuarias. SENASICA.

<https://www.gob.mx/senasica/documentos/formatos-oficiales-para-la-evaluacion-de-la-conformidad-de-las-buenas-practicas-pecuarias?state=published>

63. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), marzo 2020, consultado en: <https://www.gob.mx/siap>

64. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), marzo 2020, consultado en: <http://sinave.gob.mx/>

65. Soto Beltrán (2015) Prevalencia y caracterización de *Escherichia coli* de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Shiga* toxina aislada de pequeños mercados minoristas mexicanos de queso fresco, Revista Internacional de Investigación de Salud Ambiental, vol 25, No 2, pp 140-148.

66. Torres López (2016) Diagnóstico inicial de la red de valor caprin-leche en el Estado de Coahuila, 78pp.

67. Torres Vitela (2012), Incidence of Salmonella, Listeria monocytogenes, Escherichia coli O157:H7 and Staphylococcus Enterotoxin in two types of mexican fresh cheeses, 75:1, 79-84.

68. Vásquez, J.F.; Loaiza, E.T.; Olivera, M. (2012) Calidad higiénica y sanitaria de leche cruda acopiada en diferentes regiones colombianas. Orinoquia 16(2), pp 13-23.

69. Velázquez CBL, Hernández AL (2016), Calidad microbiológica de queso fresco en la Ciudad de México, Congreso Nacional e Internacional de Buiatría, pág 426-431.

### **XIII. Anexos**

#### **XIII.1. Anexo 1**

Cuestionario para la verificación de BPP:

<b>Verificación de la implementación de Buenas Prácticas Pecuarias</b>	
Nombre del productor	Fecha
Nombre de Unidad de Producción	
Domicilio	
No Animales	

Pregunta	Si	No	NA	Observaciones
<b>Alimentación</b>				
Pastoreo				
Complementación				
<b>Agua</b>				
El agua es potable y se monitorea su calidad				
El agua es suficiente y se ofrece en bebederos que no representen una potencial contaminación				
<b>Instalaciones</b>				
Los corrales y área de maternidad están diseñados a fin de proporcionar seguridad, confort y limpieza				
El diseño y limpieza de los corrales permite reducir el riesgo de mastitis ambiental				
El diseño de corrales y pasillos permiten el acceso de equipo de limpieza				
El espacio de corrales es suficiente para la carga animal				
Las paredes y piso de la sala de ordeño evitan la acumulación de contaminantes y su fácil limpieza				
Se evitan lugares de anidación y alimentación de fauna nociva				
La sala o espacio de ordeño se encuentra en ambiente tranquilo y limpia				
Se dispone de agua potable en todo momento				
La sala o espacio ordeño tiene suelo firme con pendiente a los drenajes y estos son eficientes.				
Los equipos y utensilios antes de iniciar la ordeña se verifica y se encuentran limpios.				
<b>Manejo de animales</b>				
Los animales están identificados individualmente y se conoce su etapa e historial productivo				
Durante el traslado o arreo de los animales se evita golpear o estresar a los animales				
El crecimiento de pezuñas y pelo se controla a fin de evitar contaminación de la leche				
<b>Ordeño</b>				
El operador acostumbra y realiza correctamente el lavado de manos antes de iniciar				
El operador no tiene heridas, o infecciones aparentes en la piel y esta aparentemente sano				
El operador usa vestimenta adecuada, limpia y exclusiva para llevar a cabo la ordeña				
Se realiza enjuagado y lavado de los pezones con agua potable				
Se usa y aplica correctamente el pre-sello				

Se usa y aplica correctamente el sello				
Se secan los pezones con toallas desechables individuales				
Se realiza el despunte				
No hay animales domésticos de otras especies dentro de la sala o espacio de ordeño				
Se respetan los tiempos de retiro sugeridos por proveedor de productos farmacéuticos				
<b>Almacenamiento de leche</b>				
Almacena la leche en tambos				
Almacena la leche en refrigeración				
<b>Quesos</b>				
Pasteuriza la leche para elaborar los quesos				
Compra el cuajo que utiliza en los quesos				
Conserva el cuajo en refrigeración				
Dónde vende sus quesos				
Realiza alguna prueba microbiológica de sus quesos o de la leche o cuajo				
Guarda los quesos en refrigeración al finalizar su elaboración				
Transporta los quesos a temperatura de refrigeración				

### **XIII.2. Anexo 2**

Técnica de lavado de queso para eliminar la grasa (*Akihiko Hirai, 2011*):

1. Tomar 20 gr de queso y adicionar 20mL de Buffer Fosfato Salino (PBS) un tubo Falcon y mezclar en Vortex.
2. Poner en baño María a 56°C por 30 minutos.
3. Centrifugar (Centrífuga Labnet®) 20 minutos a 3000 rpm.
4. Dejar reposar en el refrigerador una noche para tener una buena separación de la grasa.
5. Decantar el sobrenadante
6. Adicionar 15mL de PBS y mezclar en Vortex.
7. Poner a baño María a 45°C por 20 minutos
8. Mezclar en Vortex.
9. Centrifugar (Centrífuga Labnet®) 20 minutos a 2000rpm.
10. Dejar reposar en el refrigerador una noche para tener una buena separación de la grasa.
11. Decantar.

### XIII.3. Anexo 3

Técnica de extracción de ADN (Poutou *et al.* 2005):

1. Se tomó 200mg del queso lavado y se maceró con 500 µl PBS. Se centrifugó (Centrifuge 5424 eppendorf ®) a 12000g/1min y se decantó el sobrenadante.
2. Se agregó 400µl de buffer TE10X, 50µl de lisozima (10mg/ml), se agitó en Vortex y se incubó 1 hora a 37°C.
3. Se adicionó 75µl de SDS al 10% y 6µl de proteinasa K (10mg/ml), se agitó en Vortex y se incubó a 65°C/10min.
4. Se adicionó 100µl de NaCl 5M y 100µl de solución CTBA (precalentada a 65°C), se agitó en Vortex hasta obtener un color lechoso y se incubó a 65°C/10min.
5. Se adicionó 750µl solución cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se agitó en Vortex 10seg y se centrifugó (Centrifuge 5424 eppendorf ®) 5min a 12000g.
6. Se transfirió el sobrenadante (aprox 600µl) en un microtubo nuevo, con la precaución de toca la interfase.
7. Se adicionó 360µl alcohol isopropílico .
8. Se dejó reposar la muestra a -20°C por 30min o toda la noche.
9. Se centrifugó (Centrifuge 5424 eppendorf ®) 15min a 12000g, se decantó el sobrenadante, dejando aprox 20µl sobre el precipitado.
10. Se adicionó 500µl alcohol etílico al 70%, se invirtió suavemente el microtubo 10 veces con la mano. Se centrifugó (Centrifuge 5424 eppendorf ®) 5min a 12000g, se decantó el sobrenadante, dejando aprox 20µl sobre el precipitado.
11. Se centrifugó (Centrifuge 5424 eppendorf ®) 1min a 12000g. se decantó todo el sobrenadante.
12. Se permitió dejar secar el ADN a temperatura ambiente por 45min o se secó en Termoblock (Thermomixer eppendorf ®) a 58°C/10min.
13. Se resuspendió el ADN en 50µl de agua inyectable
14. Se puso en baño María a 55-60°C por 5min.
15. Se almacenó en congelación hasta su uso.s