



# UNIVERSIDAD DEL MAR

## DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus* Y SU RELACIÓN CON  
PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE QUESOS FRESCOS ARTESANALES  
EXPENDIDOS EN EL MERCADO DE PUERTO ESCONDIDO

### TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRA EN PRODUCCIÓN Y SANIDAD ANIMAL**

#### PRESENTA

Ing. Agro. Zoot. Ixayana Gurgua Gutiérrez

#### DIRECTOR

Dra. Mónica Marcela Galicia Jiménez

#### CODIRECTOR

Dr. Rafael Antonio Rojas Herrera

Puerto Escondido, Oaxaca, México

2022.

## **Dedicatoria**

A mi Padre Rosemberg Gurgua quien me enseñó a formar raíces para ser fuerte y construir alas para volar, gracias por tu amor incondicional, porque tienes las palabras correctas y tu voz en mi cabeza siempre me sabe guiar; no solo me diste la vida, también me regalaste un hogar, mi lugar favorito en el mundo ese donde me siento segura y siempre puedo regresar.

A mi Madre Adelita por regalarme el milagro de existir y haberme dado tanto aun sin pedirle nada.

A Sergio Yabin Cruz Cruz mi compañero de vida, aventuras, tempestades, amaneceres, triunfos y aprendizajes. Gracias por quererme en todos mis tiempos, con todas mis grietas, por ayudarme a descubrir tantas facetas, por enseñarme a valorar, amar a la familia y no tener miedo a tocar puertas, por amarme sin condiciones y llenar los silencios de mi ser.

A ella quien cuenta historias sin recordar que lo ha hecho antes, quien te sonrío, aunque sus ojos sean tristes y su cuerpo este cansado, quien me enseñó a seguir de pie, aunque no estén aquellos a quienes tanto amó. Ella quien con tan solo mirarla llena mi vida de calma. Mi María.

A mi querida, alegre y loca familia Gurgua: tíos gracias por su apoyo y cariño constante, primos y sobrinos gracias por enseñarme a disfrutar cada pequeño momento.

A la maravillosa familia Cruz quienes me abrieron las puertas de su hogar y me han acompañado y apoyado incondicionalmente desde el primer día. Mis cuñadas y sobrinos son magia.

## **Agradecimientos**

Dios gracias por concederme cada día que ha transcurrido hasta este momento, por la salud, los aprendizajes, los momentos inolvidables y sobre todo los seres llenos de magia que has traído a mi vida.

Agradezco a la Universidad del Mar campus Puerto Escondido, por permitirme ser parte de su matrícula estudiantil y con ello poder cumplir una meta más en mi vida.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnología (CONACYT) por la beca que me fue otorgó, misma que ha sido indispensable para culminar exitosamente el posgrado.

Doy gracias al Núcleo académico de la división de posgrado UMAR Campus Puerto Escondido por sus múltiples enseñanzas.

Infinitas gracias a la Dra. Mónica Marcela Galicia Jiménez por su paciencia, dedicación, apoyo incondicional, responsabilidad, confianza y guía desde el primer contacto tanto para la realización del proyecto de investigación como a nivel académico y personal. Me enseñó a buscar soluciones, alternativas, aprender de errores y sobre todo que las pausas son necesarias para llegar al objetivo. Es mi mentora y un gran ejemplo a seguir.

Agradezco al Dr. Rafael Rojas Herrera por sus aportes que enriquecieron e indicaron el camino adecuado para realizar los análisis microbiológicos y enfocar de la mejor manera esta investigación y al Dr. José Guadalupe Gamboa Alvarado por sus consejos, apoyo constante, recomendaciones para la mejora continua, así como también facilitar el laboratorio y material necesario para los análisis fisicoquímicos.

Gracias a la Dra. Irma Gisela Nieto Castañeda por su disposición y amabilidad en la realización de los análisis estadísticos y al Dr. Marco Antonio Camacho Escobar por sus observaciones y recomendaciones para este escrito, ambos ayudaron a conseguir una mejor calidad del resultado final.

Agradezco al Dr. Oziel Montañez del Centro Universitario del Sur de la Universidad de Guadalajara por su apoyo en la evaluación de las variables fisicoquímicas.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
I. Introducción	1
II. Revisión de literatura	3
2.1. Queso fresco artesanal	3
2.1.1. Tipos de Cuajos empleados en el proceso de elaboración	4
2.1.1.1. Natural	5
2.1.1.2. Industrial	6
2.2. Propiedades fisicoquímicas del queso fresco	6
2.2.1. Potencial de hidrógeno	6
2.2.2. Temperatura	7
2.2.3. Color	7
2.2.4. Agua	8
2.2.5. Materia seca	9
2.2.6. Proteína	9
2.2.7. Grasa	9
2.2.8. Cenizas	9
2.2.9. Calcio	10
2.2.10. Sal	10
2.2.11. Conductividad eléctrica	11
2.3. Quesos análogos	12
2.4. Tipos de quesos genuinos comercializados en la costa del estado de Oaxaca	13
2.4.1. Queso de aro	13
2.4.2. Queso de hoja	14
2.4.2.1. <i>Xanthosoma robustum</i>	15
2.5. Contaminación de los productos lácteos	17
2.5.1. Fuentes de contaminación	17
2.6. Precursor de la aparición de <i>S. aureus</i> , en quesos frescos artesanales	18
2.6.1. Mastitis	18
2.7. <i>Staphylococcus aureus</i>	19
2.8. Factores de virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i> .	21
2.8.1. Citotoxina: Leucocidina de Pantón-Valentine (LPV)	22
2.8.2. Citotoxina: Leucocidina DE y M	22
2.8.3. Citotoxinas hemolíticas	22
2.8.4. Toxinas exfoliativas	23
2.8.5. Toxinas Pirogénicas Superantígeno (PTSAg)	23
2.8.6. Enzimas extracelulares	23
2.9. Enterotoxina A y su relación con las intoxicaciones alimentarias estafilocócicas	23
2.10. <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (SARM)	24
2.10.1. Gen <i>mecA</i>	25
2.10.2. Elementos <i>SCCmec</i>	26
2.11. <i>Staphylococcus aureus</i> en la leche	28
2.12. <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (SARM) en quesos, México	29

2.13. Casos de <i>Staphylococcus aureus</i> reportados para quesos en México y Oaxaca	29
<b>III. Planteamiento del problema</b>	<b>31</b>
<b>IV. Hipótesis</b>	<b>33</b>
<b>V. Objetivos</b>	<b>34</b>
5.1 Objetivo general	34
5.2 Objetivos específicos	34
<b>VI. Materiales y métodos</b>	<b>35</b>
6.1 Área de estudio	35
6.2 Toma de muestra	35
6.3 Obtención de muestras compuestas	36
6.4 Determinación de Lugol	36
6.5 pH y temperatura	37
6.6 Color	37
6.6.1 Luminosidad (L*)	38
6.6.2 Coordenadas Rojo - Verde (a*)	38
6.6.3 Coordenadas Amarillo - Azul (b*)	38
6.6.4 Índice de Blancura (IB)	38
6.6.5 Índice Amarillo - Azul (IA)	38
6.6.6 Saturación de color (C*)	39
6.6.7 Angulo de matiz o tonalidad (h°)	39
6.7 Humedad, proteína cruda, grasa cruda y cenizas.	39
6.8 Materia seca	39
6.9 Calcio, cloruro de sodio y conductividad eléctrica	40
6.10 Cepa control	40
6.11 Extracción de ADN genómico.	40
6.12 Identificación de ADN bacteriano	42
6.13 Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> .	43
6.14 Perfil de virulencia de aislamientos de <i>Staphylococcus aureus</i>	44
6.15 Tipo de cassette cromosómico estafilocócico en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	45
6.16 Análisis estadístico	46
<b>VII. Resultados y discusión</b>	<b>47</b>
7.1 Origen de los quesos	47
7.2 Determinación de almidón	47
7.3 Variables fisicoquímicas	48
7.3.1 pH	48
7.3.2 Color	49
7.4 Variables bromatológicas	53
7.4.1 Humedad	54
7.4.2 Materia seca	54
7.4.3 Proteína Cruda	54
7.4.4 Grasa Cruda	55
7.4.5 Cenizas	56
7.4.6 Calcio	57
7.4.7 Cloruro de sodio	57
7.4.8 Conductividad eléctrica	57

7.5	Variables microbiológicas	58
7.5.1	Bacterias	58
7.5.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	58
7.5.3	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina	61
7.5.4	Perfil de virulencia	63
7.5.5	Tipo de cassette cromosómico	66
7.6	Relación entre las características fisicoquímicas y microbiológicas	68
7.6.1	Componentes principales de las variables que conforman el color	70
7.6.2	Componentes principales de las variables bromatológicas	71
7.6.3	Análisis de correspondencias múltiples	71
<b>VIII.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>75</b>
<b>IX.</b>	<b>Implicaciones y recomendaciones</b>	<b>76</b>
<b>X.</b>	<b>Glosario</b>	<b>77</b>
<b>XI.</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>80</b>
<b>XII.</b>	<b>Referencias</b>	<b>82</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Parámetros de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	19
Tabla II. Clasificación de las toxinas detectadas en <i>Staphylococcus aureus</i> en función del cuadro clínico	21
Tabla III. Parámetros de producción de enterotoxina de <i>Staphylococcus aureus</i>	24
Tabla IV. Estructura genética de los diferentes tipos de cassettes cromosomales descritos en <i>Staphylococcus aureus</i>	28
Tabla V. Características fenotípicas y genotípicas de la cepa control	40
Tabla VI. <i>Primers</i> para identificación de bacterias	42
Tabla VII. <i>Primers</i> para identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	43
Tabla VIII. <i>Primers</i> para el Perfil de virulencia	44
Tabla IX. <i>Primers</i> para determinar el tipo de cassette cromosómico estafilocócico	45
Tabla X. Distancia recorrida desde el origen de los quesos hasta Puerto Escondido, Oaxaca	47
Tabla XI. Determinación de almidón de las muestras de quesos frescos artesanales	48
Tabla XII. pH (Media $\pm$ Error Estándar) de las muestras de los quesos frescos artesanales	48
Tabla XIII. Características que conforman el Color (Media $\pm$ Error Estándar) de las muestras de quesos frescos artesanales	50
Tabla XIV. Características bromatológicas (Media $\pm$ Error Estándar) determinadas en las muestras de quesos frescos artesanales	53
Tabla XV. Identificación de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> por PCR en muestras de quesos frescos artesanales	59
Tabla XVI. Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilicina por PCR en muestras de quesos frescos artesanales	61
Tabla XVII. Perfil de virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i> por PCR-multiplex en muestras de quesos frescos artesanales	63
Tabla XVIII. Tipo de SCC <i>mec</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> por PCR-multiplex en muestras de quesos frescos artesanales	67
Tabla XIX. Comparación entre parámetros de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> y resultados fisicoquímicos de las diferentes muestras de quesos frescos artesanales evaluados	69
Tabla XX. Peso de las variables que conforman el color para los eigenvectores 1 y 2	70
Tabla XXI. Peso de las variables bromatológicas para los eigenvectores 1 y 2	71
Tabla XXII. Análisis de correspondencia múltiple utilizando todas las variables	101
Tabla XXIII. Análisis de correspondencia múltiple para las variables NaCl, EntE, etB y Tsst	101
Tabla XXIV. Análisis de correspondencia múltiple para las variables EntE, etB y Tsst	73

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Transformación de la leche en queso fresco	4
Figura 2. Planta de <i>Xanthosoma robustum</i>	16
Figura 3. Factores de virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i> .	21
Figura 4. El sitio <i>attB</i> en el que se integra <i>SCCmec</i> .	26
Figura 5. Esquema básico de la estructura de <i>SCCmec</i> .	27
Figura 6. Resultados de cada muestra para color a* y b* en el círculo cromático.	51
Figura 7. Producto de PCR para la detección de ADN bacteriano.	58
Figura 8. Producto de PCR multiplex para la detección de ADN perteneciente a <i>Staphylococcus aureus</i> y sus características.	59
Figura 9. Producto de PCR multiplex para la determinación del perfil de virulencia.	63
Figura 10. Producto de PCR multiplex para la detección del tipo de <i>SCCmec</i> .	67
Figura 11. Elementos <i>SCCmec</i> I-V observados en staphylococci	68
Figura 12. ACP de las variables que conforman el color.	70
Figura 13. ACP de las variables bromatológicas.	71
Figura 14. Análisis de correspondencia múltiple para las variables EntE, etB y Tsst	74

## RESUMEN

El consumo de quesos frescos artesanales es una práctica frecuente debido a su importancia en la cultura gastronómica de México y Oaxaca; sin embargo, el queso fresco se relaciona directamente con el desarrollo de intoxicaciones alimentarias y representa uno de los mayores riesgos en la transmisión de agentes patógenos multirresistentes a antibióticos, ambos sucesos ocasionados principalmente por la presencia de *Staphylococcus aureus*. La presente investigación se realizó con el fin de caracterizar la composición y diversidad genética de los factores de virulencia y los locus del gen *mecA* que pertenecen a *S. aureus*, como primer paso para abordar la ecología bacteriana y su relación con las propiedades fisicoquímicas determinadas en quesos frescos artesanales, comercializados en el mercado de Puerto Escondido en San Pedro Mixtepec, Oaxaca. Se adquirieron en tres queserías, seis muestras compuestas de queso de aro y hoja, para evaluarse mediante análisis fisicoquímicos y microbiológicos por PCR-múltiple. Las variables fisicoquímicas más importantes fueron pH, IA, h°, grasa, NaCl y Ca, las cuales mostraron diferencia estadística ( $P \leq 0.05$ ) entre las muestras a excepción del Ca. Se determinó la existencia de *S. aureus*, coagulasa positiva, resistente a meticilina con SCC*mec* IV en todos los quesos, los genes detectados codifican para enterotoxina E, toxina exfoliativa B y Tsst-1 presentes en dos, cuatro y tres de las muestras, respectivamente. Se concluye que existe un microambiente idóneo para el crecimiento de *S. aureus* y producción de sus toxinas, sin embargo, las propiedades fisicoquímicas no influyen en las características moleculares que *S. aureus* manifiesta.

**Palabras clave:** Alimentos contaminados con *Staphylococcus aureus*, intoxicación alimentaria estafilocócica, productos lácteos, seguridad alimentaria, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

## ABSTRACT

The consumption of fresh artisanal cheeses is a frequent practice due to its importance in the gastronomic culture of Mexico and Oaxaca, however, the fresh cheese is related to the development of food poisoning and represents one of the greatest risks in the transmission of multi-resistant pathogens to antibiotics, both events caused mainly by the presence of *Staphylococcus aureus*. The present investigation was carried out in order to characterize the composition and genetic diversity of the virulence factors and the loci of the *mecA* gene that belong to *S. aureus*, as a first step to address the bacterial ecology and its relationship with the physicochemical properties determined in fresh artisanal cheeses, sold in the Puerto Escondido market in San Pedro Mixtepec, Oaxaca. Six samples composed of rim and leaf cheese were purchased from three dairies to be evaluated by physicochemical and microbiological analysis by multiplex-PCR. The most important physicochemical variables were pH, AI, h°, fat, NaCl and Ca, which showed a statistical difference ( $P \leq 0.05$ ) between the samples, except for Ca. The existence of *S. aureus*, positive coagulase, resistant to methicillin with SCCmec IV was determined in all the cheeses, the detected genes code for enterotoxin E, exfoliative toxin B and Tsst-1 present in two, four and three of the samples, respectively. It is concluded that there is an ideal microenvironment for the growth of *S. aureus* and production of its toxins, however, the physicochemical properties do not influence the molecular characteristics that *S. aureus* manifests.

**Key words:** Food contaminated with *Staphylococcus aureus*, staphylococcal food poisoning, dairy products, food safety, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

## I. Introducción

El CODEX-STAN (2013) define al queso como un producto blando, semiduro, duro o extraduro, madurado o no madurado. En la transición de la leche a quesos de manera artesanal, suelen existir medidas precarias en los controles de calidad que se ejecutan durante el proceso, y representan una oportunidad para la reproducción de los microorganismos patógenos que pueden modificar la calidad de la leche, o bien de los quesos obtenidos como producto final.

La Intoxicación Alimentaria Estafilocócica (IAE) es una de las enfermedades más comunes transmitidas por alimentos en todo el mundo, como resultado del consumo de alimentos que contienen Enterotoxinas Estafilocócicas (ES) producidas principalmente por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (Frazier & Westhoff 2000, Argudín *et al.* 2010, Queiroga *et al.* 2013). La bacteria *S. aureus* es omnipresente en el medio ambiente y se puede encontrar en aire, agua, seres humanos y animales (Waage *et al.* 1999).

La leche y los productos lácteos, entre ellos el queso fresco, se relacionan directamente con la aparición de la intoxicación alimentaria por estafilococos (Sánchez-Valdés *et al.* 2016).

La mayoría de los quesos frescos que se comercializan en la región, sobre todo los de origen artesanal, son vendidos de manera ambulatoria o en distintos establecimientos como mercados. Estos quesos presentan una elevada carga microbiana que no es más que el reflejo de las carentes condiciones higiénicas en la manipulación y conservación del producto, por lo que representan un riesgo alto para la salud pública (Ampuero *et al.* 2015). Aunado a esta problemática, existen otras tales como la incorrecta terapia antibiótica del ganado productor de leche y la mala higiene durante el ordeño en las unidades lecheras. Ambas contribuyen al desarrollo de infecciones intramamarias; principalmente producidas por *S. aureus*, como en el caso de la mastitis, padecimiento de gran impacto para la producción y calidad de la leche.

A través de las investigaciones existentes se puede confirmar la presencia de este microorganismo en los quesos frescos. Saltos *et al.* (2018), en una Cooperativa de Producción Agropecuaria ubicada en Cuba, realizaron un conteo

microbiológico de *S. aureus* en quesos frescos, obtuvieron valores positivos y superiores a las normas establecidas por ese país. En este caso las causas esenciales de la contaminación fueron la falta de control microbiológico, la ausencia de control en la higiene del personal y precarias medidas en la calidad del agua. En México, Guzmán-Hernández junto a otros investigadores, en el año 2016, aislaron e identificaron a *S. aureus* en quesos frescos no pasteurizados y determinaron la presencia de cepas productoras de enterotoxinas. En adición, Adame-Gómez *et al.* (2018) en la ciudad de Chilpancingo, Guerrero; evaluaron la presencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) en quesos de leche cruda de vaca, y determinaron no sólo la existencia del microorganismo, sino también descubrieron que los quesos contenían la enterotoxina A.

La elaboración de productos artesanales a partir de leche cruda es una realidad en Latinoamérica, sobre todo en México, tanto en las comunidades rurales como en las áreas periurbanas de las ciudades (Adame-Gómez *et al.* 2018). El consumo de quesos frescos representa uno de los mayores riesgos en la transmisión de agentes patógenos multi resistentes a antibióticos, por lo que este estudio pretende determinar la presencia de SARM, y sus características moleculares en quesos frescos; así como relacionar dicho suceso con las propiedades fisicoquímicas que contiene tal producto alimenticio. A partir de los resultados obtenidos se busca plantear alternativas que permitan a la industria quesera local mejorar la calidad sanitaria de su producto.

## II. Revisión de literatura

### 2.1. Queso fresco artesanal

La leche es la sustancia segregada por la glándula mamaria (ubre) de los mamíferos hembra después del nacimiento de sus crías (Tigselema-Ortega 2012). En la industria láctea el ser humano es el responsable de su extracción, manejo y transformación de la leche, principalmente bovina en productos de larga duración tal como lo es el queso.

La recolección de la leche comúnmente se realiza de forma manual, mediante contenedores fabricados de materiales como metal o plástico, comúnmente denominados picheles. Durante el proceso de recepción, se efectúa la filtración y el almacenamiento del producto lácteo, a través de tinajas generalmente de acero a temperatura ambiente. Al homogenizar la materia prima que se ha recibido, en ocasiones solo se verifica el valor del pH, por lo que la calidad de la leche se vuelve cuestionable. En la producción de quesos frescos artesanales los tratamientos térmicos, así como también la aplicación de otros aditivos, son pocos usuales e incluso pueden llegar a ser desconocidos. La tecnología de fabricación es el resultado de una tradición familiar, puesto que es un conocimiento que se trasmite de generación en generación.

El queso hispano más popular que se encuentra en los Estados Unidos de América y México es el queso fresco. Tiene sabor suave a leche fresca, es ligeramente salado. Por lo general, la cuajada se muele finamente antes de salar, lo que le proporciona al queso la particularidad de desmoronarse. El queso contiene alrededor de 46% a 57% de humedad, 18% a 29% de grasa, 17% a 21% de proteína y 1% a 3% de sal, tiene un  $\text{pH} \geq 6.1$  (Ramírez-López & Vélez-Ruiz 2012).

Para que la leche sea transformada en queso fresco, es necesario que ocurra una transformación, la cual se divide en cuatro etapas y se muestra en la Figura 1.

El proceso de coagulación puede ser de tipo enzimática o ácida. En los quesos frescos artesanales, para llevar a cabo la coagulación enzimática, es preciso adicionar a la leche la enzima quimosina, misma que puede tener distintos orígenes, y comúnmente se le denomina cuajo. Para el desuerado, la técnica

utilizada es bastante rudimentaria y consiste en agitación constante, elevación de la temperatura, prensado y moldeado (Van-Hekken & Farkye 2003). Finalmente, la conservación del producto terminado se lleva a cabo en bolsas plásticas, hojas de diferentes plantas, petates de palma o empaques de bajo costo.

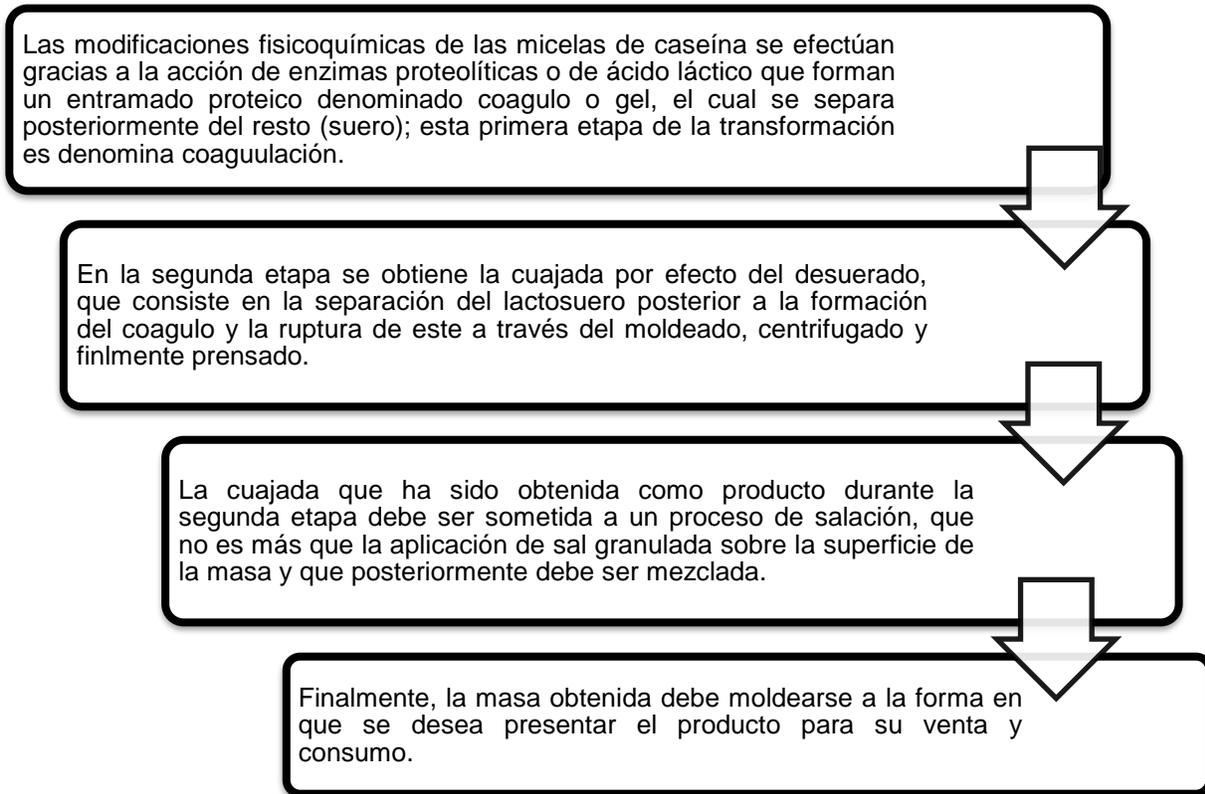


Figura 1. Transformación de la leche en queso fresco. Adaptado de Ramos *et al.* (2020).

### 2.1.1. Tipos de Cuajos empleados en el proceso de elaboración

El uso del cuajo, en la leche, tiene como objeto la formación de un coágulo firme, que busca retener la mayoría de los sólidos del producto lácteo; permitir su corte y agitación para eliminar el suero que queda atrapado en su interior al momento de elaborar el queso. Este proceso sucede por acción de la enzima renina o también denominada quimosina, que separa la caseína del suero (Talledo-Castillo 2020) dicha enzima presenta algunas características:

- Es resistente a la actividad de los ácidos.

- Es sensible en presencia de luz, lo que altera sus propiedades fisicoquímicas.
- La temperatura óptima para su actividad es 40 C y su destrucción ocurre a 60 C.
- El pH ideal para su acción es de 5.5 a 6.0 (Talledo-Castillo 2020).

Los productores de queso fresco artesanal utilizan diferentes técnicas e insumos para coagular la leche, los principales incluyen al cuajo de tipo natural e industrial.

#### 2.1.1.1. Natural

El cuajo natural es la enzima bruta extraída de los rumiantes jóvenes sacrificados antes del destete. Está constituido básicamente por una mezcla de quimosina y pepsina, producida en el abomaso de los terneros. En su mayoría es elaborado por el fabricante de quesos, se puede encontrar en presentación líquida o en pasta (Alais 1970).

Cuando se utiliza este tipo de cuajo, el proceso de coagulación tiene importantes variaciones de un productor a otro. La razón es el proceso de obtención e incorporación del cuajo. Las formas de extracción de las enzimas coagulantes presentan diversidad, algunos productores adicionan directamente a la leche un raspado del interior del abomaso; otros llenan los cuajares con leche y posteriormente agregan parte del coágulo producido al producto que desean coagular; y hay quienes cortan el cuajar luego lo maceran en agua, después adicionan el líquido obtenido a la leche para coagularse. Otro método de obtención artesanal consiste en deshidratar con NaCl el estómago, posteriormente dejarlo remojar entero o en trozos, en suero proveniente de una elaboración de quesos antecesora. De esta manera se busca extraer la enzima y el líquido obtenido se deja reposar durante aproximadamente un mes para que ocurra la fermentación, finalmente es adicionado a la leche que se utilizará como materia prima (Molinos 1981, Quispe-Ramos 2019). Adicionalmente, existen diferencias en la cantidad de cuajo que se emplea para elaborar quesos, por lo tanto, los tiempos de coagulación y el producto final son variables.

#### 2.1.1.2. Industrial

El cuajo industrial, está constituido por quimosina producida por organismos recombinantes, genéticamente modificados (hongos y bacterias) o de origen animal, representa una alternativa viable, de rápida obtención, es preparado industrialmente, su nivel de pureza es más alto que el cuajo de tipo natural tiene mayor poder coagulante y se presenta en forma de polvo, tableta o líquido (Talledo-Castillo 2020).

Se emplea en pequeñas cantidades que son especificadas por el fabricante, generalmente en su presentación líquida, se agrega a razón de 10 mL, por cada 100 L de leche tibia; el cuajo en pastillas de origen animal se utiliza de acuerdo con las dosis de la pastilla, que oscilan entre los 50 L y 100 L de leche. Una vez que ha sido preparado, debe agregarse de manera inmediata al equipo donde se elabora el queso, para evitar contaminaciones (López 2003).

### 2.2. Propiedades fisicoquímicas del queso fresco

Dentro de las propiedades que caracterizan a los quesos se encuentran pH, temperatura, color, humedad, materia seca, proteína cruda, grasa cruda, cenizas, distintos minerales, así como su capacidad de conducir a la electricidad.

#### 2.2.1. Potencial de hidrógeno

El potencial de hidrógeno en un alimento indica cuál es el grado de concentración de iones de hidrógeno. El pH tiene efecto en la red que forman las proteínas, que en consecuencia interviene en las propiedades de textura del queso. Valor de pH superior al punto donde las proteínas no tienen carga y son incapaz de desplazarse, provoca que las caseínas presenten carga negativa, lo que se traduce en una repulsión entre las redes proteicas, que finalmente producen quesos con mayor humedad, más elástico y menos compacto (López-Sánchez 2015). Por lo tanto, alta concentración de humedad y bajo nivel de pH impactan negativamente en la textura y el sabor de los quesos frescos (Ramírez-López & Vélez-Ruiz 2012).

El potencial de hidrógeno del queso también tiene acción sobre la mayoría de las bacterias, debido a que su crecimiento generalmente ocurre en un estrecho margen de pH, cercano a la neutralidad, entre 6.5 y 7.5. Algunas bacterias crecen a un pH ácido inferior a 4 (Velasco 2004).

### 2.2.2. Temperatura

La temperatura de un alimento sirve como un método de conservación, además tiene un alto impacto sobre la microbiota y su desarrollo. La temperatura no controlada tiene efectos sobre el agua que contienen los productos alimenticios, lo que se traduce en alteraciones en su composición y aumento de la disponibilidad del líquido para el crecimiento de microorganismos. La temperatura idónea para el crecimiento de casi todas las bacterias patógenas es 37 C. Por ello, un proceso de refrigeración adecuado previene el crecimiento de la mayoría de los microorganismos perjudiciales y de casi todas las bacterias patógenas (Velasco 2004).

### 2.2.3. Color

El color es un factor que suele emplearse para relacionar aspectos de la calidad de los alimentos tales como: sabor, naturalidad o madurez. En los quesos se ve influenciado por la composición de la materia prima (leche), el proceso de elaboración al que sean sometidos y el uso de aditivos (Vargas-Uscategui *et al.* 2017).

La Comisión Internacional de Iluminación (CIE, por sus siglas en francés de *Commission Internationale de l'Éclairage*) logró una representación uniforme del color, mediante el establecimiento de la luminosidad ( $L^*$ ), coordenadas rojo-verde ( $a^*$ ) y coordenadas amarillo-azul ( $b^*$ ), es un sistema cartesiano formado por tres ejes ortogonales, llamado espacio CIELab, usado para evaluar el color en el área de alimentos (CIE, 1976). Este sistema correlaciona los valores numéricos de color consistentemente con la percepción visual humana (Von-Atzingen & Machado-Pinto 2005).

- Luminosidad

El eje vertical  $L^*$ , representa la medida de luminosidad de un color que varía desde cero para negro hasta 100 para blanco. Un valor neutro (igual a cero) representaría un color neutro (gris).

- Espectro de coloración Rojo/Verde:

El eje horizontal  $a^*$  representa una medida del contenido rojo o verde de un color. Si un alimento tiene color rojo,  $a^*$  será positiva, mientras que, si se tiene color verde,  $a^*$  será negativa. Con lo anterior se entiende que  $a^*$  puede tener un valor de 60 hasta -60.

- Espectro de coloración Amarillo/Azul:

El eje horizontal de  $b^*$  es una coordenada cromática que va de  $+b^*$  (positivo), que indica amarillo y de  $-b^*$  (negativo) indicativo del azul. De igual forma que  $a^*$ ,  $b^*$  puede tener valores de 60 hasta -60 (Vargas-Uscategui *et al.* 2017, Sánchez-Estrada & Sánchez-Estrada 2020).

#### 2.2.4. Agua

El agua es el principal elemento en todos los quesos, puede estar presente en el suero o en la masa drenada que conforma al producto de origen lácteo; además, el agua desempeña un papel importante en el metabolismo bioquímico de los compuestos de la cuajada, otorga cualidades de color y es un factor de alto impacto en la vida de anaquel.

Actividad de agua ( $a_w$ ): Es una variable que se relaciona con el contenido de agua de un alimento, específicamente con el agua libre o que no se encuentra atrapada en el soluto. Es un factor determinante en la vida útil alimenticia, ya que indica el agua disponible para el crecimiento de microorganismos y la actividad enzimática durante la conservación del alimento. Toma valores entre cero y uno, valores alejados de uno, indican que la actividad biológica se dificultará, mientras que la conservación se facilitará y la vida útil podrá ser más prolongada (Vilgis 2015, Cardona-Serrate 2019).

#### 2.2.5. Materia seca

También denominado extracto seco o sólidos totales, es el resultado de la suma de componentes mayoritarios como grasa, proteínas y lactosa; además de minerales y vitaminas como componentes minoritarios (Puerto *et al.* 2003).

#### 2.2.6. Proteína

Las proteínas del queso provienen de la leche y son componentes nitrogenados, 80% son caseínas ( $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\kappa$  caseína) y 20% proteínas séricas (albumina y globulina) (Ballesta 2014). Las proteínas del queso se encuentran concentradas, tienen alto valor biológico, relación positiva con el contenido de caseínas en la leche, lo que en consecuencia aumenta la productividad del queso ocasionado por el incremento en la capacidad de retención de agua (Licata 2009, Villegas-Soto *et al.* 2017).

#### 2.2.7. Grasa

La grasa láctea es una de las fuentes lipídicas de mayor consumo a nivel mundial. Es uno de los constituyentes más importantes de la leche, debido a su importancia nutritiva y a las características físicas y organolépticas que proporciona a los productos lácteos. Físicamente aparecen en forma de glóbulos, constituidos por un núcleo hidrofóbico compuesto por ácidos grasos, que se encuentran mayormente esterificados formando triglicéridos (Ballesta 2014).

La grasa en los quesos es de origen animal, y por consiguiente es saturada, influye en su textura, ejerce acción sobre los componentes olor y color, además interviene en el equilibrio entre las formas disociadas y no disociadas de los ácidos grasos. Un queso fresco aporta al menos 15% de grasa (Licata 2009, Rodríguez 2009).

#### 2.2.8. Cenizas

Las cenizas son el residuo inorgánico que se obtiene de un alimento después de la combustión de la materia orgánica. Contienen diferentes elementos

químicos, ellos son Ca, P, K, etc. Los cuales son de interés nutricional para quienes consumen los alimentos y para la vida de los microorganismos.

La leche contiene sales de tipo mineral (fosfatos, cloruros, bicarbonatos) que pueden encontrarse en el queso aun después de la transformación y a pesar de estar presentes en un bajo porcentaje 0.7%, tienen gran influencia sobre las características de los productos lácteos (Rodríguez 2009).

#### 2.2.9. Calcio

Es uno de los minerales más importantes para la dieta humana, 99% de la ingesta de calcio es directamente depositado en los huesos (US 1997). Su disponibilidad depende de la fuente de procedencia. Para poder cubrir los requerimientos nutrimentales de este mineral, se recomienda incluir en la dieta alimentos con altos contenidos tal como lo son la leche y productos lácteos. Uno de los principales nutrientes del queso es el calcio (UNED 2022).

Para que las bacterias crezcan, necesitan nutrientes dentro de los cuales también se encuentra el calcio. El cual en forma de ion ( $\text{Ca}^{++}$ ) actúa como cofactor de ciertas enzimas, como las proteinasas (Raisman & González 2000, Caycedo *et al.* 2021).

#### 2.2.10. Sal

El cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ) posee diversos usos y múltiples efectos sobre el sabor, composición del queso, microbiota y actividad enzimática. El principal resultado de la sal es proporcionar sabor y controlar la maduración puesto que actúa como un agente de conservación selectivo. Además, la adición de sal se utiliza para eliminar el agua excedente. Cuando el  $\text{NaCl}$  está en concentraciones bajas, puede inhibir el desarrollo de algunas bacterias indeseables, puesto que, al causarles deshidratación, les produce la muerte o previene su crecimiento y proliferación. Regula el crecimiento de organismos deseables, dentro de los que se incluyen a las bacterias ácido-lácticas e impide la aparición de defectos en el aroma (Ramírez-López & Vélez-Ruiz 2012).

Los niveles de sal en los quesos frescos van, aproximadamente desde 1.0% hasta 3.0%. El volumen por utilizar está determinado por el tipo de queso que se desea preparar. Los valores por debajo del rango óptimo de sal causan quesos defectuosos, como consecuencia del crecimiento de bacterias no deseables o por actividad enzimática no regulada, también se ha observado disminución en la firmeza, y pueden presentarse fermentaciones que alteren la calidad del queso; mientras que emplear cantidades por encima del rango, tiene efecto sobre los sabores, mismos que se tornan desagradables para el consumidor (Van-Hekken & Farkye 2003). La sal se suele añadir al concluir el proceso de producción del queso. Existen tres métodos de salado que comúnmente se utilizan:

- Inmersión en salmuera: Los cubos de cuajada son salados sumergiéndose en salmuera.
- Salado en seco: La sal se añade directamente a la masa de leche cuajada formada antes de moldearse o previo al proceso de prensado, este método es el más empleado en el proceso de elaboración de los quesos frescos artesanales.
- Salado superficial en seco: Consiste en adicionar sal de manera directa sobre la superficie del queso posterior a la fase de moldeo (Ramírez-Navas *et al.* 2017).

#### 2.2.11. Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica se refiere a la facultad con la que cuenta todo material de conducir a la electricidad. Es una capacidad física de los elementos que está determinada por la estructura de una sustancia o material; así como por sus componentes moleculares o atómicos. El nivel de conductividad de un compuesto está influenciado por los microorganismos que pueda contener en su interior, tales como las bacterias, mismas que al respirar producen electricidad. Este suceso es consecuencia de las oxidaciones y reducciones que efectúan durante el proceso de respiración. El mecanismo consiste en que las células bacterianas durante el transporte de electrones oxidan un donador de electrones orgánico o inorgánico y disgregan a los electrones de los protones (Gacto 2014).

### 2.3. Quesos análogos

También denominados quesos imitación, son matrices alimenticias complejas, elaboradas por calentamiento a partir de la mezcla de materias primas, que se convierten en una masa homogénea, la cual, al aplicarle energía mecánica, resulta en un producto similar al queso. Estos no se formulan con leche fluida, más bien son creados a partir de compuestos lácteos. Para su fabricación se mezclan diversos ingredientes tales como:

- Proteínas lácteas: Que pueden ser caseína, caseinatos de sodio o potasio.
- Grasa: Butírica o de origen vegetal.
- Agua.
- Aditivos indispensables: Sales emulsificantes, gomas y/o almidones empleados como estabilizadores, ácidos orgánicos que fungen como sustancias acidificantes, saborizantes y colorantes (Chaparro *et al.* 2015).

La mezcla se formula de tal manera que se logra replicar la composición del queso a imitar (en cuanto a porcentaje de proteína, grasa y humedad); así mismo, se buscan características sensoriales y funcionales similares a las originales (Villegas 2004). La tecnología de los quesos análogos es derivada de los quesos procesados, el cual resultó a partir de haber descubierto cómo utilizar el citrato de sodio para mantener estable el paracaseinato de calcio en calentamiento bajo (Gutiérrez-Oropeza 2009).

Los carbohidratos forman parte de la composición de los quesos análogos. Son compuestos orgánicos obtenidos principalmente del reino vegetal. Su funcionalidad y características dependen de su estructura química, tienen influencia en el sabor, viscosidad, estructura y color de los alimentos. El almidón exclusivo de los quesos análogos es un carbohidrato complejo, que constituye la reserva energética exclusiva del reino vegetal. Determinar su presencia en un queso revela si es o no análogo. Se utiliza en la elaboración de quesos para sustituir las características impartidas por los caseinatos, permite estabilizar la red y crear una cortina tridimensional, lo que hace posible obtener una amplia variedad de propiedades texturales (Islas 2010).

Las proteínas de la leche se emplean junto con los almidones para darle las características funcionales a los quesos análogos, son ingredientes importantes para la formación de la red en la estructura del queso; junto con la grasa, confieren propiedades funcionales específicas. (Gutiérrez-Oropeza 2009).

#### 2.4. Tipos de quesos genuinos comercializados en la costa del estado de Oaxaca

Villegas (2004) clasifica como quesos genuinos a aquellos que son elaborados a partir de leche pasteurizada o leche cruda, que a su vez pueden ser frescos o madurados, dentro de la categoría de quesos genuinos se encuentra una amplia variedad de productos que incluyen el queso de aro y el queso de hoja, ambos quesos frescos.

##### 2.4.1. Queso de aro

Este queso genuino es fresco; de pasta con textura tajable, autoprensada, también se le denomina queso molido. De manera comercial se puede encontrar como piezas cilíndricas-planas con diferentes pesos, que oscilan desde los 250 g hasta un kg. Sus dimensiones varían entre 3 cm - 5 cm de altura, por 10 cm - 14 cm de diámetro. Se elabora con leche cruda; obtenida a partir de vacas de diferentes razas, recolectada en lecherías que suelen ser clasificadas como de tipo familiar. Su zona de origen está ubicada en el estado de Oaxaca. La presentación es su característica más notoria, ya que está envasado en un aro de petate, PVC o madera que conserva hasta el momento de su venta: esto aunado a un proceso laborioso, le confiere un sabor particular (Villegas *et al.* 2016).

El queso se elabora durante todo el año, en las viviendas de los productores o en espacios continuos adaptados a ellas, la mayoría de éstos requieren mejoras para alcanzar condiciones sanitarias adecuadas. El proceso de producción se inicia en la mañana, con el arreo de las vacas hasta el lugar donde son ordeñadas casi siempre de forma manual, aunque en ocasiones se cuenta con ordeña mecánica rudimentaria. Posteriormente, se transporta la leche, dicho suceso puede ser a través de alguno de los siguientes métodos: en el lomo de un animal

(caballo o burro), o en vehículos hasta la vivienda o lugar de elaboración. Para llevar a cabo el proceso de transformación de leche a queso, la mayoría de los queseros utilizan como coagulante el cuajo natural, quienes lo preparan mediante un método no estandarizado. La técnica más común implica utilizar el abomaso de vaca, el cual se sala y posteriormente se seca expuesto al sol; en ocasiones se agrega jugo de limón, posteriormente se sumerge en suero de queso, de donde se obtiene la mezcla líquida que se empleará para la producción de quesos. Una vez concluida la elaboración, se colocan en contenedores para ser llevados al lugar de comercialización; su forma es cilíndrica, el aro que sirvió como molde, se retira al momento de la venta (Villegas *et al.* 2014).

El queso de aro es elaborado por pequeños productores quienes pueden incluso encargarse de la producción de leche, elaboración del queso y su comercialización. Cuando no es así, para la comercialización se pueden identificar agentes mayoristas y minoristas. El transporte puede ser directamente por el propio quesero o por un quesero medio mayorista. A la hora del comercio minorista suelen estar involucrados los propietarios de cremerías y tiendas locales, ubicadas en mercados municipales o en colonias y municipios vecinos a los lugares de producción; quienes venden directamente al consumidor y cuentan con una amplia variedad de quesos, entre ellos ofrecen el queso de aro fresco (Cervantes *et al.* 2013).

#### 2.4.2. Queso de hoja

En la Costa Chica de Oaxaca de manera complementaria a la ganadería bovina dedicada a la producción de carne, en explotaciones extensivas, se realiza la ordeña estacional y la elaboración de queso fresco artesanal que presenta como característica particular su cubierta; hoja de la planta comúnmente denominada “huichicata” (*Xanthosoma spp.*) misma que tradicionalmente era usada para la conservación de diferentes productos, dada su impermeabilidad y periodo amplio de tiempo, antes de llegar al estado de putrefacción (Villegas *et al.* 2014).

El uso de la hoja de *Xanthosoma spp.*, es una característica otorgada por comunidades étnicas de la región, quienes la han usado tradicionalmente para envolver productos alimenticios y protegerlos de la humedad, conservándolos así por más tiempo; existen algunas similitudes entre este y otros quesos frescos que se elaboran en nuestro país, como el de hoja de Veracruz.

Antes de recibir la leche que se empleará en la elaboración de los quesos se recolectan las hojas de huichicata. Esta planta abunda en la costa, especialmente en los distritos de Jamiltepec y Juquila. Una vez concluido el proceso de manufactura cada pieza es envuelta en esta hoja para posteriormente transportarse.

La comercialización suele ser local, aunque existen casos de comercio internacional, se puede encontrar en los principales mercados de la región tales como: Pinotepa Nacional, Jamiltepec, Río Grande, Puerto Escondido, San Pedro Pochutla, Huatulco y Acapulco en el vecino estado de Guerrero. Los puntos de comercialización principalmente se sitúan en mercados municipales, tiendas de abarrotes, tianguis e incluso en los mismos lugares de producción (Villegas *et al.* 2014).

#### 2.4.2.1. *Xanthosoma robustum*

En el Diccionario enciclopédico de gastronomía mexicana Muñoz (2000) define a *Xanthosoma robustum* como una planta ribereña, con hojas en forma de óvalo (Figura 2) que pueden medir hasta 1.5 m, presenta inflorescencia columnar, misma que está protegida por una espata.



Figura 2. Planta de *Xanthosoma robustum*.

Esta planta puede emplearse de diferentes maneras, según la región y cultura. En el estado de Chiapas se utiliza para preparar atoles, también se consume en forma de quelites o simplemente se ingiere cocida, práctica semejante al consumo de verduras. En Puebla sus hojas sirven como materia prima para preparar *pax nikak*. Con respecto al estado de Oaxaca, la hoja se utiliza para envolver quesos frescos artesanales, además de comúnmente usarse como recipiente para beber agua y sus hojas tiernas sin venas son utilizadas para preparar quelites (Arrazola-Guendulay *et al.* 2018).

En adición a los usos antes mencionados, a esta planta se le atribuyen propiedades medicinales, sus hojas y tubérculos son utilizadas a manera de tópico para tratar inflamación muscular, enfermedades en la piel, espasmos y es empleada como cicatrizante (Leonti *et al.* 2001). Se usa como Hormiguicida; sus hojas son utilizadas como veneno para hormigas arrieras (Arrazola-Guendulay *et al.* 2018).

Kato *et al.* (1996) mencionan que cuatro hidropoxiesteroles aislados de las partes aéreas de dicha planta, y analizadas mediante estudios químicos y espectroscópicos, mostraron actividades antibacterianas contra los siguientes microorganismos: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus*.

## 2.5. Contaminación de los productos lácteos

La producción de alimentos libres de contaminantes depende de tres factores fundamentales, el lugar, el proceso y el personal responsable de la elaboración (Schinitman 2005). La industria relacionada con el sector lácteo es muy variada en dichos aspectos. Por lo tanto, la contaminación puede originarse en cualquier paso de la cadena productiva. Especialmente en aquellos productos de origen artesanal (Tenhagen *et al.* 2018).

La contaminación de un alimento puede ser originada por contaminantes bióticos y abióticos, en el caso de los bióticos se incluyen a los microorganismos (bacterias, virus, hongos, levaduras y parásitos), los cuales tienen alta relevancia en la alteración de los alimentos (Alves *et al.* 2018, Castro *et al.* 2018). En el caso de los contaminantes abióticos, se hace referencia a los agentes contaminantes físicos (tierra, pelos, heces fecales, partículas de alimento o materiales empleados, etc.) y químicos (medicamentos, pesticidas, detergentes, entre otros) que se incorporan a los alimentos de manera accidental.

### 2.5.1. Fuentes de contaminación

- Indirecta

El arrastre ocasionado por el viento de excretas y residuos, o bien, la presencia de roedores, insectos y animales domésticos. Producto de suciedad o contaminación en utensilios o equipos en industrias, comercio o expendios de comidas. El uso de agua residual no tratada para riego, inclusive aquella que es de baja calidad potable. El contacto con alimentos contaminados, malas condiciones de transporte, almacenaje o malas prácticas de manipulación (Schinitman 2005, Ortiz *et al.* 2008, Kümmel *et al.* 2016).

- Directa

La contaminación de manera directa incluye a los alimentos procedentes de animales enfermos (mastitis) o portadores sanos. El ingreso de microorganismos procedentes de otros organismos sanos o enfermos. La entrada de microgotas respiratorias provenientes de los manipuladores y la incorporación de

microorganismos del tracto digestivo de animales sacrificados o de tierras de cultivo (Schinitman 2005, Márquez *et al.* 2017).

## 2.6. Precursor de la aparición de *S. aureus*, en quesos frescos artesanales

### 2.6.1. Mastitis

La mastitis es un padecimiento originado por microorganismos que invaden la glándula mamaria, generando inflamación moderada a grave; que se caracteriza por provocar modificaciones en el tejido glandular y en el producto lácteo (Andresen 2001).

Los agentes causales de mastitis pueden ser:

- *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo y *Mycoplasmas* spp. Causantes de mastitis contagiosa. El tratamiento para la infección ocasionada por *Staphylococcus aureus* incluye la administración de antiinflamatorios y antibióticos.
- Coliformes, estreptococos ambientales y estafilococos coagulasa negativos. Patógenos que habitan comúnmente el entorno ambiental en el que viven los animales.
- *Arcanobacterium pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, levaduras, *Nocardia asteroides*, el alga incolora *Prototheca* spp, entre otros. Que son patógenos no comunes del medio ambiente (Andresen 2001).

*Staphylococcus aureus* juega un rol importante como agente causal de la mastitis bovina que es difícil de controlar (Valero-Leal *et al.* 2012, Xu *et al.* 2015). Los bovinos lecheros que cuentan con mastitis subclínica constituyen una de las principales fuentes de contaminación de la leche con cepas de *S. aureus* enterotoxigénicas, al eliminar el patógeno mediante la secreción láctea de animales infectados (Rahimi & Safai 2010).

Xu *et al.* (2015) estudiaron la diversidad de especies de estafilococos, su virulencia y los genes de resistencia a los antibióticos, en la leche obtenida de animales con mastitis subclínica de un hato de vacas lecheras en China; analizaron 209 muestras de leche, de las cuales 104 dieron positivo para

estafilococos (49.8%). Estas clasificaron como estafilococos coagulasa positivo (CPS) o estafilococos coagulasa negativo (CNS); 28 muestras de CPS eran cepas de *Staphylococcus aureus* (26.9%), y las 76 muestras restantes eran aislados de CNS representando 73.1%. En las 28 cepas de *S. aureus*, los genes de virulencia más prevalentes fueron *coa*, *Ig*, seguidos de *hla*, *hlb*, *fib*, *clfA*, *clfB* y *nuc*.

### 2.7. *Staphylococcus aureus*

El género *Staphylococcus* consta de bacterias Gram positivas en forma de cocos, con un diámetro de 0.5 µm a 1.5 µm, agrupados tienen la apariencia de racimos de uvas, aunque también se pueden encontrar como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas (Dufour *et al.* 2012, Ghasemi & Mahdavi 2018). *S. aureus* se diferencia del resto de especies que pertenecen al género *Staphylococcus* gracias a que es DNAsa, coagulasa, fermentadora de manitol y catalasa positivo (Castro *et al.* 2018, Cai *et al.* 2021). Es una bacteria mesófila aerobia facultativa capaz de crecer en amplios rangos de pH, aw, porcentajes de sal, entre otros como se muestra en la Tabla I.

Tabla I. Parámetros de crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

Parámetros	Crecimiento de <i>S. aureus</i>	
	Óptimo	Rango
Temperatura (C)	37	7 – 48
Ph	6 – 7	4 – 10
Aw	0.98	0.83 - 0,99
		0-90 - 0,99
NaCl (%)	0	0 – 20
Atmósfera	Aerobia	Anaerobia

aw= Actividad de agua.

(Alejo *et al.* 2011).

*Staphylococcus aureus* es un patógeno oportunista responsable de gran cantidad de infecciones tanto en humanos como en animales. Los seres humanos son un reservorio natural de este microorganismo y, aunque la colonización asintomática es más común que la infección, este microorganismo puede encontrarse, como agente causal de infecciones menores en la piel hasta contaminación en heridas quirúrgicas, neumonía y otro tipo de infecciones que pueden comprometer la vida del hospedador (Sánchez *et al.* 2013, Shankar *et al.* 2020).

Se adapta excelentemente a su entorno, y la diversidad de cepas son resultado de la interacción entre hospedadores (humanos-animales). El proceso de evolución de *Staphylococcus aureus* está determinado por la acumulación de su reservorio en animales destinados para compañía y alimentación.

La intoxicación ocasionada por *S. aureus* se origina por alimentos con contenido básicamente proteínico, como en el caso de los quesos con alto valor proteico, que se pueden contaminar, incluso después de haber sido procesados de manera inocua, durante su manipulación o almacenamiento inadecuado a temperatura ambiente, o por refrigeración no controlada, sucesos que originarían crecimiento exponencial de estafilococos (Acha & Szyfres 2005).

En el caso específico de la bacteria no es muy resistente al calor, pero sí lo es su enterotoxina, por lo tanto, la pasteurización de la leche no ofrece una garantía sí hubo producción de toxinas con anterioridad al tratamiento calórico; sin embargo, el problema de mayor significancia de *Staphylococcus aureus* es su resistencia al antibiótico meticilina ya que representa una grave amenaza para la salud pública (Rahmaniar *et al.* 2020).

## 2.8. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*.

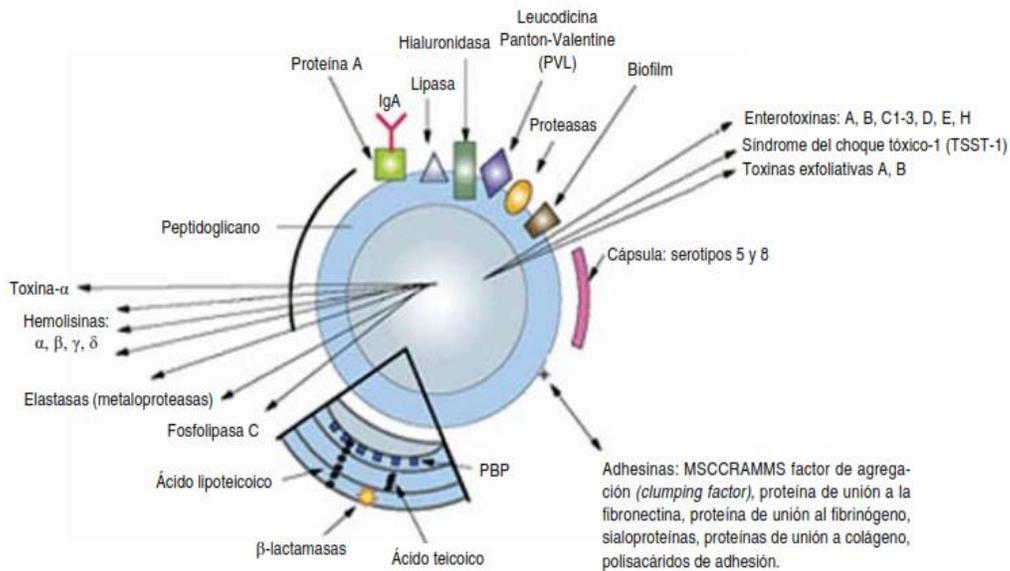


Figura 3. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* (Cervantes-García *et al.* 2014).

Tabla II. Clasificación de las toxinas detectadas en *Staphylococcus aureus* en función del cuadro clínico.

Cuadro Clínico	Factor de virulencia	Función	Genes
<b>Alteraciones cutáneas invasivas, pulmonía necrotizante y destrucción de tejidos y células</b>	Leucodinas (LPV, DE y M)	Alteración de la permeabilidad celular, destrucción leucocitaria	<i>lukS-PV</i> y <i>lukF-PV</i> , <i>luk-DE</i> y <i>luk-M</i>
	Hemolisinas	Ruptura de membranas celulares	<i>hla</i> , <i>hlb</i> , <i>hld</i> , <i>hlg</i> , <i>hlgv</i>
<b>Síndrome del shock tóxico, síndrome de la piel escaldada estafilocócica, intoxicación alimentaria y sepsis</b>	Toxina TSST	SST	<i>tsst-1</i>
	Toxinas exfoliativas	Epidermólisis	<i>eta</i> , <i>etb</i> , <i>etd</i> , <i>etD2</i>
	Enterotoxinas	Toxifeción alimentaria	<i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> , <i>see</i> , <i>seg</i> , <i>she</i> , <i>sei</i> , <i>sej</i> , <i>sek</i> , <i>sel</i> , <i>sem</i> , <i>sen</i> , <i>seo</i> , <i>sep</i> , <i>seq</i> , <i>ser</i> , <i>seu</i>

(Pascual 2015).

La patogenicidad de un microorganismo se define por su capacidad para producir toxinas, ingresar al tejido, colonizar, secuestrar nutrientes e

inmunosuprimir al huésped. El mecanismo de patogenicidad de *S. aureus* depende fundamentalmente de los determinantes de virulencia (Figura 3) que contenga en su genoma y de su capacidad para expresarlos, tanto cuando actúa como colonizador o bien cuando lo hace como agente infeccioso (Tabla II).

Los principales factores de virulencia son:

#### 2.8.1. Citotoxina: Leucocidina de Pantón-Valentine (LPV)

Se trata de una toxina sinergohimenotrófica formada por dos subunidades proteicas codificadas en dos genes, *lukS-PV* y *lukF-PV*. Es la toxina más importante que puede producir este microorganismo debido a su potencial patogénico basado en la capacidad de destrucción de la permeabilidad celular, leucocitaria, hemólisis y necrosis tisular. Es sintetizada por 2% - 3% de las cepas. Se encuentra en la mayoría de SARM asociados a la comunidad. Su acción se vincula con afecciones cutáneas y subcutáneas severas, neumonías necrotizantes letales, con septicemias o endocarditis (Zendejas-Manzo *et al.* 2014, Liu *et al.* 2016).

#### 2.8.2. Citotoxina: Leucocidina DE y M

Son otros determinantes de virulencia de la familia de las *citotoxinas*, pueden causar dermonecrosis en conejos y destrucción de leucocitos polimorfonucleares en rumiantes. La leucocidina M es una toxina clave para el desarrollo de mastitis en ganado ovino y bovino (Gnanamani *et al.* 2017).

#### 2.8.3. Citotoxinas hemolíticas

Se encuentran en la mayoría de aislados de *S. aureus*, se localizan en la región estable del núcleo cromosómico estafilocócico. Algunas de las hemolisinas identificadas hasta el momento son:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\chi$ ,  $\delta$  y  $\delta$  variante. La  $\alpha$  tiene una alta actividad dermonecrótica y neurotóxica, es letal para una gran variedad de células eucariotas presentes en diferentes animales (Camussone & Calvino 2013).

#### 2.8.4. Toxinas exfoliativas

Existen tres serotipos de toxinas exfoliativas que se han asociado directamente con patologías humanas: *eta*, *etb* y *etd*. Son toxinas responsables de producir el síndrome de la piel escaldada estafilócica. Las toxinas exfoliativas son proteasas encargadas de provocar una desestabilización a nivel de desmosomas del estrato granuloso de la epidermis, que son los que mantienen unidas a las células epiteliales (Borraz 2006, Zendejas-Manzo *et al.* 2014).

#### 2.8.5. Toxinas Pirogénicas Superantígeno (PTSAg)

Entre este tipo de toxinas exocelulares se encuentra el agente causal del síndrome del Shock Tóxico (*tsst-1*) o toxina TSST, que actúa como un superantígeno, induciendo la liberación de citocinas por macrófagos y linfocitos (Grumann *et al.* 2014, Castro *et al.* 2018). También existen otras 18 enterotoxinas estafilocócicas, mismas que cuentan con la capacidad de estimular gran número de células T en el hospedador, producen aumento en el nivel de expresión de citoquinas celulares que resultan muy tóxicas (Borraz 2006).

#### 2.8.6. Enzimas extracelulares

Provocan la destrucción de tejidos y, por lo tanto, ayudan en la penetración de bacterias en los tejidos: Proteasas, coagulasas, lipasas, catalasa, nucleasas, hialuronidasas, DNasa termoestable o termonucleasa, fosfolipasa C, metaloproteasas (elastasa) y estafiloquinasa (Gnanamani *et al.* 2017).

### 2.9. Enterotoxina A y su relación con las intoxicaciones alimentarias estafilocócicas

Se conocen múltiples tipos de enterotoxinas (A, B, C, D, E, etc.), de las cuales A es la más prevalente en los brotes (Hennekinne *et al.* 2012). Esta enterotoxina es preformada en los alimentos por coagulasa positiva principalmente. Constituye la principal causa de las intoxicaciones alimentarias estafilocócicas (IAS), emergentes a lo largo del mundo (Zendejas-Manzo *et al.* 2014). La mayoría de los casos que surgen de manera esporádica quedan sin registrar, son aquellos

estallidos que afectan a varias o muchas personas los que se conocen y documentan.

Existe una gran variedad de alimentos y platos culinarios que pueden ser vehículo de esta toxina. Si las condiciones ambientales son favorables, *S. aureus* se multiplica en el alimento y produce enterotoxinas (Acha & Szyfres 2005). Una vez elaborada la toxina esta no se destruye, aun y cuando el alimento sea sometido a altas temperaturas o procesos de cocimiento. Por tanto, puede suceder que no existan estafilococos en el alimento, pero que sí se encuentre presente su toxina, ya que estas son termorresistentes (Rahmaniar *et al.* 2020).

Tabla III. Parámetros de producción de enterotoxina de *Staphylococcus aureus*.

Parámetros	Producción de enterotoxinas	
	Óptimo	Rango
Temperatura (°C)	40 – 45	10 – 48
pH	7 – 8	4.0 - 9.6
aw	0.98	0.85 - 0.99 0.90 - 0.99
NaCl (%)	0	0 – 10
Atmósfera	Aerobia (5% - 20% oxígeno disuelto)	Aerobia – Anaerobia

aw= Actividad de agua

(Alejo *et al.* 2011).

Para minimizar el efecto de las enfermedades que puede ocasionar *S. aureus* y sus consecuencias, el primer paso es conocer las condiciones favorables para el desarrollo del microorganismo, con el fin de evitar o controlar, en la medida de lo posible, su proliferación. Por ende, en la Tabla III se describen los parámetros que afectan la producción de toxinas de *S. aureus*.

#### 2.10. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM)

Desde los inicios de la era antimicrobiana se han seleccionado de manera gradual cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos de importancia

para el uso clínico. Ha sido uno de los principales patógenos infecciosos recientes y, por lo tanto, plantea un desafío para el control de infecciones hospitalarias (Liu *et al.* 2016).

Lo que marcó el comienzo para la caracterización de SARM a nivel mundial fue su primer aislamiento el cual ocurrió en Inglaterra en el año 1960, la meticilina; fue la primera penicilina resistente a la penicilinasa (Aguayo-Reyes *et al.* 2018). Actualmente la resistencia a la meticilina en dicho microorganismo suele encontrarse con frecuencia por lo que constituye un problema de gran relevancia para la salud pública. Ya que a SARM se le atribuye como responsable de una gran carga de morbilidad y mortalidad en todo el mundo (Sánchez *et al.* 2013).

#### 2.10.1. Gen *mecA*

SARM posee el gen *mecA*, responsable de la resistencia a meticilina (Castellano *et al.* 2014). Se tiene la hipótesis de que este gen pudo haber habitado primeramente en las diferentes categorías de *Staphylococcus* coagulasa negativa; tales como *S. sciuri* o *S. fleuretti*, para finalmente transmitirse a *S. aureus* (Aguayo-Reyes *et al.* 2018).

Este gen no es endógeno y se encuentra integrado al cromosoma bacteriano, puede detectarse mediante diferentes técnicas entre ellas la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). El producto de expresión de este gen es una proteína de unión a la penicilina de 78 kDa, llamada PBP2' o PBP2a7 (Sánchez *et al.* 2013). Dicha proteína presenta baja afinidad para unirse a aquellos betalactámicos con actividad frente a los estafilococos, en condiciones normales (Zendejas-Manzo *et al.* 2014). Estos betalactámicos se unen a las proteínas de unión a la penicilina nativa, que se encuentran en la pared estafilocócica, inhibiendo así la biosíntesis contra peptidoglicano. A su vez, el gen *mecA* está introducido en un cassette cromosómico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) el cual es un componente genético móvil (Castellano *et al.* 2014).

### 2.10.2. Elementos SCCmec

El primer elemento SCCmec se identificó en 1999, seguido de dos elementos SCCmec adicionales (Ito *et al.* 1999). SCCmec es un elemento genético móvil que lleva el gen *mec* (*mecA*, *mecB* y *mecC*) junto con los genes que controlan su expresión, *mecR1* (que codifica la proteína transductora de señal, MecR1) y *mecI* (que codifica la proteína represora, MecI) y actúa como un portador para intercambiar información genética entre cepas de *Staphylococcus*. SCCmec, se inserta en el sitio de integración *attB*, ubicado en el cromosoma de *S. aureus*. (Figura 4) (Liu *et al.* 2016).

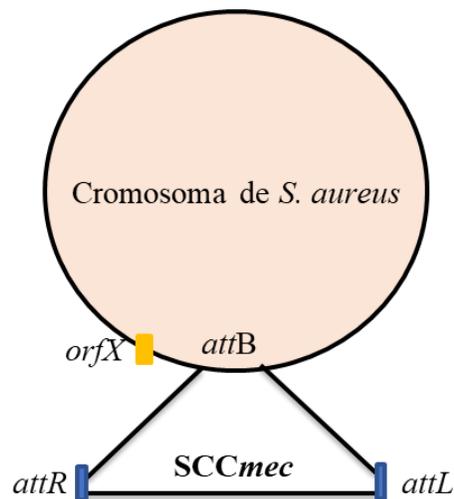


Figura 4. El sitio *attB* en el que se integra SCCmec. Adaptado de Catellano & Perozo-Mena (2010).

Hay tres elementos genéticos básicos en SCCmec (Figura 5): el complejo del gen *mec* (compuesto por el gen *mec*, las secuencias de inserción y el marco de lectura abierta (ORF) circundante), el complejo del gen *ccr* (compuesto por *ccrAB/ccrC* y los ORF circundantes), y la región de unión (región J) (Ma *et al.* 2002, Liu *et al.* 2016).

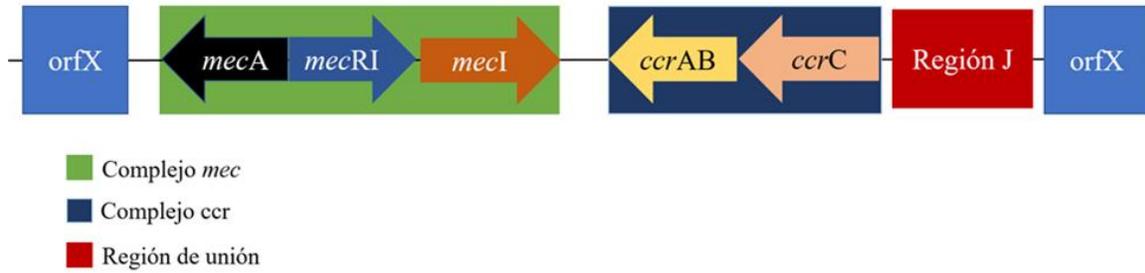


Figura 5. Esquema básico de la estructura de SCC*mec*. SCC*mec* está compuesta por dos complejos de genes esenciales uno es *mec* que codifica para resistencia a metacilina (*mecA*) y sus reguladores (represor de *mecA*, *mecRI* y transductor de señales, *mecI*) y el otro complejo es *ccr* que codifica para recombinasas responsables de la movilización (integración y escisión precisa del cromosoma) de SCC*mec* y el sitio J. Con información de Novales (2011).

Las distintas estructuras genéticas del complejo de genes *mec* y del complejo de genes *ccr* determinan los tipos y subtipos de SCC*mec* y, por otro lado, en las regiones J puede estar integrada información de resistencia a otros antibióticos y metales pesados. Las diferencias en estas regiones determinan los subtipos dentro de un mismo cassette cromosomal (Liu *et al.* 2016), mismos que se describen en la Tabla IV.

Gran parte de las cepas aisladas que provienen de los hospitales pertenecen a los tipos de SCC*mec* I, II y III, mientras que los aislamientos del tipo IV son de personas no asociadas al ambiente hospitalario, estos han demostrado una mayor agresividad lo que se traduce en un agravamiento de las infecciones ocasionadas por SARM (Cavalcante *et al.* 2013). Aun y cuando se creía que ciertos tipos de SCC*mec* solo podrían identificarse en aislamientos provenientes de hospitales o bien de la comunidad. Estas cepas han aislado en ambos lugares lo que ocasiona que la diseminación sea eficiente y se convierta en un problema de salud pública (Shankar *et al.* 2020).

Tabla IV. Estructura genética de los diferentes tipos de *cassettes* cromosomales descritos en *Staphylococcus aureus*

SCC <i>mec</i>	Complejo de genes <i>mec</i>	Estructura del complejo de genes	Complejo de genes <i>ccr</i>	Genes <i>ccr</i>
I	Clase B	IS1272- $\Delta$ <i>mecR1-mecA</i> -IS431	Tipo 1	<i>ccrA1, ccrB1</i>
II	Clase A	<i>mecI-mecR1-mecA</i> -IS431	Tipo 2	<i>ccrA2, ccrB2</i>
III	Clase A	<i>mecI-mecR1-mecA</i> -IS431	Tipo 3	<i>ccrA3, ccrB3</i>
IV	Clase B	IS1272- $\Delta$ <i>mecR1-mecA</i> -IS431	Tipo 2	<i>ccrA2, ccrB2</i>
V	Clase C2	IS431- <i>mecA</i> - $\Delta$ <i>mecR1</i> -IS431	Tipo 5	<i>ccrC1</i>
VI	Clase B	IS1272- $\Delta$ <i>mecR1-mecA</i> -IS431	Tipo 4	<i>ccrA4, ccrB4</i>
VII	Clase C1	IS431- <i>mec A</i> - $\Delta$ <i>mecR1</i> -IS431	Tipo 5	<i>ccrC1</i>
VIII	Clase A	<i>mecI-mecR1-mecA</i> -IS431	Tipo 4	<i>ccrA4, ccrB4</i>
IX	Clase C2	IS431- <i>mec A</i> - $\Delta$ <i>mecR1</i> -IS431	Tipo 1	<i>ccrA1, ccrB1</i>
X	Clase C1	IS431- <i>mec A</i> - $\Delta$ <i>mecR1</i> -IS431	Tipo 7	<i>ccrA1, ccrB6</i>
XI	Clase E	<i>blaZ-mecC-mecR1-mecI</i>	Tipo 8	<i>ccrA1, ccrB3</i>

(Aguayo-Reyes 2018).

### 2.11. *Staphylococcus aureus* en la leche

México es uno de los tantos países donde el enfriamiento de la leche después del ordeño, en ocasiones, no es el adecuado; por lo que resulta posible que la leche y los productos lácteos sean una fuente importante en las intoxicaciones estafilocócicas. Además, la leche procedente de ubres de vacas con infección estafilocócica puede dar origen a la contaminación de numerosos productos lácteos. (Xu *et al.* 2015, Adame-Gómez *et al.* 2018).

En el mundo han acontecido múltiples contagios de estafilocócidiosis por ingesta de leche contaminada, tal es el caso del brote que afectó por lo menos a 500 escolares en California en el período de 1977 a 1981, el cual fue originado por leche chocolatada (Holmberg & Blake 1984). Este mismo grupo vulnerable de edad, fue afectado en los Estados Unidos, en otro estallido donde 850 alumnos se

enfermaron después de ingerir también leche chocolatada. La cantidad promedio de enterotoxina A en la leche fue de 144 ng (Evenson *et al.*1988).

#### 2.12. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) en quesos, México

En México es común el consumo de quesos frescos artesanales, según la PROFECO (2016) una gran proporción de consumidores de queso prefiere aquellos que son elaborados con leche cruda. Del mismo modo muchos productores de queso fresco emplean leche no pasteurizada, puesto que creen que la microbiota nativa de la leche cruda confiere aromas y sabores agradables al producto final (Adame–Gómez *et al.* 2018).

Los quesos artesanales no deben sobrepasar los límites máximos de contenido microbiano para leche y derivados lácteos establecidos por la NOM-243-SSA1-2010 (NOM 243, 2010) y que en el caso de *S. aureus* para quesos frescos y quesos de suero es de 1000 UFC/g.

*S. aureus* resistente a la meticilina se disemina por todo el mundo, adaptándose a diferentes condiciones ambientales y modula su patogenicidad, debido a la capacidad de adquirir genes extraños, incluidos genes de resistencia a múltiples antibióticos. Se han aislado SARM de alimentos de origen animal en diferentes países; sin embargo, sólo unos pocos estudios monitorean SARM en los alimentos, principalmente en los productos lácteos (González *et al.* 2017).

#### 2.13. Casos de *Staphylococcus aureus* reportados para quesos en México y Oaxaca

Toribio-Jiménez *et al.* (2016) recolectaron un total de 50 muestras de quesos frescos elaborados de forma tradicional de venta en el interior y fuera del mercado Baltazar R. Leyva Mancilla en la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, México. Las muestras se recopilaron durante los meses de agosto a octubre del año 2013 de las cuales en 72% se aisló *S. aureus*  $1 \times 10^3$  UFC/g a  $1 \times 10^5$  UFC/g y que resultaron positivas para biopelículas, de estos solo 8% fueron SARM. El resultado se

traduce en niveles mayores a los límites máximos permitidos por las Normas Oficiales Mexicanas.

González-Montiel & Franco-Fernández (2015) en el municipio de Teotitlán de Flores Magón, en el estado de Oaxaca en México, establecieron la composición de la microbiota del queso de aro que ahí se comercializa. Para ello analizaron 12 muestras de queso en los meses abril, mayo y junio, debido a que son los de mayor temperatura en la región, factor determinante en el desarrollo de los microorganismos. La cantidad de *Staphylococcus aureus* obtenidas por método tradicional fue de  $5.76 \pm 0.71 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ , y en placa Petrifilm fue de  $5.98 \pm 0.65 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ . Los resultados muestran que el queso de aro contiene microorganismos alterantes, patógenos y de importancia industrial.

### III. Planteamiento del problema

El consumo de los quesos frescos que se han elaborado artesanalmente representa una práctica frecuente, debido a que forman parte de la cultura gastronómica (Guzmán-Hernández *et al.* 2016). En México se producen alrededor de 39 tipos de quesos mexicanos genuinos, de ellos 80% son frescos y producidos a partir de leche cruda, que generalmente no es sometida a un proceso de pasteurización previo (Cervantes *et al.* 2013).

Durante el período 2010-2014, los productos lácteos representaron un grupo de alto riesgo para brotes de enfermedades que fueron transmitidas por los alimentos (ETA'S) (Saltos *et al.* 2018). Dentro del abanico de productos lácteos elaborados, el que cuenta con el mayor número de microorganismos patógenos al momento de su comercialización es el queso fresco (Sánchez-Valdés *et al.* 2016). Por lo tanto, es mayormente asociado con brotes de intoxicación alimentaria (Kümmel *et al.* 2016, Aragão *et al.* 2021). Dicho suceso tiene repercusiones negativas sobre el sector quesero artesanal.

En México las pequeñas empresas que se dedican a la elaboración de queso se suelen caracterizar por: deficientes prácticas de higiene, poca verificación de la calidad de la leche, proceso de elaboración no tecnificado y transporte inadecuado del producto, esto sugiere que muchos de los quesos que se obtienen a nivel artesanal pueden contener microorganismos de interés sanitario. En la costa del estado de Oaxaca, regularmente no se toman en cuenta las regulaciones y parámetros específicos que debe de cumplir un producto alimenticio, para que pueda comercializarse, como en el caso del queso artesanal (Ramos *et al.* 2020).

La mayoría de los quesos artesanales que se encuentran fuera de la ley sanitaria presentan microorganismos patógenos como lo es *Staphylococcus aureus*. Este microorganismo es considerado como el principal agente causal de la mastitis bovina, dentro de las unidades lecheras familiares, ubicadas en diferentes regiones de México (Manjarrez *et al.* 2012, Castañeda *et al.* 2013).

La mastitis ocasionada por *S. aureus*, representa la principal razón del uso de antibacterianos, otra causa puede ser incluir en la dieta de los animales algunos antibióticos. El uso de la leche con remanentes de estos agentes constituye el

principal problema de residuos en la producción de alimentos (López-Vázquez *et al.* 2015).

Los antibióticos relacionados con el proceso de elaboración de los productos lácteos propician que las bacterias generen multirresistencia a los microbicidas, el desconocimiento de la presencia de estas bacterias y su consumo representa uno de los mayores riesgos en la transmisión de agentes patógenos multirresistentes a antibióticos.

Aun y cuando cada año se aplican diferentes antimicrobianos para resolver el problema de la resistencia microbiana, las bacterias desarrollan nuevas defensas contra estos eficaces antibióticos, la capacidad de adaptación de estos microorganismos es sorprendente.

Los quesos frescos artesanales que pudieran contener cepas de SARM podrían servir como fuente de difusión y propagar el problema de la resistencia, resulta inquietante la posible transmisión de estas cepas al hombre. Dicho problema constituye un punto de preocupación para la salud pública.

Es por eso por lo que el presente proyecto busca realizar una caracterización genotípica mediante la determinación de los factores de virulencia y tipo de *cassette cromosómico* de *Staphylococcus aureus*; además, determinar las propiedades fisicoquímicas de los quesos para establecer cuáles de ellas sostienen una relación con la presencia del microorganismo asociado a los quesos frescos que son preparados de manera artesanal y expandidos en el mercado municipal “Lic. Benito Juárez”.

#### **IV. Hipótesis**

Algunos de los atributos fisicoquímicos presentes en los quesos frescos artesanales que son comercializados en el mercado municipal “Lic. Benito Juárez” en Puerto Escondido, Oaxaca; influyen sobre la presencia de *Staphylococcus aureus* y sus características genotípicas tales como toxinas, gen *mecA* y sus diferentes locus, lo que constituye un alto riesgo para la salud pública.

## V. Objetivos

### 5.1 Objetivo general

Determinar las propiedades fisicoquímicas de los quesos frescos artesanales comercializados en el mercado de la ciudad de Puerto Escondido perteneciente al municipio de San Pedro Mixtepec, Oaxaca y caracterizar la composición y diversidad genética de los factores de virulencia y los locus del gen *mecA* de *Staphylococcus aureus* encontrados en ellos, como primer paso para abordar la ecología bacteriana en los quesos

### 5.2 Objetivos específicos

- Caracterizar la composición fisicoquímica de los quesos frescos.
- Determinar el perfil genético de factores de virulencia de *S. aureus*.
- Establecer los tipos y subtipos del cassette cromosomal *SCCmec* de *Staphylococcus aureus* y establecer su relación con el perfil fisicoquímico de los quesos frescos artesanales.

## VI. Materiales y métodos

### 6.1 Área de estudio

Los quesos frescos artesanales utilizados se adquirieron en el mercado local “Lic. Benito Juárez” ubicado en la calle 8ª norte y 3ª poniente, en el centro de la ciudad de Puerto Escondido, municipio de San Pedro Mixtepec, en el estado de Oaxaca, México. Se encuentra entre las coordenadas geográficas 15° 51’ 43” de latitud norte y 97° 04’ 18” longitud oeste, con altitud de 60 m (INEGI 2020).

Antes de iniciar con la recolección y procesamiento de las muestras, se elaboró y aplicó un cuestionario a las queserías localizadas en el mercado municipal con el objetivo de conocer la situación preliminar de los quesos, algunas de sus características, proceso de comercialización, disponibilidad de los propietarios para ser parte del estudio y obtener detalles acerca del origen y proceso de elaboración de los quesos frescos artesanales.

El análisis microbiológico se realizó en el laboratorio de Genética, mientras que el fisicoquímico se ejecutó en el laboratorio de Tecnología de Productos Pecuarios, ambos pertenecientes a la Universidad del Mar Campus Puerto Escondido; el análisis bromatológico se analizó en el laboratorio de Nutrición Animal del Centro Universitario del Sur en Guadalajara. Todos los análisis realizados fueron por duplicado.

El clima de la ciudad de Puerto Escondido se encuentra entre A(c) w2 y Aw0, con dos estaciones bien marcadas (secas y lluvias), precipitación media anual entre 839.1 mm y 1587.1 mm, temperatura media anual oscila entre 24 C y 27.2 C, humedad relativa de 84% y vientos de 18 km/h (Serrano-Altamirano *et al.* 2005).

### 6.2 Toma de muestra

Se efectuó un muestreo no probabilístico por conveniencia el día 24 de agosto de 2021 se realizó la compra de cuatro quesos de aro y cuatro de hoja (queso fresco envuelto en *Xanthosoma robustum*), en cada una de las tres queserías (A, B y C); mismas que aceptaron ser parte de dicho muestreo y brindaron información de gran importancia a través de un cuestionario aplicado, el cual se encuentra en la sección de anexos. Se obtuvieron en total 24 quesos. Se registró

la temperatura ambiental y la humedad relativa del día de la compra, se colocaron etiquetas de identificación y las muestras se transportaron en una bolsa de primer uso proporcionadas al vendedor y en hielera, para su posterior análisis en los laboratorios de genética, productos pecuarios y nutrición animal.

### 6.3 Obtención de muestras compuestas

Con la finalidad de poder realizar los análisis fisicoquímicos y microbiológicos correspondientes, fue necesario obtener muestras compuestas con cantidades superiores a 700 g, para ello se realizó un muestreo aleatorio simple: técnica de cuarteo, en cada uno de los quesos adquiridos, y posteriormente se agruparon por tipo de queso y quesería de origen; denominadas con la literal de cada quesería (A, B y C) más la designada para el queso de aro (A) y el de hoja (H), de tal forma que se obtuvieron seis grupos nombrados: AA, AH, BA, BH, CA y CH. Al finalizar se empacaron al vacío 500 g de cada muestra, los cuales fueron identificados con sus respectivas claves y enviados al laboratorio de Nutrición Animal del Centro Universitario del Sur para que se realizaran por duplicado los análisis de humedad, proteína cruda, grasa cruda y cenizas; quienes, en vinculación con el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias de la ciudad de Guadalajara, determinaron dos veces los valores de cloruro de sodio, calcio y conductividad eléctrica. El material restante se colocó en bolsas de plástico y se guardó en un congelador para su posterior análisis.

### 6.4 Determinación de Lugol

Se tomaron 5 g de cada una de las muestras compuestas de queso y posteriormente se depositaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, que contenía 100 mL de agua destilada, a continuación, se colocó el matraz sobre la parrilla eléctrica de calentamiento y agitación; THERMO SCIENTIFIC®; modelo SP88850100. Al llegar al punto de ebullición, se procedió a dejarlo enfriar, para añadir unas gotas de Lugol (yodo y yoduro 1:2). Una coloración azul oscura; habría indicado la presencia de almidón, mientras que la tonalidad marrón anuncio

que los resultados fueron negativos, como lo señala la NMX-F-374-1983 (NMX 374, 1983).

#### 6.5 pH y temperatura

Para su determinación se utilizó un potenciómetro/termómetro con electrodo de inserción Hanna® modelo HI 99161, el cual es un instrumento que mide la diferencia de potencial entre dos electrodos: un electrodo de referencia (generalmente de plata/cloruro de plata) y un electrodo de vidrio que es sensible al ion hidrógeno. Antes de la medición se calibró el equipo con soluciones Buffer de pH 4 y 7 a una temperatura de 23 C, proporcionadas por el proveedor. Se colocaron en charolas de plástico 100 g de cada muestra homogénea, desmoronada y se moldearon de tal manera que contara con un grosor suficiente para la inmersión de la punta del potenciómetro; superficie casi plana. Finalmente se seleccionó un punto al azar y se introdujo el instrumento a un centímetro de profundidad, se procedió a leer el resultado, registrarlo, lavar con agua destilada y repetir el procedimiento.

#### 6.6 Color

Se evaluaron cada una de las muestras de quesos compuestas. El sistema de referencia empleado fue el CIE (1976), se determinaron valores  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  los cuales describen la coloración en un eje tridimensional y se calcularon los valores de IA, IB,  $C^*$  y  $h^\circ$ . Se utilizó un espectrofotómetro de esfera de la marca X-rite® modelo HI SP60, con un rango espectral de 400 nm a 700 nm y longitud de onda 10 nm. Antes de su uso fue necesario calibrarlo para ello se utilizó un punto de referencia blanco y uno negro.

Las mediciones se realizaron por duplicado en dos diferentes zonas del queso previamente aplanado; para obtener una distribución del aparato uniforme, siguiendo lo establecido por la NMX-F-092-1970 (NMX 092, 1970) de calidad para quesos procesados.

### 6.6.1 Luminosidad (L\*)

Contabiliza la claridad en una escala de 0 - 100, donde negro absoluto es 0 y blanco absoluto 100, el resultado se obtuvo de manera directa con el espectrofotómetro.

### 6.6.2 Coordenadas Rojo - Verde (a\*)

Indica el espectro de coloración rojo/verde donde +a indica el color rojo y -a el verde, el valor se mostró en el aparato de medición.

### 6.6.3 Coordenadas Amarillo - Azul (b\*)

Cuantifica el espectro amarillo/azul, +b indica coloración amarilla y -b color azul (Bonilla *et al.* 2011), el resultado se pudo apreciar en el espectrofotómetro.

### 6.6.4 Índice de Blancura (IB)

Para poder obtener el resultado de este parámetro fue necesario emplear la siguiente ecuación matemática.

$$IB = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}}$$

Dónde:

IB: Índice de blancura.

L\*: Luminosidad.

a\*: Intensidad de color rojo - verde.

b\*: Intensidad de color amarillo - azul.

### 6.6.5 Índice Amarillo - Azul (IA)

Este valor se obtiene de manera indirecta a través del siguiente cálculo.

$$IA = \frac{(142.86)(b^*)}{L^*}$$

Dónde:

IB: Índice de blancura.

L\*: Luminosidad.

b\*: Intensidad de color amarillo - azul.

#### 6.6.6 Saturación de color (C\*)

Se calculó por medio de la siguiente ecuación:

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{\frac{1}{2}}$$

Dónde:

C\*: Saturación del color.

a\*: Intensidad de color rojo - verde.

b\*: Intensidad de color amarillo - azul.

#### 6.6.7 Angulo de matiz o tonalidad (h°)

El valor se obtuvo mediante el uso de la siguiente formula:

$$h^{\circ} = (\arctan \frac{b^*}{a^*}) (\frac{180}{\pi})$$

Si el resultado es negativo se le debe sumar 360.

Dónde:

h°: Ángulo de tonalidad.

Arctan: Función trigonometría arcotangente,

a\*: Intensidad de color rojo - verde.

b\*: Intensidad de color amarillo - azul.

(CIE 1976, Boscarol 2007).

#### 6.7 Humedad, proteína cruda, grasa cruda y cenizas.

A cada una de las muestras compuestas se les aplicó el conjunto de técnicas descritas por la Association of Analytical Communities (A.O.A.C.) (2003).

#### 6.8 Materia seca

El contenido de materia seca se calculó por diferencia tomando como referencia el resultado de humedad previamente determinado, mediante la siguiente formula:

$$\% MS = (100 - \% H)$$

Donde:

MS = Materia seca

H = Humedad

### 6.9 Calcio, cloruro de sodio y conductividad eléctrica

Cada una de las muestras compuestas se enviaron al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias en Guadalajara, Jalisco, donde se determinaron las variables Ca, NaCl mediante digestión con ácido nítrico y cuantificación mediante espectrofotómetro de absorción atómica, mientras que Conductividad eléctrica (CE) fue medida a través de un Conductímetro.

### 6.10 Cepa control

La cepa de referencia utilizada es *Staphylococcus aureus* subsp. aureus (ATCC® 43300™) proporcionada por el M.C. Carlos Alberto Castañón Sánchez del Hospital Regional de Alta Especialidad de Oaxaca. Una de las características importantes de *S. aureus* es su capacidad para secretar toxinas que dañan las membranas de las células del hospedero (Castañón-Sánchez 2012) cuyas características fenotípicas y genotípicas de esta se describen en la Tabla V.

Tabla V. Características fenotípicas y genotípicas de la cepa control

Cepa	Característica de la cepa	Fenotipo (oxa)	Genotipo ( <i>lukS/F-PV, mecA, SCCmec</i> Tipo II)
ATCC® 43300™	PVL; MRSA	R	-, +

PVL: leucocidina de Panton Valentine.

SAMS: *S. aureus* meticilina sensible.

SAMR: *S. aureus* meticilina resistente.

S: sensible.

R: resistente.

Oxa: oxacilina.

(+): positivo.

(-): negativo.

### 6.11 Extracción de ADN genómico.

Las muestras de queso fueron desmoronadas con ayuda de guantes, se colocaron 2 g de muestra en un tubo Falcón de 50 mL limpio y estéril se agregaron

10 mL de TEN (Tris-HCl 100 mmol EDTA 50 mmol, NaCl 500 mmol a pH 8.0) y 5 perlas de vidrio para posteriormente ser agitadas en un vortex; DRAGONLAB MX-S®, modelo 821200040000, durante 5 min, posteriormente se añadieron 20 mL de buffer lisis (relación 1:2) se agitaron durante 5 min, se agregaron 120 µL de proteinasa k y 120 µL de lisozima se invirtieron los tubos lentamente, con el objetivo de mezclar las muestras, durante 10 min.

Posteriormente se transfirió 1 mL de las muestras a tubos eppendorf nuevos y estériles. Las cuales se incubaron a 67 C durante 30 min, en una parrilla de calentamiento y agitación de la marca THERMO SCIENTIFIC®; modelo SP88850100. Se agitaron los tubos cada 5 min para homogeneizar las muestras, al terminar se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 min.

Después con ayuda de una micropipeta se transfirió la fase acuosa a nuevos y estériles tubos eppendorf, de inmediato se realizó enfriamiento en hielo donde se añadieron 800 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico a una concentración de (25:24:1), se mezclaron lentamente invirtiendo los tubos y se procedió a centrifugar durante 10 min a 10,000 rpm. Con la ayuda de una micropipeta se transfirió la fase superior a un tubo eppendorf nuevo estéril, para posteriormente realizar enfriamiento en hielo.

Se agregaron 800 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se invirtieron los tubos para mezclar ambas fases, a continuación se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min y con la ayuda de una micropipeta se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf estéril, posteriormente se añadió una relación de 1:1.5 de isopropanol y se adicionó una relación de 10:1 volúmenes de acetato de amonio 10 M, después se repitió la inversión de los tubos de manera lenta con el propósito de mezclar los solventes, se incubaron a -20 C durante 2 horas.

Una vez concluido el proceso de incubación, se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min y se decantó. Posteriormente se realizó el lavado de la pastilla con 800 µl de etanol al 70 %, además de mezclar por inversión de manera cuidadosa. A continuación, se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min, se desechó el etanol por decantación y se dejaron reposar los tubos abiertos e invertidos, sobre papel absorbente a temperatura ambiente hasta que el alcohol se evaporó

completamente. Finalmente se rehidrató la pastilla con 30  $\mu\text{L}$  de tampón TE (Tris-HCl 100 mmol, EDTA 50 mmol a pH 8.0) y se almacenaron las muestras a  $-20\text{ C}$ .

Se verificó la extracción mediante electroforesis en gel de agarosa Promega, grado analítico al 0.8% (w/v) con buffer TAE 1X de la marca THERMO SCIENTIFIC®, como disolución de corrida. Se cargaron 5  $\mu\text{L}$  del producto amplificado y 5  $\mu\text{L}$  de buffer de carga a 60 volts por 37 min, utilizando para el proceso una máquina de electroforesis marca Bio-Rad®, modelo PowerPac™HC. Finalmente se tiñeron en bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 25 min, se observaron y fotografiaron en el transiluminador; UVP Benchtop® Variable Transilluminator.

## 6.12 Identificación de ADN bacteriano

Tabla VI. *Primers* para identificación de bacterias

Gen	<i>Primers</i>	Secuencia	Pb	Referencias
338F	Bacterias	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	200	Cocolin <i>et al.</i> (2001).
518R		ATTACCGCGGCTGCTGG		

Se utilizó un termociclador BioRad®, modelo T100™ Thermal Cycler; para amplificar la mezcla de reacción (50  $\mu\text{L}$ ), de cada muestra de quesos compuestas analizadas por duplicado, que contenía 1X de buffer (Promega®), 0.5 mmol de MgCl (BioTecMol®), 1  $\mu\text{L}$  TaQ polimerasa (Promega®), 0.4 mmol dNTP's (Sigma®) y primers 0.1  $\mu\text{M}$  (Tabla VI).

Para PCR multiplex, las muestras se sometieron a ciclos térmicos donde la temperatura de alineación era de 94 C durante 5 min, posteriormente 30 ciclos, donde se efectuó desnaturalización a la misma temperatura por 1 min. Además de hibridación a 65 C por 1 min y 55 C por 1 min. Donde por cada ciclo la temperatura disminuía 1 C. Aunado a ello se realizó una extensión a 72 C por 1 min, finalmente una elongación de 72 C por 10 min y enfriamiento a  $-4\text{ C}$ .

Los productos se comprobaron por electroforesis en gel de agarosa grado analítico al 2%, con buffer TAE 1X (40 mmol Tris-HCl, 1 mmol EDTA/l, 1.14  $\mu\text{L}/\text{L}$  de ácido acético glacial, pH 7.8), se cargaron 25  $\mu\text{L}$  del producto amplificado y 5

µL de buffer de carga mezclados con 10 µL de marcador (BIOLINE®), a 80 volts por 105 min, finalmente se tiñó el gel en bromuro de etidio durante 25 min y se observó en el transiluminador.

### 6.13 Identificación de *Staphylococcus aureus*.

Para la identificación de *Staphylococcus aureus* la determinación se realizó por PCR; para ello se usaron primers específicos descritos en la Tabla VII.

Tabla VII. *Primers* para identificación de *Staphylococcus aureus*

Gen	<i>Primers</i>	Secuencia	Pb	Referencias
23S rRNA	StaphyF	ACGGAGTTACAAAGGACGAC	1251	El-Sayed <i>et al.</i> (2006).
	StaphyR	AGCTCAGCCTTAACGAGTAC		
Gen factor de adhesión	clfAF	GGCTTCAGTGCTTGTAGG	900-1000	El-Sayed <i>et al.</i> (2006).
	clfAR	TTTTTCAGGGTCAATATAAGC		
Evasión inmunológica	CoaF	ATAGAGATGCTGGTACAGG	580-660	El-Sayed <i>et al.</i> (2006).
Termonucleas a invasión	nucF	AGTTCAGCAAATGCATCACA	400	Cremonesi <i>et al.</i> (2005).
	nucR	TAGCCAAGCCTTGACGAACT		

Para la amplificación se usó un termociclador BioRad®, la mezcla de reacción (50 µL) que contenía 1X de buffer (Promega®), 0.5 mmol de MgCl (BioTecMol®), 1.25 u/µL TaQ polimerasa (Promega®), 0.2 mmol dNTP's (Sigma), primers 0.1 µM.

Para el PCR multiplex para *Staphylococcus* las muestras se sometieron a ciclos térmicos donde la temperatura de alineación era de 94 C durante 5 min, seguido de 30 ciclos, manteniendo desnaturalización a la misma temperatura por 1 min. Posteriormente hibridación a 64 C por 2 min, 58 C por 2 min y 57 C por 2 min. Aunado a una extensión a 72 C por 90 seg y elongación final de 72 C por 10 min; finalmente enfriamiento a -4 C. Posteriormente se tomaron 5 µL de cada muestra resultante de la amplificación y se repitió el proceso con las mismas condiciones.

Los productos se comprobaron por electroforesis en gel de agarosa grado analítico 2%, con buffer TAE 1X (40 mmol Tris-HCl, 1 mmol EDTA/l, 1.14 µL/L de

ácido acético glacial, pH 7.8), se cargaron 25 µL del producto amplificado y 5 µL de buffer de carga a 80 volts por 2 horas, finalmente se tiñó en bromuro de etidio durante 25 min y se observó el gel en el transiluminador.

#### 6.14 Perfil de virulencia de aislamientos de *Staphylococcus aureus*

Para el perfil de virulencia de *Staphylococcus aureus* se usaron *primers* específicos descritos en la Tabla VIII.

Tabla VIII. *Primers* para el Perfil de virulencia

Gen	<i>Primers</i>	Secuencia	pb	Referencias
Enterotoxina A	seaF	GGTTATCAATGTGCGGGTGG	102	Mehrotra <i>et al.</i> (2000).
	seaR	CGGCACTTTTTCTCTTCGG		
Enterotoxina B	sebF	GTATGGTGGTGTAAGTGG	164	Mehrotra <i>et al.</i> (2000).
	sebR	CCAAATAGTGACGAGTTAGG		
Enterotoxina C	secF	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG	451	Mehrotra <i>et al.</i> (2000).
	secR	CACACTTTTAGAATCAACCG		
Enterotoxina D	sedF	CCAATAATAGGAGAAAATAAAAAG	278	Mehrotra <i>et al.</i> (2000).
	sedR	ATTGGTATTTTTTTTCGTTT		
Enterotoxina E	seeF	AGGTTTTTTCACAGGTCATCC	209	Mehrotra <i>et al.</i> (2000).
	ser	CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC		
Toxina etA	etaF	GCAGGTGTTGATTTAGCATT	93	Mehrotra <i>et al.</i> (2000).
	etaR	AGATGTCCCTATTTTTGCTG		
Toxina etB	etbF	ACAAGCAAAAAGAATACAGCG	226	Mehrotra <i>et al.</i> (2000).
	etbR	GTTTTTGGCTGCTTCTCTTG		
Toxina-1 del síndrome de choque tóxico	TSST-1	ATGGCTATATACATTCAATT	350	Mullarky <i>et al.</i> (2001).
	TSST-2	TTCCAATAACCACCCGTTT		

Para la amplificación se empleó un termociclador BioRad®, la mezcla de reacción (50 µL) que contiene 1X de buffer, 0.5 mmol de MgCl, 1.25 u/µL TaQ polimerasa (Promega®), 0.2 mmol dNTP's (Sigma®), primers 0.08 µM.

Las muestras fueron sometidas a ciclos térmicos donde la temperatura de alineación era de 94 C durante 5 min, seguido de 30 ciclos adicionales,

manteniendo desnaturalización a la misma temperatura por 2 min. Posteriormente se realizó hibridación a 55 C por 2 min. Además de una extensión a 72 C por 1 min y una elongación final de 72 C por 5 min. Conservación a -4 C.

Posteriormente se tomaron 5 µL de cada muestra resultante de la amplificación y se repitió el proceso con las mismas condiciones.

Los productos se comprobaron por electroforesis en gel de agarosa al 2 % con buffer TAE 1X (40 mmol Tris-HCl, 1 mmol EDTA/L, 1.14 µL/L de ácido acético glacial, pH 7.8), se cargaron 25 µL del producto amplificado y 5 µL de buffer de carga a 80 volts por 2 horas, se tiñó el gel en bromuro de etidio y finalmente se observaron las bandas resultantes en el transiluminador.

### 6.15 Tipo de cassette cromosómico estafilocócico en cepas de *Staphylococcus aureus*

Tabla IX. *Primers* para determinar el tipo de cassette cromosómico estafilocócico.

SCC <i>mec</i>	Tipo	<i>Primers</i>	Secuencia	Pb	Referencia
Resistencia a metilicina	Control	mecAF	GAAATGGAACGTCCGATAA	310	Rahmaniar <i>et al.</i> (2020).
		mecAR	CCAATCCACATTGTTTCCTAA		
locus A	I	CIF F2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG	495	Sánchez <i>et al.</i> (2013).
		CIF R2	ATTTACCACAAGGACTACCAGC		
locus B	II	KDP F1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC	284	Sánchez <i>et al.</i> (2013).
		KDP R1	CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG		
locus C	II, III	MECI P2	ATCAAGACTTGCATTTCAGGC	209	Sánchez <i>et al.</i> (2013).
		MECI P3	GCGGTTTCAATTCACTTGTC		
locus D	I, II, IV	DCS F2	CATCCTATGATAGCTTGGTC	342	Sánchez <i>et al.</i> (2013).
		DCS R1	CTAAATCATAGCCATGACCG		
locus E	III	RIF4 F3	GTGATTGTTTCGAGATATGTGG	243	Sánchez <i>et al.</i> (2013).
		RIF4 R9	CGCTTTATCTGTATCTATCGC		
locus F	III	RIF5 F10	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG	414	Sánchez <i>et al.</i> (2013).
		RIF5 R13	GTCACAGTAATCCATCAATGC		
locus G	IA	IS431 P4	CAGGTCTCTTCAGATCTACG	381	Borraz (2006).
		pUB110R1	GAGCCATAAACACCAATAGCC		
locus H	IIIA	IS431 P4	CAGGTCTCTTCAGATCTACG	303	Borraz (2006).
		pT181 R1	GAAGAATGGGGAAAGCTTCAC		

Para determinar el tipo de cassette cromosómico estafilocócico, se emplearon primers específicos descritos en la Tabla IX.

Para la amplificación se utilizó un termociclador BioRad, la mezcla de reacción (50 µL) compuesto por 1X de buffer, 0.5 mmol de MgCl<sub>2</sub>, 1.25 u/µL TaQ polimerasa (Promega), 0.2 mmol dNTP's (Sigma), primers 0.08 µM. Las condiciones para la ampliación fueron 12 min para la elongación a 94 C, 30 ciclos de amplificación, 45 min para desnaturalización a 94 C, 1 min para la hibridación a 55 C y 1 min a 72 C para el proceso de extensión se concluyó con una elongación final de 10 min a 72 C y conservación a -4 C.

#### 6.16 Análisis estadístico

Se caracterizó la composición de las diecisiete variables fisicoquímicas de los quesos frescos artesanales, mediante la estadística descriptiva considerando a la media aritmética y el error estándar.

Para establecer la relación entre las variables microbiológicas y el perfil fisicoquímico de los quesos frescos artesanales, primero se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) a partir de una matriz de covarianzas, con el fin de disminuir la cantidad de variables, ya que, superaban a la suma de las muestras evaluadas y además poder establecer cuáles eran las variables de mayor importancia a nivel de color y bromatológicas, el pH se consideró a priori como una variable de peso porque es determinante para la vida de las bacterias, mientras que la temperatura no fue incluida debido a que está altamente influenciada por el entorno inmediato de los quesos.

Las variables microbiológicas se eligieron de acuerdo con su importancia en la caracterización de *Staphylococcus aureus*, fueron cinco las seleccionadas mismas que informan sobre el perfil de virulencia y tipo de SCC*mec*.

Finalmente se realizó un Análisis de Correspondencias Múltiples (ACM), con el propósito de conocer la asociación entre las once variables, las de mayor peso en el ACP y las de mayor importancia.

Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa R versión 4.1.2. (R Core Team 2022).

## VII. Resultados y discusión

### 7.1 Origen de los quesos

Se realizó una encuesta (Anexo 1) en las queserías, donde se comercializan los quesos analizados que forman parte de esta investigación, para obtener información tal como, el lugar de elaboración (Tabla X), y con ello poder calcular la distancia aproximada que existe entre dichas ubicaciones y la ciudad de Puerto Escondido.

Tabla X. Distancia recorrida desde el origen de los quesos hasta Puerto Escondido, Oaxaca.

Muestra	Origen	Distancia a Puerto Escondido (km)
AA	Bajos de Chila, San pedro Mixtepec	9.1
BA	Cabecera municipal de Santiago Jamiltepec, Santiago Jamiltepec	109
CA	Río Grande, Villa de Tututepec de Melchor Ocampo	49
AH	Río Grande, Villa de Tututepec de Melchor Ocampo	49
BH	Cabecera municipal de Santiago Jamiltepec, Santiago Jamiltepec	109
CH	San José Manialtepec, Villa de Tututepec de Melchor Ocampo	26

Las muestras BA y BH provenientes de Santiago Jamiltepec son las que deben recorrer una mayor distancia para llegar a su destino de venta, en el mercado de Puerto Escondido. Es importante mencionar que el transporte de los quesos se efectúa mediante taras y sin ningún tipo de refrigeración.

### 7.2 Determinación de almidón

Debido a la gran comercialización de quesos imitación que existe en México fue indispensable realizar la evaluación del tipo de queso con el que se trabajó. La prueba de Lugol que se realizó para determinar la presencia de almidón se traduce en un indicativo de si el producto es análogo o de leche. Las manifestaciones producto de la evaluación se muestran en la Tabla XI. Con base en los resultados obtenidos se pueden categorizar a los quesos analizados, como elaborados a partir leche.

Tabla XI. Determinación de almidón de las muestras de quesos frescos artesanales

Muestra	Almidón
AA	Negativo
AH	Negativo
BA	Negativo
BH	Negativo
CA	Negativo
CH	Negativo

### 7.3 Variables fisicoquímicas

En la variable temperatura el promedio de las muestras fue de 25.18 C, a pesar de que se evaluó no se consideró como un valor que pueda aportar gran cantidad de información acerca de la calidad de los quesos, ya que sus resultados están en función del entorno, mismo que al momento del análisis era distinto que cuando se realizó la compra. Dentro de las características fisicoquímicas que a continuación se reportan se incluyen el pH y las múltiples variables que componen el color.

#### 7.3.1 pH

Tabla XII. pH (Media  $\pm$  Error Estándar) de las muestras de los quesos frescos artesanales.

Muestra	pH
AA	6.01 $\pm$ 0.01
AH	6.12 $\pm$ 0.02
BA	6.27 $\pm$ 0.02
BH	6.22 $\pm$ 0.00
CA	6.20 $\pm$ 0.00
CH	6.44 $\pm$ 0.02

Los resultados ( $\bar{x}\pm EE$ ) obtenidos para la variable pH se muestran en la Tabla XII. Los valores se encuentran entre 6.01 $\pm$ 0.01 y 6.44 $\pm$ 0.02, que pertenecen a las muestras AA y CH respectivamente, ambos ubicados fuera del rango de 5 a 6 señalado por la NMX-F-092-1970 (NMX 092, 1970); dichos datos coinciden con

los obtenidos por Van-Hekken & Farkye (2003) quienes analizaron y caracterizaron químicamente quesos frescos elaborados a partir de leche de vaca obteniendo pH 6.1.

Los valores de pH registrados deberían ser cercanos al de la leche (6.7- 6.8); sin embargo, la reproducción de microorganismos como bacterias ácido lácticas, dentro de este microambiente pudiera ser la causa del descenso en el pH (Soles & Oswaldo 2014) en adición al proceso de elaboración el cual no está estandarizado. Los quesos frescos analizados se encuentran dentro del rango necesario de pH para el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (4 - 10 pH) y la producción de sus toxinas (4 - 9.6) (Alejo *et al.* 2011).

### 7.3.2 Color

En la Tabla XIII se presentan los valores de las medias ( $\bar{x}\pm EE$ ) calculadas para las diferentes variables que conforman el color.

Los valores de luminosidad ( $L^*$ ) oscilaron entre  $90.53\pm 0.70$  que pertenece a la muestra BH y  $92.55\pm 0.24$  encontrado en CH. La luminosidad  $L^*$  mantiene una relación positiva con la humedad; a mayor luminosidad mayor contenido de humedad (Chacón-Villalobos & Pineda-Castro 2009). Los resultados obtenidos denotan que los quesos analizados tienen alto contenido acuoso, dicho suceso tiene relación negativa con el contenido de sólidos puesto que, a mayor luminosidad, menor contenido de sólidos grasos (Álvarez *et al.* 2007); factores importantes en la actividad microbiana. Sánchez-Estrada & Sánchez-Estrada (2020) analizaron quesos frescos artesanales y los resultados obtenidos fueron inferiores a los de esta investigación (88.32, 88.84 y 89.32), mencionan que los quesos frescos son más luminosos que los quesos no frescos debido a que retienen una mayor cantidad de suero.

Tabla XIII. Características que conforman el Color (Media  $\pm$  Error Estándar) de las muestras de quesos frescos artesanales.

Muestra	L*	a*	b*	IB	IA	C*	H
AA	91.93 $\pm$ 0.54	0.45 $\pm$ 0.06	20.74 $\pm$ 1.05	77.73 $\pm$ 0.78	32.21 $\pm$ 1.43	20.74 $\pm$ 1.05	88.78 $\pm$ 0.09
AH	91.09 $\pm$ 0.39	0.21 $\pm$ 0.03	19.84 $\pm$ 0.14	78.25 $\pm$ 0.03	31.12 $\pm$ 0.09	19.84 $\pm$ 0.14	89.39 $\pm$ 0.08
BA	90.73 $\pm$ 0.34	0.11 $\pm$ 0.03	20.76 $\pm$ 0.40	77.26 $\pm$ 0.51	32.69 $\pm$ 0.75	20.76 $\pm$ 0.40	89.71 $\pm$ 0.06
BH	90.53 $\pm$ 0.70	0.12 $\pm$ 0.01	20.87 $\pm$ 0.15	77.08 $\pm$ 0.42	32.93 $\pm$ 0.48	20.87 $\pm$ 0.15	89.68 $\pm$ 0.01
CA	90.58 $\pm$ 0.17	-0.96 $\pm$ 0.01	19.84 $\pm$ 0.32	78.02 $\pm$ 0.37	31.29 $\pm$ 0.57	19.86 $\pm$ 0.32	92.76 $\pm$ 0.03
CH	92.55 $\pm$ 0.24	0.12 $\pm$ 0.03	19.32 $\pm$ 0.19	79.30 $\pm$ 0.25	29.82 $\pm$ 0.12	19.32 $\pm$ 0.09	89.64 $\pm$ 0.02

L\*= Luminosidad.

a\*= Rojo-Verde.

b\*= Amarillo-Azul.

IB= Índice de Blancura.

IA= Índice Amarillo/Azul.

C\*= Saturación de color.

h= Ángulo de tonalidad.

AA= Quesería A – queso de Aro.

AH= Quesería A – queso de Hoja.

BA= Quesería B – queso de Aro.

BH= Quesería B – queso de Hoja.

CA= Quesería C – queso de Aro.

CH= Quesería C – queso de Hoja.

Las coordenadas Rojo - Verde ( $a^*$ ) indican la variación que puede existir entre ambos colores. Se obtuvo un valor negativo en la muestra CA, que corresponde al queso de aro adquirido en la quesería denominada C, cuyo dato fue  $-0.96 \pm 0.01$  que se traduce, en una ligera tendencia dirigida al color verde (Figura 6), Álvarez *et al.* (2007) aseguran que una coloración verdosa es consecuencia del color característico del suero. La máxima estimación fue de  $0.45 \pm 0.01$  calculada para AA, éste al igual que el resto de los valores positivos indican que los quesos se inclinan ligeramente hacia el color rojo, semejante a lo reportado por García-Islas (2006), quien llevo a cabo la determinación de  $a^*$  en los siguientes quesos: panela (0.0 - 2.2), Oaxaca (0.03 - 2.0), tenate (0.9 - 2.9), morral (0.9 - 4.6), manchego mexicano (1.7 - 5.1) y manchego botanero (0.96 - 2.89), lo cuales se fabricaron en Tulancingo Hidalgo. Sánchez-Estrada & Sánchez-Estrada (2020) determinaron valores superiores para  $a^*$  (2.26 y 2.35) en quesos frescos.

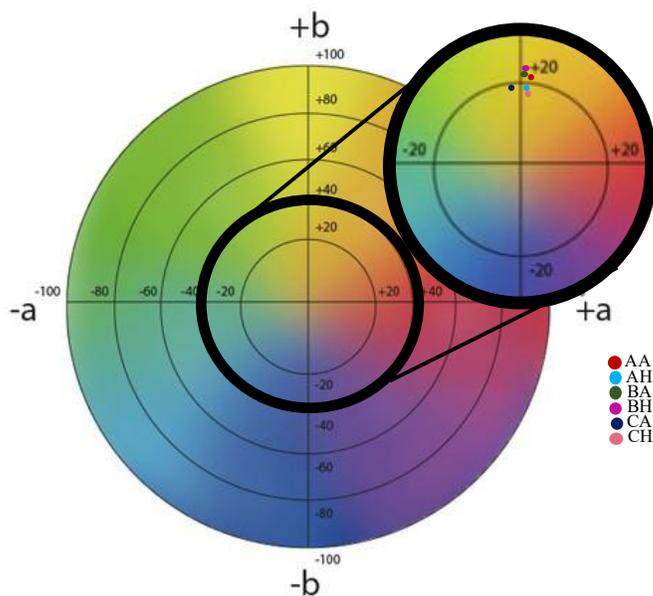


Figura 6. Resultados de cada muestra para color  $a^*$  y  $b^*$  en el círculo cromático.

La variación entre el azul y el amarillo ( $b^*$ ), aunado al índice de amarillo/azul (IA) indican el grado en que la muestra es diferente del blanco ideal con respecto al amarillo. Valores positivos tanto en  $b^*$  como en IA (+) representan una tendencia hacia el amarillo, si los resultados se sitúan en la escala negativa IA (-)

indican dirección hacia el azul. El rango de los resultados para las coordenadas amarillo - azul es de  $19.32 \pm 0.19$  (CH) a  $20.87 \pm 0.15$  (BH) mientras que para la cambiante índice Amarillo/Azul los resultados oscilan entre  $29.82 \pm 0.12$  que pertenece a la muestra CH y  $32.93 \pm 0.48$  correspondiente a BH. Por lo tanto, se sugiere que los quesos estudiados presentan tendencia hacia el amarillo. Lo cual es el reflejo de los  $\beta$ -carotenos y la vitamina B que existen en la leche; misma que funge como materia prima y que sostiene conexión directa con los carotenos presentes principalmente en los pastos que sirven de alimento para los animales (Fox *et al.* 2000).

En la elaboración del queso, según su tipo, los carotenos se concentran en mayor o menor cantidad gracias a la materia grasa, lo que permite que el color amarillo se intensifique, con ello se pueden presentar valores elevados para el parámetro  $b^*$  y cercanos a cero para  $a^*$  (Ramírez-Navas *et al.* 2017). Aunado a lo anterior los quesos recién elaborados son blancos, pero conforme pasa el tiempo, su color se torna amarillento (Gamboa-Alvarado *et al.* 2012). Con respecto a la variable  $b^*$  los resultados son ligeramente superiores a los reportados por Sánchez-Estrada & Sánchez-Estrada (2020) con 18.95 y 19.28.

El índice de blancura (IB) muestra la tendencia dirigida a un blanco ideal, cuando el valor de IB es de 100, cualquier diferencia con este valor indica que la muestra analizada se aleja del blanco ideal, en el caso de los quesos frescos artesanales el valor mínimo registrado fue de  $77.08 \pm 0.42$  resultado de la muestra BH y como máximo  $79.3 \pm 0.25$  obtenido de CH.

La saturación o pureza de color ( $C^*$ ), explica la distancia que existe entre un color y el gris neutro u otra tonalidad pura del espectro (Ramírez-Navas 2010). La muestra que registró mayor pureza es CH con  $19.32 \pm 0.09$  y la menor BH al registrar  $20.87 \pm 0.15$ .

Los resultados obtenidos para el ángulo o matiz de tonalidad (h), oscilaron entre  $88.78 \pm 0.09$  y  $92.76 \pm 0.03$ , que corresponden a las muestras AA y BH respectivamente.

#### 7.4 Variables bromatológicas

Los cálculos correspondientes a las medias ( $\bar{x} \pm EE$ ) de las variables bromatológicas se muestran en la Tabla XIV.

Tabla XIV. Características bromatológicas (Media  $\pm$  Error Estándar) determinadas en las muestras de quesos frescos artesanales.

Muestra	Humedad (%)	Materia seca (%)	Proteína cruda (%)	Grasa cruda (%)	Cenizas (%)	Calcio (g/kg)	NaCl (g/kg)	Conductividad eléctrica (Ds/m)
AA	47.07 $\pm$ 0.16	52.94 $\pm$ 0.16	37.67 $\pm$ 0.06	44.98 $\pm$ 0.05	10.60 $\pm$ 0.01	20.50 $\pm$ 7.05	57.66 $\pm$ 6.18	1.48 $\pm$ 0.22
AH	50.57 $\pm$ 0.61	49.43 $\pm$ 0.61	39.58 $\pm$ 0.13	43.34 $\pm$ 0.04	8.46 $\pm$ 0.04	15.14 $\pm$ 0.27	41.87 $\pm$ 0.33	1.32 $\pm$ 0.02
BA	46.71 $\pm$ 0.23	53.29 $\pm$ 0.23	39.48 $\pm$ 0.36	41.78 $\pm$ 0.04	8.71 $\pm$ 0.03	15.57 $\pm$ 0.42	42.54 $\pm$ 0.89	1.58 $\pm$ 0.01
BH	48.07 $\pm$ 0.58	51.93 $\pm$ 0.58	40.31 $\pm$ 0.29	42.89 $\pm$ 0.08	8.75 $\pm$ 0.02	16.30 $\pm$ 0.70	48.43 $\pm$ 2.84	1.87 $\pm$ 0.02
CA	49.70 $\pm$ 0.02	50.30 $\pm$ 0.02	49.52 $\pm$ 0.30	18.54 $\pm$ 0.05	12.50 $\pm$ 0.04	27.99 $\pm$ 5.38	46.05 $\pm$ 4.88	1.54 $\pm$ 0.04
CH	50.46 $\pm$ 0.40	49.54 $\pm$ 0.40	39.87 $\pm$ 0.20	40.06 $\pm$ 0.02	9.90 $\pm$ 0.02	28.94 $\pm$ 0.66	64.52 $\pm$ 5.05	1.63 $\pm$ 0.02

NaCl = Cloruro de sodio.

AA= Quesería A – queso de Aro.

AH= Quesería A – queso de Hoja.

BA= Quesería B – queso de Aro.

BH= Quesería B – queso de Hoja.

CA= Quesería C – queso de Aro.

CH= Quesería C – queso de Hoja.

#### 7.4.1 Humedad

El contenido de Humedad fluctuó entre  $46.71 \pm 0.23$  y  $50.57 \pm 0.61$ , valores que se estimaron para las muestras BA y AH. El agua contenida en un alimento como el queso es variable puesto que está en función de la coagulación, desuerado, prensado y el tiempo que ha transcurrido desde su elaboración hasta la recolección de la muestra (de la Haba-Ruiz 2017). La migración del agua interna hacia el exterior a través de los poros que el queso contiene, provoca que el líquido se evapore aceleradamente por medio de la superficie del queso.

Alto contenido de humedad provoca que el crecimiento de las bacterias que provienen de la leche se facilite. La humedad que se reportó para los distintos quesos analizados concuerda con los parámetros permisibles para los quesos de consistencia blanda ( $\geq 46\%$ ) (Soles & Oswaldo 2014). Soles & Oswaldo (2014) evaluaron quesos frescos adquiridos en cinco mercados del distrito de Trujillo en Perú, encontraron contenidos de humedad que van desde 56.24% hasta 58.16%, mientras que Sánchez-Estrada & Sánchez-Estrada (2020) evaluaron tres quesos frescos que tenían porcentajes de humedad de 62.93, 63.36 y 63.65, todos son valores superiores a lo reportado en esta investigación.

#### 7.4.2 Materia seca

Los sólidos o también denominados materia seca (MS) se complementan con la humedad y su correlación es inversamente proporcional, cuando la MS aumenta la humedad disminuye, por lo tanto, aquellos factores que afectan a la humedad favorecen la concentración de sólidos (López-Guzmán 2010). Los resultados para esta variable tuvieron como mínimo  $49.43 \pm 0.61$  (AH) y  $53.29 \pm 0.23$  (BH) como máximo. Los resultados son superiores a 41.84% - 43.76% determinado por Soles & Oswaldo (2014) en quesos frescos.

#### 7.4.3 Proteína Cruda

La relevancia a nivel nutricional del queso radica en su contenido de proteínas las cuales tienen un alto valor biológico. La digestibilidad de las proteínas del

queso es de 95%, lo que lo convierte en un producto similar a el huevo y diversos productos cárnicos (Soles & Oswaldo 2014).

El nivel de las proteínas está influenciado por la calidad de la leche empleada, las diferencias durante el proceso de producción, e incluso, por un inadecuado control de variables importantes tales como pH y la acidez, que tienen efecto sobre la precipitación de las proteínas (Rosado-Zarrabal *et al.* 2013, Villegas-Soto *et al.* 2017).

Las muestras que conforman esta investigación; para la variable proteína cruda (PC) oscilan entre  $37.67 \pm 0.06$  (18.8%) que pertenece a AH y  $49.52 \pm 0.30$  (24.76%) que representa a CA. Similares a los valores encontrados por otros investigadores, tal es el caso de Hekken & Farkye (2003) con 17% - 21% para quesos frescos y García-Islas (2006) quien analizó diferentes tipos de quesos como el Panela (18.4% - 20.5%), queso Oaxaca (20.4% - 22.4%), queso Blanco (20% - 22%), queso Asadero (24% - 27%). Así como también del Queso Bola producido en Ocosingo, Chiapas del cual reporta contenido de proteína de 22% (López *et al.* 2015). De los quesos frescos evaluados por Soles & Oswaldo (2014) que contenían de 18.09% a 20.89% de proteína, mientras que de 22.94% a 23.12% presentaron los quesos frescos estudiados por Sánchez-Estrada & Sánchez-Estrada (2020). En contraste, los valores obtenidos son superiores a los establecidos por Salguero-Cevallos (2016) al evaluar quesos frescos, determinó que el contenido de proteína era de 15.7%, y el requesón analizado por García-Islas (2006) contenía 11% - 12% de PC. Según González (2010) 1 L de leche aporta 32 g de proteína, por lo tanto, los quesos de este estudio presentan valores inferiores de lo que contienen 10 L de leche, necesarios para elaborar 1 kg de queso, aunque es importante recordar que durante el proceso de elaboración ocurre una reducción de éstas.

#### 7.4.4 Grasa Cruda

Los valores para la grasa cruda (GC) oscilaron entre  $18.54 \pm 0.05$  (9.27%) que pertenece a la muestra CA y  $44.98 \pm 0.05$  (22.49%) encontrado en AA. El contenido de grasa en los quesos depende de múltiples factores tales como:

- El contenido de grasa en la leche utilizada como materia prima.
- El tamaño del glóbulo graso.
- La velocidad de coagulación.
- El tratamiento al que se ha sometido la cuajada.
- El tiempo de añejamiento del producto final (de la Haba-Ruiz 2017).

Salguero-Cevallos (2016) y García-Islas (2006) evaluaron quesos frescos, mientras que López *et al.* (2015) analizaron queso de Bola y determinaron que el contenido de grasa era de 22.01%, 18.29% y 39.3% respectivamente, por otro lado, 1 L de leche contiene 25 g de grasa (González 2010). Estos valores son semejantes a los reportados en la presente investigación, a excepción de la muestra AA. Sin embargo, los contenidos bajos en grasa pueden atribuirse a las diferencias en el proceso de elaboración, destacando la nula estandarización en el porcentaje de grasa que contiene la leche, misma que funge como materia prima (Romero-Castillo *et al.* 2009).

#### 7.4.5 Cenizas

El valor más alto de contenido de ceniza le correspondió a AH ( $8.46 \pm 0.04$ ) que representa 4.23% y el valor mínimo se presentó en la muestra CA ( $12.50 \pm 0.04$ ) que constituye 6.25% del alimento. Sánchez-Estrada & Sánchez-Estrada (2020) informaron que sus quesos analizados contenían de 2.15% a 3.28% de minerales, Salguero-Cevallos (2016) determinó cenizas de 1.69% para quesos frescos. Mientras que Soles & Oswaldo (2014) reportaron también, quesos frescos con valores de 1.05% a 2.38%. Todos los cálculos se sitúan por debajo de lo encontrado en quesos frescos artesanales adquiridos en el mercado de Puerto Escondido, por lo tanto, los quesos analizados son ricos en nutrientes tales como los minerales, los cuales se encuentran contenidos en las cenizas y son importantes para la nutrición tanto de los consumidores como de la microbiota que habita en estos productos lácteos.

#### 7.4.6 Calcio

González (2010) menciona que en 1 L de leche líquida se encuentran aproximadamente 1.2 g de calcio, tomando en cuenta que para generar 1 kg de queso se necesitan alrededor de 10 L de leche, 1000 g de queso fresco deberían contener 12 g de calcio. En el caso de los quesos frescos artesanales el valor mínimo registrado para la variable calcio fue de  $15.14 \pm 0.27$  resultado de la muestra AH y como máximo  $28.94 \pm 0.66$  obtenido de CH. Los quesos frescos artesanales adquiridos en el mercado de Puerto Escondido tienen altos contenidos de calcio.

#### 7.4.7 Cloruro de sodio

Los niveles de NaCl, comúnmente llamada sal, en el queso, deben oscilar entre 0.6% y 7.0%, para quesos frescos (Ramírez-Navas *et al.* 2017). En el caso de las muestras analizadas, los valores encontrados para este compuesto van desde 4.2% que pertenece a la muestra AH, hasta 6.5% encontrado en CH, dichos resultados superan a lo reportado por Van-Hekken & Farkye (2003) 1% - 3% en quesos frescos; y a lo determinado por Soles & Oswald (2014), de 0.71% a 1.63% evaluando el mismo tipo de producto lácteo. Aun cuando los quesos del presente estudio cuentan con altos contenidos de sal, es necesario recordar que *S. aureus* tiene la capacidad de crecer en ambientes que tienen hasta 10% de sal común.

#### 7.4.8 Conductividad eléctrica

La CE es una medida indirecta de la concentración de sales de una solución y de su contenido bacteriano, la causa radica en que las sales son buenas conductoras de electricidad y las bacterias generan electricidad cuando respiran (Gacto 2014). Los resultados para la variable CE se encuentran entre  $1.32 \pm 0.02$  que pertenece a AH y  $1.87 \pm 0.02$  que representa a BH.

## 7.5 Variables microbiológicas

Las variables microbiológicas incluyen la detección de *S. aureus* y su caracterización a nivel molecular, que comprende las etapas de: Detección del gen *mecA* como prueba confirmatoria de SARM, determinar el perfil de virulencia y establecer el tipo de SCC*mec*.

### 7.5.1 Bacterias

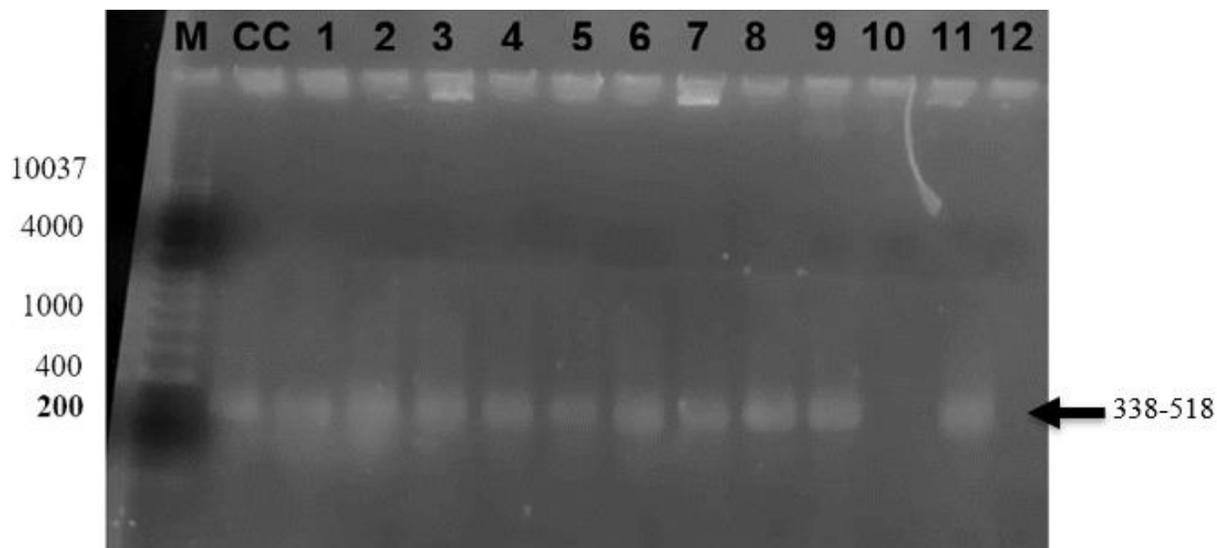


Figura 7. Producto de PCR para la detección de ADN bacteriano. En quesos frescos artesanales expendidos en el mercado de Puerto Escondido, mediante gel de agarosa al 2%.

Carriles: M. Marcador Hyperladder 1Kb, CC. Cepa Control (ATCC 43300), 1. AA, 2. AA, 3. AH, 4. AH, 5. BA, 6. BA, 7. BH, 8. BH, 9. CA, 10. CA, 11. CH y 12. CH.

Todas las muestras de ADN analizadas dieron positivo para los primers 338F y 518R con tamaño de 200 pares de bases (pb), tal y como se muestra en la Figura 7. Lo cual significa que el material genético evaluado contiene bacterias.

### 7.5.2 *Staphylococcus aureus*

La presencia del microorganismo *S. aureus* fue exitosa para todas las muestras de queso fresco artesanal, en la Figura 8 se aprecian las bandas de ADN amplificadas, así como, sus tamaños correspondientes, esto se traduce en los resultados que se presentan en la Tabla XV, los cuales indican que el material

genético corresponde a *Staphylococcus aureus* (23S rRNA), el cual cuenta con la particularidad de ser coagulasa positiva (coa).

Tabla XV. Identificación de cepas de *Staphylococcus aureus* por PCR en muestras de quesos frescos artesanales

Muestra	23S rRNA	Coa
AA	1	1
AH	1	1
BA	1	1
BH	1	1
CA	1	1
CH	1	1

23S rRNA= *Staphylococcus*.

Coa= Evasión inmunológica.

1= Presencia.

0= Ausencia.

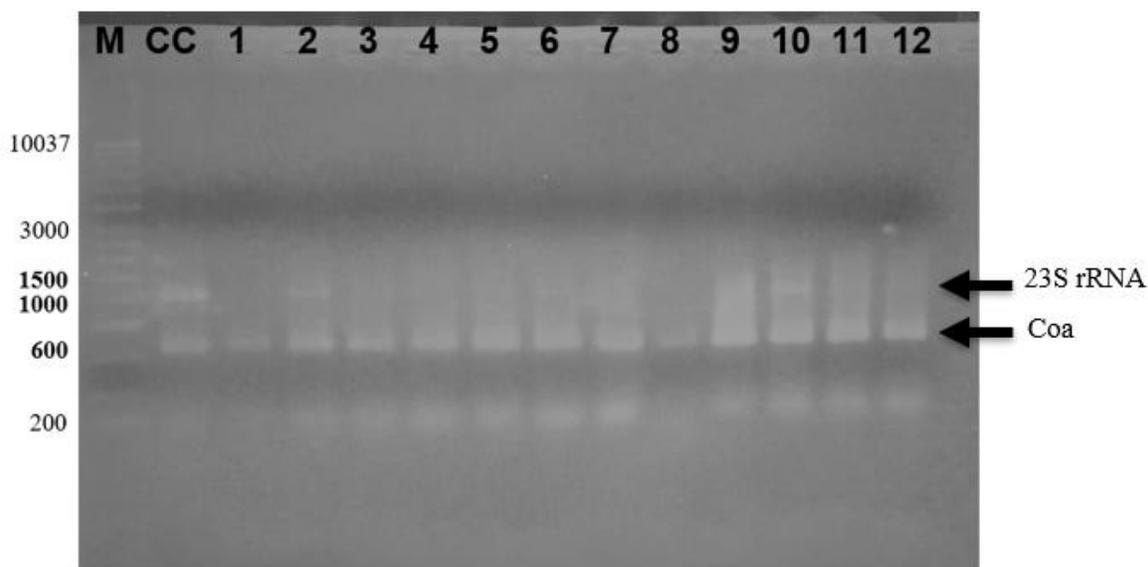


Figura 8. Producto de PCR multiplex para la detección de ADN perteneciente a *Staphylococcus aureus* y sus características. En quesos frescos artesanales expendidos en el mercado de Puerto Escondido, mediante gel de agarosa al 2%. Carriles: M. Marcador Hyperladder 1Kb, CC. Cepa Control (ATCC 43300), 1. AA, 2. AA, 3. AH, 4. AH, 5. BA, 6. BA, 7. BH, 8. BH, 9. CA, 10. CA, 11. CH y 12. CH.

La detección de coagulasa permitió diferenciar a *S. aureus* coagulasa positivo de otras especies de estafilococos coagulasa negativos. Además, revela la

facultad de *S. aureus* para generar la enzima extracelular responsable de coagular el plasma. La producción de coagulasa está fuertemente correlacionada con la virulencia que ejerce el microorganismo, puesto que evita la fagocitosis de la bacteria al localizar el área infectada y crear una capa de fibrina alrededor del absceso estafilocócico (Cervantes-García *et al.* 2014).

Los resultados obtenidos en la presente investigación son similares a los reportados por Vanegas *et al.* (2008) quienes al analizar 13 quesos provenientes de tiendas o ventas callejeras aislaron en todas a *Staphylococcus aureus*; sin embargo, en otros 37 quesos provenientes de supermercados no detectaron la presencia de *Staphylococcus spp.*

En el caso de Herrera & Santos (2015a), al evaluar 68 cepas de *Staphylococcus*, a partir de 100 muestras de queso doble crema artesanal, originarios de Pamplona, Colombia, encontraron en 100% de *S. aureus* al gen *coa*. Dichos resultados concuerdan con los encontrados en el presente estudio y con los reportados por Saltos *et al.* (2018) quienes tomaron diariamente muestras de queso fresco producido en la Cooperativa de Producción Agropecuaria Chone LTDA, Ecuador, durante cinco días. Obtuvieron: 98 UFC/g, 116 UFC/g, 79 UFC/g, 120 UFC/g y 13 UFC/g en diluciones de  $10^2$  para los cinco días de análisis respectivamente, lo que se traduce en 100% de las muestras contaminadas con *S. aureus*.

Maldonado y Llanca (2008) evaluaron 32 muestras de queso de mano que provenían de cuatro centros de venta en Girardot, Aragua, Venezuela, en los que cuantificaron  $2.9 \times 10^6$  UFC/g para *Staphylococcus spp.* de las cuales 25% se registraron como coagulasa positiva, mesófilos aerobios  $4.3 \times 10^9$  UFC/g. Por otro lado, Komatsu *et al.* (2010) al analizar 50 muestras de quesos frescos artesanales producidos en Uberlândia, Brasil, encontraron que 88% de las muestras dieron positivo para la presencia de *S. aureus* coagula positiva. Mientras que Shanehbandi *et al.* (2014) al aislar 120 colonias, a partir de muestras de queso producido en la región noroeste de Azerbaiyán, Irán, encontraron que 110 de las colonias eran *S. aureus*, todos dieron positivos para los cebadores *coa*, *nuc* y 16S rDNA. Yugcha (2016) obtuvo una prevalencia 83.33% de *S. aureus* en quesos

frescos artesanales que eran producidos en seis queserías diferentes en Riobamba, Chimborazo, Ecuador. En cambio, en Tabasco, México; Guzmán-Hernández *et al.* (2016) al analizar 52 muestras de quesos frescos no pasteurizados, solo aislaron a *S. aureus* en 36% de las muestras. Otra investigación reportó que, de 78 quesos elaborados con leche de vaca no pasteurizada, 44 de ellos fueron positivos para *S. aureus* (Adame-Gómez *et al.* 2018). Todas estas investigaciones reportan menor frecuencia de confirmación de *S. aureus* y aparición del gen *coa* en comparación con los resultados del presente estudio.

*Staphylococcus aureus* en los quesos puede tener su origen en una contaminación cruzada, puesto que se aísla con frecuencia de la piel y mucosas de personas y animales, incluso de individuos saludables. Se ha demostrado que las cepas aisladas de manos pueden ser del mismo tipo que las aisladas de la mucosa nasal. Existen tres clases de portadores: permanentes, ocasionales y aquellos que son susceptibles de ser colonizados por cepas coagulasa positiva. El número de individuos que pueden fungir como fuente de infección aumenta cuando se tienen los siguientes padecimientos: sinusitis, faringitis o resfriado (Gorwitz *et al.* 2008, Alejo *et al.* 2011).

### 7.5.3 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

El gen *mecA* es el responsable de la resistencia a meticilina en *S. aureus* (Castellano & Perozo-Mena 2010).

Tabla XVI. Identificación de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina por PCR en muestras de quesos frescos artesanales.

Muestra	<i>mecA</i>
AA	1
AH	1
BA	1
BH	1
CA	1
CH	1

*mecA*= *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

1= Presencia.

0= Ausencia.

Las cepas de *S. aureus* que son resistentes a meticilina lo son también a todos los  $\beta$ -lactámicos, incluyendo las penicilinas, cefalosporinas (a excepción de ceftobiprol y ceftarolina) y carbapenemes (Hanssen & Ericson 2006).

Los alimentos de origen animal que contienen a las cepas con el gen *mecA* pueden haberse contaminado en distintos momentos de la cadena de producción, ya sea durante la obtención de materia prima (sacrificio u ordeño) o bien, al momento de elaborar el alimento a través de manipuladores, superficies y utensilios que se emplean, tales como madera, cerámica y plástico donde el microorganismo puede llegar a sobrevivir e infectar durante 3 días, 21 días y 56 días respectivamente. (Weese & Van 2010, Herrera & Santos 2015c).

El material genético analizado confirmó la presencia del gen *mecA* (Tabla XVI) en *S. aureus* encontrado en los diferentes quesos analizados. Similar a lo reportado por Herrera *et al.* (2016) quienes obtuvieron 8 aislamientos de SARM, a partir de muestras de queso fresco (doble crema) producido con leche cruda de vaca en pequeñas lecherías de Colombia. Todos los aislamientos albergaban el gen *mecA*. Shanehbandi *et al.* (2014) de 110 aislamientos de *S. aureus* detectaron que 21% fueron *mecA* positivos. Rizek *et al.* (2011) también encontraron la presencia del mismo gen, aunque en menor proporción puesto que solo fueron positivos 5 de 57 aislados de *S. aureus* que provenían de distintos tipos de alimentos, entre ellos el queso. Herrera & Santos (2015a) informaron que el gen, estuvo presente en 18.2% de 68 cepas *S. aureus*. Mientras que Adame-Gómez *et al.* (2018) reportaron que la frecuencia de SARM fue del 10.26%, 8 de 78 quesos fueron positivos. Resultados aún más inferiores se detectaron en 200 muestras de queso sin envasar examinadas en Turquía, que permitieron el aislamiento de 12 cepas, donde solo dos de ellas fueron *mecA* positivas (Can & Celik 2012). También existen investigaciones que reportan ausencia del gen en todas sus muestras tal es el caso de Diaz (2016) que en 64 piezas de quesos fresco adquiridas en mercados fijos e itinerantes en Toluca, México, obtuvo 17 aislamientos de *S. aureus*, que a pesar de ser resistentes a múltiples antibióticos en todos los aislamientos no se detectó la presencia del gen *mecA* por lo que se consideraron como *Staphylococcus aureus* sensibles a la meticilina.

#### 7.5.4 Perfil de virulencia

En la Tabla XVII se exponen los resultados obtenidos para la determinación del perfil de virulencia de *Staphylococcus aureus*, los cuales se dedujeron a partir del producto de PCR múltiplex que se presenta en la Figura 9, junto con las distintas bandas amplificadas, sus tamaños y la muestra a la que corresponden.

Tabla XVII. Perfil de virulencia de *Staphylococcus aureus* por PCR-multiplex en muestras de quesos frescos artesanales.

Muestra	EntE	etB	Tsst
AA	1	0	1
AH	1	0	1
BA	0	1	0
BH	0	1	0
CA	0	1	1
CH	0	1	0

EntE= Enterotoxina E.  
 etB= Toxina etB.  
 Tsst= Toxina-1 del síndrome de choque tóxico.  
 1= Presencia.  
 0= Ausencia.

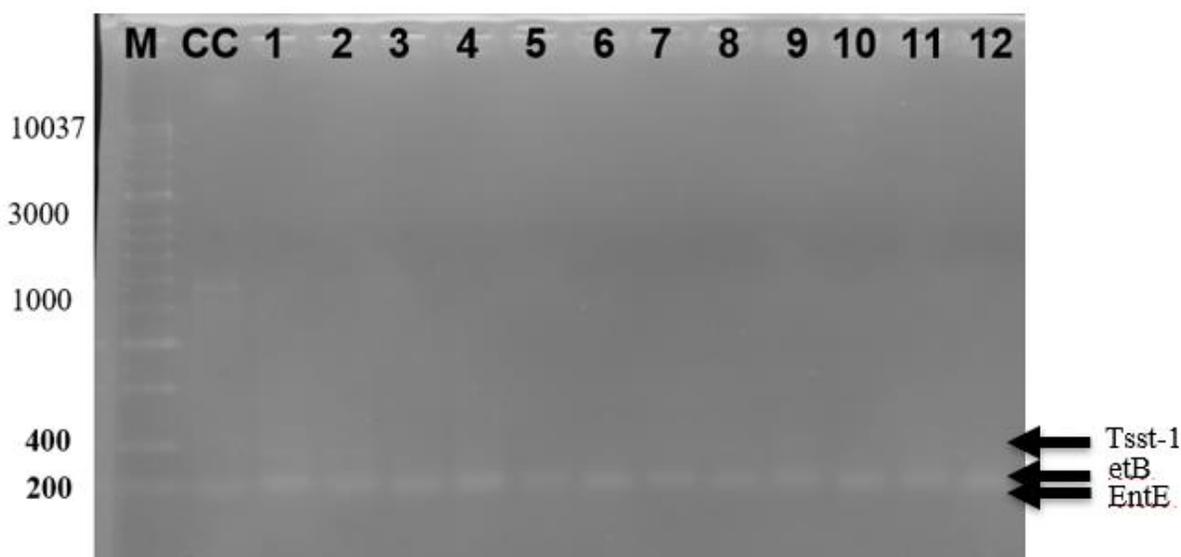


Figura 9. Producto de PCR multiplex para la determinación del perfil de virulencia. En quesos frescos artesanales expendidos en el mercado de Puerto Escondido, mediante gel de agarosa al 2%.

Carriles: M. Marcador Hyperladder 1Kb, CC. Cepa Control (ATCC 43300), 1. AA, 2. AA, 3. AH, 4. AH, 5. BA, 6. BA, 7. BH, 8. BH, 9. CA, 10. CA, 11. CH y 12. CH.

Los factores de virulencia que producen las cepas de *S. aureus*. Desempeñan cuatro roles diferentes: protección del microorganismo ante el sistema inmunitario del hospedero, asignación del lugar de la infección, daño tisular local y, además, actúan como toxinas que dañan sitios de tejido no contaminado. El desarrollo de las enfermedades estafilocócicas está ligado a la resistencia del huésped y a la virulencia del microorganismo (Arteaga & Arteaga 2005).

Los genes que codifican para algunos factores de virulencia detectados fueron:

- El gen que codifica para la enterotoxina E (*see*) en las muestras que pertenecen a la quesería A.
- El gen que codifica para la toxina exfoliativa B (*etb*) detectada en las muestras de las queserías B y C.
- El gen que codifica para TSST-1 (*tsst-1*) encontrado en todos los quesos provenientes de la quesería A y en la muestra CA que tiene su origen en la quesería C y es un queso de Aro.

Los resultados de Guzmán-Hernández *et al.* (2016), reportaron que 17% de las muestras de queso de donde se aisló *S. aureus* contaban con la presencia de enterotoxinas, en este caso no se determinó el tipo de enterotoxinas.

El gen que codifica para la enterotoxina E (*see*) se identificó en dos muestras de queso, misma que se encontró en la investigación de Shanehbandi *et al.* (2014) quienes hallaron que 34.8% de sus aislados provenientes de queso fresco, eran positivos para *sea*, 13% *seb*, 4.3% *sec* y 8.7% *see*. La enterotoxina estafilocócica E es un superantígeno que, como tal, posee características inmunomoduladoras. Es termoestable, producida durante la fase logarítmica del crecimiento bacteriano y es resistente a los jugos gástricos que se encuentran en el estómago de los hospedadores. Además de ser responsable de intoxicaciones alimentarias que presentan síntomas como diarrea y vómito, e incluso puede generar cuadros de enterocolitis. El principal medio de transferencia hacia los quesos de cepas que contienen en su genoma a las enterotoxinas estafilocócicas, como la enterotoxina

E, son quienes los elaboran y manipulan, seguido de animales que padecen mastitis clínica o subclínica (Alejo *et al.* 2011, Cervantes-García *et al.* 2014).

El gen que produce la toxina exfoliativa o epidermolítica B (*etb*) se detectó en 66.67% de las muestras; sin embargo, dicha toxina no es comúnmente reportada en las distintas investigaciones realizadas en quesos. La toxina exfoliativa B es superantígeno, termolábil, codificada a partir de plásmidos y tiene actividad de proteasa serina, por lo que puede producir la separación de la piel desde los desmosomas, provocando cambios en la matriz intracelular en el estrato granuloso de la epidermis, originando una erupción localizada; como la denominada impétigo bulloso, o bien generalizada, como la fiebre escarlatina y el síndrome de piel escaldada (Arteaga & Arteaga 2005, Cervantes-García *et al.* 2014). La producción de esta toxina ocurre cuando el crecimiento de la bacteria se ha detenido (latencia), por lo tanto, la diseminación se facilita (Cervantes-García *et al.* 2014).

La toxina responsable del síndrome del choque tóxico (TSST-1), es clasificada como un superantígeno, es considerada una proteína con la facultad de termo estabilidad, origina que macrófagos y linfocitos T liberen citocinas. Algunas cepas cuentan con la capacidad de producir bacteriocinas que detienen el crecimiento de otras bacterias, de igual manera, es asociada con infecciones estafilocócicas locales cuando se encuentra en bajas concentraciones, mientras que en altos niveles es citotóxica. Además, induce la producción de IL-1 y del factor de necrosis tumoral, lo que ocasiona hipotensión, fiebre e incluso puede generar compromiso multisistémico (Arteaga & Arteaga 2005, Cervantes-García *et al.* 2014). Ghasemi & Mahdavi (2018) determinaron que 2 de 22 aislamientos de *S. aureus* provenientes de quesos locales en el noreste de Irán, contenían el gen *tsst-1*; mientras que Arcuri *et al.* (2010) al analizar 166 aislados de *S. aureus* a partir de leche cruda de vaca contenida en tanques de enfriamiento de leche y queso fresco de Minas en Brasil, encontraron el gen *tsst-1* en 8 aislamientos. TSST-1 es uno de los agentes involucrados en causar la mastitis clínica y subclínica en animales domésticos como vacas, ovejas y cabras por lo que su presencia puede considerarse proveniente de una ruta de transmisión de la leche hacia los alimentos que de ella se generan (Zschöck *et al.* 2000, Farahmand *et al.* 2013).

Otras investigaciones realizadas en quesos frescos no pasteurizados, sin envasar, elaborados con leche de vaca o adquiridos en mercados ambulantes; difieren de los resultados obtenidos en la presente investigación. Vanegas *et al.* (2008) reportaron la amplificación de la enterotoxina A en 13 muestras de quesos de tiendas y ventas callejeras. Can & Celik (2012) detectaron cepas enterotoxigénicas del tipo C en 2 de 12 muestras y C+D en 1 de 12 muestras, las cuales provenían de quesos sin envasar. Adame-Gómez *et al.* (2018) determinaron la producción de la enterotoxina A en 10.26% de 78 quesos elaborados con leche de vaca no pasteurizada. Herrera & Santos (2015b) informaron la presencia de genes para *seb*, *sea* y *sed* la cual fue de 18.5%, 4.6%, y 3.0%, respectivamente en queso doble crema. Por otro lado, Valero-Leal *et al.* (2012) analizaron 114 cepas de *S. aureus* aisladas a partir de 313 muestras de leche provenientes de cuartos mamarios de vacas con mastitis subclínica, 9 muestras de leche de cántara, 9 de cuajada y 9 de queso fresco; las cuales provenían de 9 fincas productoras de queso fresco artesanal en Zulia, Venezuela. En 27 de sus aislamientos detectaron enterotoxinas estafilocócicas: 13 dieron positivo para la B, 4 C, 3 A y 2 D. En Colombia, Herrera *et al.* (2016) encontraron que 3 de 8 aislamientos de SARM, portaban el gen de la enterotoxina B, dichos aislados se obtuvieron de muestras de queso fresco (doble crema). Finalmente, en el caso de Herrera & Santos (2015a) mediante la evaluación de 68 cepas de *Staphylococcus*, el gen para la enterotoxina B estuvo presente en 3% de las muestras.

#### 7.5.5 Tipo de cassette cromosómico

Se detectó una banda que corresponde al locus D, tal y como se observa en la Figura 10. Dicho resultado es análogo para todas las muestras evaluadas (Tabla XVIII). El locus D es un indicativo de la presencia de los SCC*mec* I, II y IV. Sin embargo, para que el cassette I se considere positivo, debe también amplificarse el locus A, mientras que los locus B y C confirmarían la presencia del SCC*mec* II. A partir de lo anterior, se concluye que el material genético pertenece a

*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina con tipo de cassette cromosómico estafilocócico IV (Figura 11).

Tabla XVIII. Tipo de SCCmec de *Staphylococcus aureus* por PCR-multiplex en muestras de quesos frescos artesanales.

Muestra	Locus D
AA	1
AH	1
BA	1
BH	1
CA	1
CH	1

Locus D= Cassette cromosómico Staphylococico I, II y IV.

1= Presencia.

0= Ausencia.

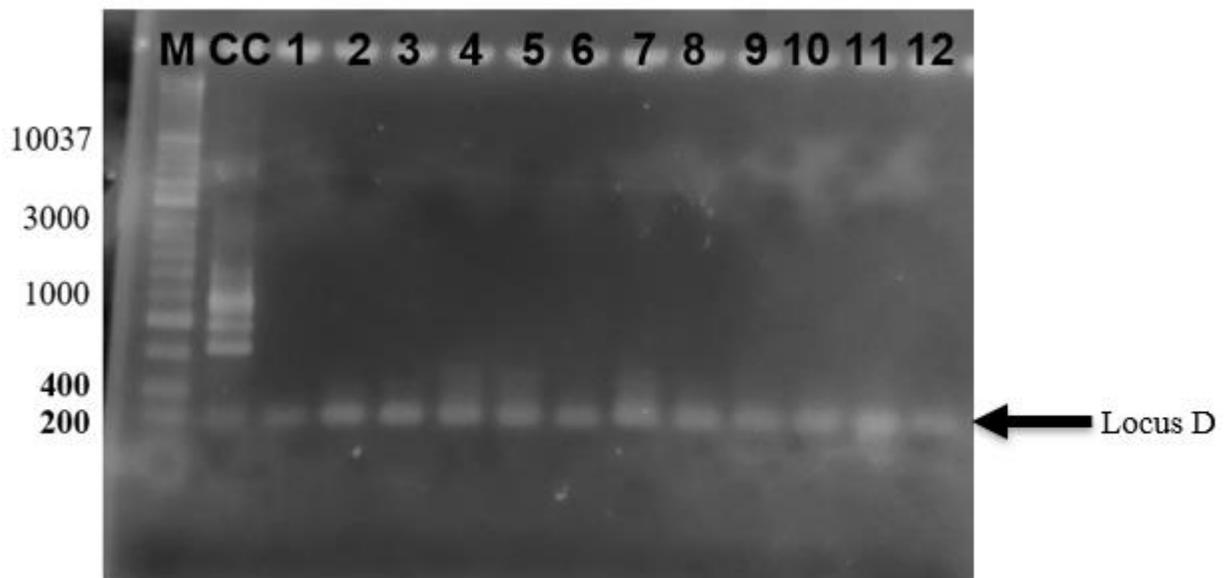


Figura 10. Producto de PCR multiplex para la detección del tipo de SCCmec. En quesos frescos artesanales expendidos en el mercado de Puerto Escondido, mediante gel de agarosa al 2%.

Carriles: M. Marcador Hyperladder 1Kb, CC. Cepa Control (ATCC 43300), 1. AA, 2. AA, 3. AH, 4. AH, 5. BA, 6. BA, 7. BH, 8. BH, 9. CA, 10. CA, 11. CH y 12. CH.

Resultados semejantes reportaron Herrera *et al.* (2016) quienes por medio de una tipificación genética de 8 aislamientos de SARM; obtenidos de muestras de queso fresco (doble crema) producido con leche cruda de vaca en pequeñas lecherías en Colombia, determinaron que todos los aislamientos albergaban el SCCmec tipo IV.

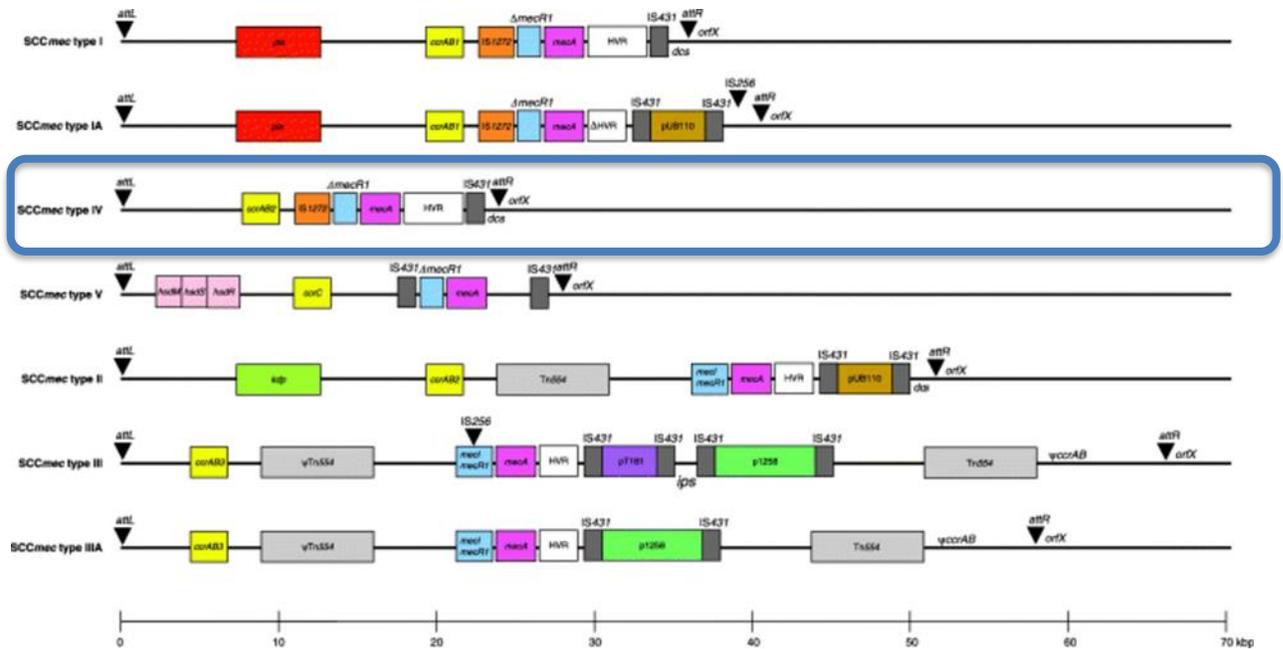


Figura 11. Elementos *SCCmec* I-V observados en staphylococci. (Hanssen & Ericson 2006).

## 7.6 Relación entre las características fisicoquímicas y microbiológicas

Las características fisicoquímicas del queso (Tabla XIX) son evidencia de que existen las condiciones adecuadas para el desarrollo de la vida microbiana, aunado a ello, la microbiota del queso provoca modificaciones en las propiedades de un microambiente como lo son los quesos frescos artesanales, por lo tanto, es relevante establecer si existe relación entre las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de los quesos estudiados.

Tabla XIX Comparación entre parámetros de crecimiento de *Staphylococcus aureus* y resultados fisicoquímicos de las diferentes muestras de quesos frescos artesanales evaluados.

Parámetros de crecimiento de <i>S. aureus</i> .			Muestras					
Parámetros	Crecimiento de <i>S. aureus</i>	Producción de enterotoxinas	AA	AH	BA	BH	CA	CH
		Rango						
Temperatura (C)	7-48	10-48	26.36	24.11	25.06	25.67	24.86	25.00
pH	4-10	4.0-9.6	6.01	6.12	6.27	6.22	6.20	6.44
Aw	0.83- > 0,99 0-90- > 0,99	0.85 - > 0,99 0.90 - > 0,99	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NaCl (%)	0-20	0-10	5.77	4.19	4.25	4.84	4.61	6.45
Atmósfera	Aerobía-anaerobia	Aerobia – Anaerobia	Ae	Ae	Ae	Ae	Ae	Ae

aw= Actividad de agua.

Ae= Aerobia.

ND= No determinado.

AA= Quesería A – queso de Aro.

AH= Quesería A – queso de Hoja.

BA= Quesería B – queso de Aro.

BH= Quesería B – queso de Hoja.

CA= Quesería C – queso de Aro.

CH= Quesería C – queso de Hoja.

### 7.6.1 Componentes principales de las variables que conforman el color

El análisis de componentes principales es un método estadístico que permite simplificar información o reducir el número de variables, perdiendo la menor cantidad de información posible (Ávila *et al.* 2015).

Tabla XX. Peso de las variables que conforman el color para los eigenvectores 1 y 2.

Variable	CP1	CP2
L*	-0.15	0.45
a*	0.11	0.28
b*	0.43	-0.05
<b>IA</b>	<b>0.72</b>	-0.23
C*	0.43	-0.05
<b>h°</b>	-0.30	<b>-0.81</b>
Eigenvalores	1.83	1.47
% de la varianza explicada	56.29	36.28

CP1= Componente principal 1.  
 CP2= Componente principal 2.  
 L\*= Luminosidad.  
 a\*= Rojo - Verde.  
 b\*= Amarillo - Azul.  
 IB= Índice de Blancura.  
 IA= Índice Amarillo/Azul.  
 C\*= Saturación de color.  
 h= Ángulo de tonalidad.

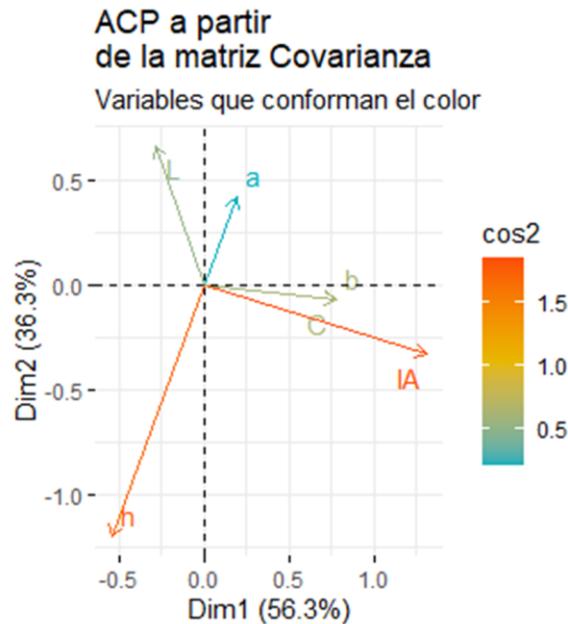


Figura 12. ACP de las variables que conforman el color.

En el ACP que se realizó a partir de la matriz de covarianzas, se generaron seis eigenvectores que en conjunto representan 100% de la varianza explicada. Debido a su mayor relevancia se seleccionaron los componentes principales 1 (56.29%) y 2 (36.28%) los cuales explican en conjunto 92.57% de la variación del color en los quesos frescos artesanales, dichos eigenvectores se muestran en la Tabla XX donde además se presentan sus correlaciones con cada una de las variables que los conforman.

A partir de los resultados obtenidos las variables seleccionadas son IA con peso de 0.72 en el componente principal 1, suceso que la convierte en la variable más importante, y h° que tiene un peso de 0.81 en el CP2. Debido a su alta relevancia ambas variables se utilizaron para realizar el ACM.

### 7.6.2 Componentes principales de las variables bromatológicas

La varianza explicada a nivel bromatológico para los diferentes quesos frescos artesanales que fueron analizados está representada en su totalidad por seis eigenvectores. Los componentes principales 1 y 2 tuvieron 96.89% de la varianza explicada, en la Tabla XXI aparecen las variables que los conforman y sus diferentes correlaciones.

Tabla XXI. Peso las variables bromatológicas para los eigenvectores 1 y 2.

Variable	CP1	CP2
Humedad	0.06	-0.09
Proteína cruda	0.27	-0.24
<b>Grasa cruda</b>	<b>-0.69</b>	0.50
<b>Calcio</b>	<b>0.57</b>	0.22
<b>NaCl</b>	0.36	<b>0.80</b>
Conductividad eléctrica	-0.00	0.00
Eigenvalores	11.31	10.78
% de la varianza explicada	50.75	46.14

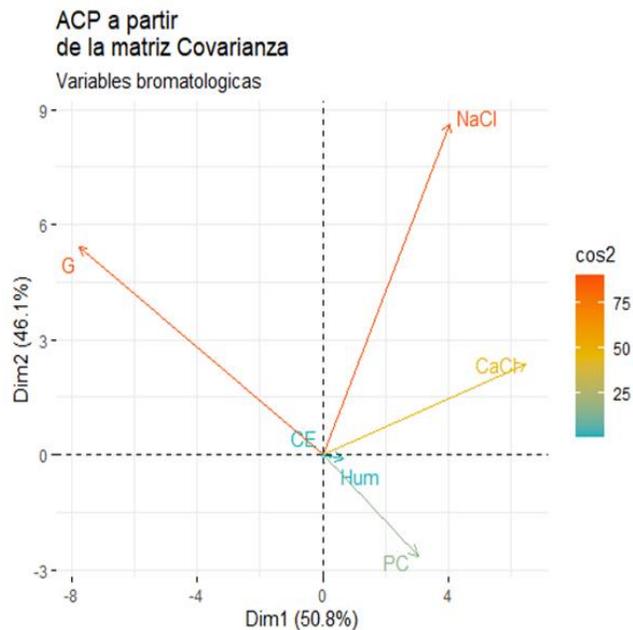


Figura 13. ACP de las variables bromatológicas.

Como resultado de los análisis estadísticos, se han elegido a las tres variables bromatológicas más representativas, las cuales fueron: grasa cruda y calcio provenientes del CP1 y NaCl con origen en el eigenvector 2, con pesos de -0.69, 0.57 y 0.80 respectivamente. Dichas fluctuantes se emplearon en el ACM.

### 7.6.3 Análisis de correspondencias múltiples

Es un análisis estadístico multivariante que fue seleccionado, debido al objetivo de estudiar la correlación entre los grupos de variables homogéneas, las fisicoquímicas y microbiológicas, el primero conformado por; pH, IA, h°, grasa, calcio y NaCl. El segundo que comprende a las variables; Coa, EntE, etB, Tsst y Locus D, las cuales fueron

seleccionadas gracias a su importancia descriptiva para *S. aureus* y a que no podían ser sustituidas por otras.

Al ejecutar el ACM se obtuvieron en todas las variables fisicoquímicas valores de 1.00 para todas las coordenadas en las dimensiones 1 y 2 tal y como se muestra en la Tabla XXII, ubicada en la sección de anexos. Estos resultados se traducen en que las variables son las más importantes, pero no permiten agrupar a los individuos, mientras que Coa y Locus D (variables microbiológicas) obtuvieron valores de 0.00 en todas las dimensiones lo que indica que no tienen relevancia; las dimensiones 1 y 2 presentaron el mayor eigenvalor; sin embargo, en conjunto solo manifiestan 22.39% de la varianza.

Se procedió a realizar un nuevo ACM, empleando la variable NaCl; debido a su alta concentración en los quesos, lo que los convierte en un medio más selectivo para *S. aureus* y su producción de toxinas. Las variables EntE, etB, y Tsst también fueron participes del análisis. Los resultados se sitúan en la Tabla XXIII que se encuentra en el apartado de anexos (Anexo 2). Muestra que la variable NaCl es la más importante en las dimensiones 1 y 2, pero no es la característica diferenciadora para las muestras, ambas dimensiones explican 35.71% de la varianza.

Finalmente, se ejecutó un tercer ACM donde sólo se incluyeron a las variables microbiológicas: EntE, etB y Tsst. En las dimensiones 1 y 2 se obtuvieron las coordenadas que se muestran en la Tabla XXIV para cada una de las variables, que en conjunto presentan 100% de la varianza explicada.

En la Figura 14 se muestra la ubicación de cada variable en las dos dimensiones, y se establece la relación entre individuos y variables mediante el cuadrado de la coordenada (co2), representado por una escala colorimétrica. El comportamiento de los diferentes quesos evaluados, se agrupan de la siguiente manera:

- Grupo 1: AA y AH presencia de genes *see* y *tsst-1* (aunque los resultados estadísticos demuestran una menor asociación) y ausencia del gen *etb*.
- Grupo 2: CA positivo para *seb* y *tsst-1* (aunque los resultados estadísticos para *tsst-1* demuestran una menor asociación) y negativos para *see*.
- Grupo 3: BA, BH, y CH que son positivos para *etb* y no para los otros genes (*see* y *tsst-1*).

En todas las muestras, las variables fisicoquímicas expresan resultados que no permiten una predicción del comportamiento de las variables microbiológicas, esto se debe probablemente a la poca variación que existe entre los valores de los individuos para estas características, o bien, al reducido número de muestras analizadas. Ello debido a pesar de producirse en distintos lugares, mediante procesos de elaboración no homogéneos y controles de calidad e higiene diferentes, el microambiente que constituyen es semejante.

Tabla XXIV. Análisis de correspondencia múltiple para las variables EntE, etB y Tsst-1

Variable	Coordenadas Dim1	Coordenadas Dim2
EntE_0	-0.69	-0.16
EntE_1	1.38	0.32
EtB_0	1.38	0.32
EtB_1	-0.69	-0.16
Tsst_0	-0.85	0.53
Tsst_1	0.85	-0.53
Eigenvalores	0.87	0.13
% de la varianza explicada	87.27	12.73

Dim1= Dimensión 1.

Dim2= Dimensión 2.

EntE= Enterotoxina E.

etB= Toxina exfoliativa B.

Tsst= *tssst*-1 Toxina del síndrome de choque toxico.



Figura 14. Analisis de correspondencia múltiple para las variables EntE, etB y TSST. G.1. Grupo 1 conformado por las muestras AA (AA= Quesería A – queso de Aro) y AH (AH= Quesería A – queso de Hoja), G.2. Grupo 2 que incluye a CA (CA= Quesería C – queso de Aro) y G.3. Grupo 3 donde se ubican las muestras BA (BA= Quesería B – queso de Aro), BH (BH= Quesería B – queso de Hoja) y CH (CH= Quesería C – queso de Hoja).

## VIII. Conclusiones

- Los quesos frescos artesanales tienen una tonalidad amarillenta que es producto de altos contenidos de grasa, vitamina B y  $\beta$ -Carotenos, abundantes en los pastos y la leche.
- El pH de las muestras indica la acción de microorganismos, el inicio de un proceso de maduración, el crecimiento de *S. aureus* y la producción de sus toxinas.
- La grasa en la muestra AA presenta un valor muy por debajo del promedio de los otros quesos y de los reportados por otros investigadores, lo que refleja diversidad en la calidad de la leche que funge como materia prima y nula estandarización en el proceso de elaboración de los quesos frescos artesanales en la región.
- El contenido de NaCl en los quesos es superior al encontrado en otras investigaciones y apto para el crecimiento de *S. aureus* y de la generación de toxinas.
- Todos los grupos de quesos presentaron a *S. aureus* coagulasa positiva, 2 muestras (33.33%) contenían el gen *see*, 4 muestras (66.66%) expresaron el gen *etb*, y 3 muestras (50%) manifestaron el gen *tsst-1*.
- Sólo el locus D fue detectado en 100% de las muestras compuestas, por lo tanto, se concluye que todas presentan el SCC*mec* IV que indica que *S. aureus* encontrado puede ser resistente a los  $\beta$ -lactámicos.
- No existe relación entre las características fisicoquímicas determinadas y las variables microbiológicas.
- La mayoría de las investigaciones solo reportan información que caracteriza genéticamente los aislamientos provenientes de hospitales y se aborda con poca frecuencia el problema en la comunidad y aún menos en los alimentos.

## **IX. Implicaciones y recomendaciones**

La conductividad eléctrica es un parámetro que revela información importante sobre el contenido de sales y la acción bacteriana en un alimento, por lo que se recomienda en futuras investigaciones incluir el análisis de esta variable; puesto que no se encontró referencias bibliográficas de ésta.

Es recomendable ejecutar programas de vigilancia sanitaria, en los quesos frescos artesanales, debido a que ayudarían a mejorar la calidad de los quesos y, finalmente, realizar investigaciones que permitan monitorear la trazabilidad de los quesos frescos artesanales, con el fin de reconocer los puntos de riesgo a lo largo de la cadena productiva.

## X. Glosario

**A priori:** Con anterioridad, antes de.

**Abanico de productos lácteos:** Amplia variedad de artículos elaborados a partir de la leche.

**Aislamiento:** Separación de un determinado microorganismo del resto de microorganismos que lo acompañan.

**Banda:** Franja clara u oscura que exhibe una configuración característica y aparece a través del uso de diferentes técnicas de laboratorio.

**Brote:** Presencia de 2 o más focos de la misma enfermedad en un área geográfica determinada y en el mismo periodo de tiempo que tienen alguna relación entre sí.

**Cassette:** Constituye un grupo diverso de pequeños elementos móviles de material genético que usualmente contienen solo un marco de lectura abierta o región codificada.

**Cepa:** Conjunto de microorganismos pertenecientes a una misma especie y que provienen de una única célula o muestra.

**Coco:** Tipo morfológico de bacteria, forma esférica.

**Colonización:** Significa que el microorganismo se encuentra entre la flora del paciente, pero no causa enfermedad.

**DNAsa:** Enzima que cataliza la rotura de los enlaces fosfodiéster en el DNA.

**Enfermedad:** Ruptura del equilibrio en la interacción entre un individuo, agente etiológico y ambiente, que provoca alteraciones en las manifestaciones vitales.

**Fuente de infección:** Persona, animal, objeto o sustancias mediante las cuales el agente infeccioso pasa en forma directa o indirecta a un huésped.

**Gen:** Región codificante del ADN

**Infección:** Entrada, desarrollo y multiplicación de un agente infeccioso en un organismo.

**Impétigo bulloso:** Enfermedad infecciosa de origen bacteriano, caracterizada por vesículas grandes, frágiles; causada por *Staphylococcus aureus*.

**Matriz alimentaria:** Conjunto de componentes nutrientes y no nutrientes de los alimentos y sus relaciones moleculares.

**ORF Circundante:** Marco de lectura abierta que rodea a el complejo *mec*, *ccr* y la región de unión.

**Marco de lectura abierta:** En genética, se llama marco abierto de lectura o marco de lectura abierta (ORF, del inglés open reading frame) a la secuencia de ARN comprendida entre un codón de inicio (AUG) de la traducción y un codón de terminación.

**Patógeno:** Microorganismo como protozoarios, hongos, bacterias, helmintos o virus, que cuenta con la capacidad de que al interactuar con un hospedero puede causar enfermedad.

**Portador:** Huésped que alberga un agente infeccioso sin mostrar signos de enfermedad y constituye una fuente permanente o intermitente de diseminación de la infección, hacia otro huésped o hacia el medio ambiente.

**Proteína represora:** Proteína que tiene un efecto negativo sobre la expresión genética.

**Proteína transductora:** Proteína que se une a nucleótidos guanidílicos, cuya misión es traducir la actividad de unión del receptor.

**Red proteica:** Estructura compleja formada a partir de un conjunto de proteínas.

**Reservorio:** Individuo que puede mantener un agente infeccioso y que puede transmitirlo hacia los huéspedes susceptibles. El agente depende de este material para su supervivencia, los reservorios pueden ser animales, vegetales, artrópodos y el hombre.

**Resistencia a los antibióticos:** Capacidad de un microorganismo para sobrevivir, crecer y multiplicarse en presencia de uno o más fármacos que buscan eliminarlos.

**Resistencia:** Es el conjunto de mecanismos que sirven de defensa inespecífica contra la invasión o multiplicación de agentes infecciosos, sus productos tóxicos.

**Secuestrar nutrientes:** Atrapar sustancias o elementos químicos indispensables para el metabolismo.

**Susceptible:** Organismo que no posee resistencia natural o adquirida contra un agente patógeno determinado con el que puede llegar a estar en contacto.

**Tajable:** Que puede cortarse de un solo tajo y aun así conservar la forma lineal.

**Transmisión:** Es el transporte de un agente desde la fuente de infección hasta un huésped susceptible.

**Virulencia:** Capacidad de un agente infeccioso de producir casos graves o fatales, es decir, es el grado de daño que puede ocasionar en un organismo.

## XI. Abreviaturas

**μL:** Microlitro.

**μM:** Micro mol.

**a\*:** Coordenadas rojo-verde.

**A.O.A.C:** Association of Analytical Communities.

**ACM:** Análisis de Correspondencias Múltiples.

**ACP:** Análisis de Componentes Principales.

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**Ae:** Aerobia.

**aw:** Actividad de agua.

**b\*:** Coordenadas amarillo-azul.

**C\*:** Saturación de color.

**Ca:** Calcio.

**CE:** Conductividad eléctrica.

**co2:** Cuadrado de la coordenada.

**Coa:** Coagulasa positiva.

**CP:** Componente principal.

**CPS:** Estafilococos coagulasa positivo.

**Dim:** Dimensión.

**DNAsa:** Desoxirribonucleasa.

**Ds/m:** Desisemen por mililitro.

**EntE:** Gen que codifica para la Enterotoxina E.

**ES:** Enterotoxinas estafilocócicas.

**ETA´S:** Enfermedades que fueron transmitidas por los alimentos.

**etb:** Gen para la toxina exfoliativa B.

**GC:** Grasa cruda.

**h°:** Angulo de matiz o tonalidad.

**IA:** Índice Amarillo/Azul.

**IAE:** Intoxicación alimentaria estafilocócica.

**IB:** Índice de Blancura.

**K:** Potasio.

**L\*:** Luminosidad.  
**mmol:** Mili mol.  
**MS:** Materia seca.  
**NaCl:** Cloruro de sodio.  
**nm:** Nanómetros.  
**ORF:** Marco de lectura abierta.  
**P:** Fosforo.  
**pb:** pares de bases.  
**PC:** proteína cruda.  
**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa.  
**pH:** Potencial de hidrogeno.  
**PVC:** Policloruro de vinilo.  
**rpm:** Revoluciones por minuto.  
***S. aureus:*** *Staphylococcus aureus*.  
**SARM:** *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.  
**SCCmec:** Cassette cromosómico estafilocócico mec.  
**SEA:** Enterotoxina estafilocócica A.  
**SEB:** Enterotoxina estafilocócica B.  
**SEC:** Enterotoxina estafilocócica C.  
**SED:** Enterotoxina estafilocócica D.  
**SEE:** Enterotoxina estafilocócica E.  
**CNS:** Estafilococos coagulasa negativo.  
**TSST:** Toxina del síndrome del Shock Tóxico.  
**tsst-1:** gen que sintetiza la toxina del síndrome del Shock Tóxico.  
**u/μL:** Unidades por microlitro.  
**UFC/g:** Unidades formadoras de colonia por gramo.

## X. Referencias

- Acha, P. N. & Szyfres, B. 2005. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre. *Revista Española de Salud Pública*, 79 (3): 423-423. [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1135-57272005000300012](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-57272005000300012)
- Adame-Gómez, R., Toribio-Jiménez, J., Vences-Velázquez, A., Rodríguez-Bataz, E., Santiago-Dionisio, M. C. & Ramírez-Peralta, A. 2018. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) en quesos artesanales en México. *Revista Internacional de Microbiología*, 2018: 6. <https://doi.org/10.1155/2018/8760357>
- Aguayo-Reyes, A., Quezada-Aguiluz, M., Mella, S., Riedel, G., Opazo-Capurro, A., Bello-Toledo, H. & González-Rocha, G. 2018. Bases moleculares de la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*. *Revista chilena de infectología* 35 (1): 7-14. <http://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182018000100007>
- Alais, C. 1970. Composición de la leche. *Ciencia de la Leche. Principios de Técnica Lechera*. 2ª edición. Editorial Continental, SA España. [https://www.academia.edu/36794483/Ciencia\\_de\\_la\\_leche](https://www.academia.edu/36794483/Ciencia_de_la_leche)
- Alejo, J., Cortes, M., Correa, D., Klotz, C., Herrera, C., Martínez, J., & Vanegas, M. 2011. Evaluación de riesgos de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico en alimentos preparados no industriales en Colombia. Instituto Nacional de Salud Subdirección de Investigación. Bogotá, Colombia. <https://www.researchgate.net/publication/305805961>
- Álvarez, S., Rodríguez, V., Ruiz, M. E., & Fresno, M. 2007. Correlaciones de textura y color instrumental con la composición química de quesos de cabra canarios. *Archivos de Zootecnia*, 56: 663-666. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49509952>
- Alves, V. F., Nino-Arias, F. C., Pitondo-Silva, A., de Araújo, F. D., de Oliveira, G. L., Toubas, L. C., & De Martinis, E. C. P. 2018. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* from some artisanal Brazilian dairies. *International Dairy Journal*, 85: 247-253. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.06.008>
- Ampuero, J. M. V., Alcántara, R. T., Talenas, M. Á. C. & Bazán, P. C. 2015. Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales que se comercializan en mercados de la ciudad de Huánuco. *Investigación Valdizana*, 9 (1): 21-26. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=586061449004>

- Andresen, H. 2001. Mastitis: prevención y control. Revista de investigaciones veterinarias del Perú, 12 (2): 55-64. <https://doi.org/10.15381/rivep.v12i2.1634>
- Aragão, B. B., Trajano, S. C., da Silva, R. A., e Silva, B. P., de Moraes, P. R. & Mota, R. A. 2021. Occurrence of Multi-Resistant *Staphylococcus aureus* in Artisan Goat Coalho Cheese in Northeastern Brasil. Acta Scientiae Veterinariae, 49 (1835): 1-8. <https://seer.ufrgs.br/ActaScientiaeVeterinariae>
- Arcuri, E. F., Angelo, F. F., Guimaraes, M. F. M., Talon, R., de Fatima Borges, M., Leroy, S. & Montet, D. 2010. Toxigenic status of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk and Minas frescal cheese in Brazil. Journal of food protection, 73 (12): 2225-2231.
- Argudín, M. Á., Mendoza, M. C. & Rodicio, M. R. 2010. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Toxins (Basel), 2 (7): 1751-73. <https://doi.org/10.3390/toxins2071751>
- Arrazola-Guendulay, A. A., Hernández-Santiago, E., & Rodríguez-Ortiz, G. 2018. Conocimiento tradicional de plantas silvestres en una comunidad de los valles centrales de Oaxaca. Revista Mexicana de Agroecosistemas, 5 (1): 55-78. <https://rmae.voaxaca.tecnm.mx/articulos-volumen-5-n-1/>
- Arteaga, B. R. & Arteaga, M. R. 2005. Infecciones estafilocócicas. Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría, 44 (3): 178-180. Consultado 25 de mayo de 2022. [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1024-06752005000300010&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1024-06752005000300010&lng=es&tlng=es)
- Association of Analytical Communities (AOAC). 2003. Official Method 2003.06 Crude Fat in Feeds, Cereal Grains, and Forages. Journal of AOAC international, 86: 888-898. [https://www.researchgate.net/publication/8996369\\_Crude\\_fat\\_hexanes\\_extraction\\_in\\_feed\\_cereal\\_grain\\_and\\_forage\\_RandallSoxtecSubmersion\\_method\\_Collaborative\\_study](https://www.researchgate.net/publication/8996369_Crude_fat_hexanes_extraction_in_feed_cereal_grain_and_forage_RandallSoxtecSubmersion_method_Collaborative_study)
- Ávila, P. H., García, I. S. & Rosas-Acevedo, J. L. 2015. Análisis de Componentes Principales, como herramienta para interrelaciones entre variables fisicoquímicas y biológicas en un ecosistema léntico de Guerrero, México. Revista Iberoamericana de Ciencias, 2 (3): 43-53. <http://ri.uagro.mx/handle/uagro/1074>
- Ballesta, R. I. 2014. Evaluación de la Calidad del Queso Costeño Elaborado con Diferentes Tipos de Cuajo (Animal y Microbiano) y la Adición o no de Cultivos

- Lácticos (*Lactococcus Lactis* Subps. *Lactis* y *Lactococcus Lactis* Subps. *Cremoris*). Tesis de maestría. Universidad Nacional De Colombia, Medellín, Columbia. <https://www.researchgate.net/publication/343442719>
- Bonilla, S., Christian, A., Gurdián, C., & Cristhian., E. 2011. Evaluación de dos temperaturas de ahumado y empaque en atmósferas modificadas en las propiedades físico-químicas y sensoriales del queso Cheddar. Tesis de Licenciatura. Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana. <https://bdigital.zamorano.edu/items/5d514fe2-992b-4d7c-b753-c7a0090667b5/full>
- Borraz, O. M. C. 2006. Epidemiología de la resistencia a meticilina en cepas de "*Staphylococcus aureus*" aisladas en hospitales españoles. Barcelona. Tesis de doctorado. Universidad de Barcelona. Barcelona, España. <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/42524>
- Boscarol, M. 2007. "El espacio de color L\*C\*h". Imagen digital. Consultado 08 de marzo de 2022. [http://www.gusgsm.com/el\\_espacio\\_de\\_color\\_lch#:~:text=El%20valor%20de%20h%20es,grados%20multiplic%C3%A1ndolo%20por%20180%2F%CF%80%20](http://www.gusgsm.com/el_espacio_de_color_lch#:~:text=El%20valor%20de%20h%20es,grados%20multiplic%C3%A1ndolo%20por%20180%2F%CF%80%20)
- Cai, H., Kou, X., Ji, H., Wang, X., Wang, H., Zhang, Y. & Hu, D. 2021. Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from Kazak cheese in Xinjiang, China. Food Control, 123 (1): 107759. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107759>
- Calidad para quesos procesados. Dirección general de normas". Secretaria de comercio fomento industrial. Norma Mexicana NMX-F-092-1970. Diario Oficial de la Federación. Consultado 02 de septiembre de 2021. <https://docplayer.es/20869118-Nmx-f-092-1970-calidad-para-quesos-procesados-normas-mexicanas-direccion-general-de-normas.html>
- Camussone, C. M., & Calvino, L. F. 2013. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos. Revista argentina de microbiología, 45 (2): 119-130. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(13\)70011-7](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(13)70011-7)
- Can, H. Y. & Celik, T. H. 2012. Detection of enterotoxigenic and antimicrobial resistant *S. aureus* in Turkish cheeses. Food Control, 24 (1/2): 100-103. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.009>

- Cardona-Serrate, F. 2019. Actividad del agua en alimentos: concepto, medida y aplicaciones. Universidad Politécnica de Valencia. Consultado 05 de enero de 2021. <http://hdl.handle.net/10251/121948>.
- Castañeda, V.H., Jäger, S., Wolter, W., Zschöck, M., Castañeda, V. M. A. & El-Sayed, A. 2013. Isolation and identification of main mastitis pathogens in Mexico. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 65: 377-382. <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/zf7V9sF6HjYtw8L3bjc95xH/?lang=en>
- Castañón-Sánchez, C. A. 2012. Patogenia molecular de *Staphylococcus aureus*. *Evidencia Médica e Investigación en Salud*, 5 (3): 79-84. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=38197>
- Castellano, G. M. J. & Perozo-Mena, A. J. 2010. Mecanismos de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en *Staphylococcus aureus*. *Kasmera*, 38 (1): 18-35. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0075-52222010000100003](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222010000100003)
- Castellano, G. M. J. Cavazza, P. M. E. & Perozo, M. A. J. 2014. Tipo de cassette cromosómico estafilocócico en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina. *Kasmera*, 42 (2): 116-130. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0075-52222014000200004#:~:text=Staphylococcus%20aureus%20resistente%20a%20meticilina%20\(SAMR\)%20es%20un%20pat%C3%B3geno%20importante.\(SCCmec\)%20\(1\)](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222014000200004#:~:text=Staphylococcus%20aureus%20resistente%20a%20meticilina%20(SAMR)%20es%20un%20pat%C3%B3geno%20importante.(SCCmec)%20(1))
- Castro, A., Silva, J., & Teixeira, P. 2018. *Staphylococcus aureus*, a food pathogen: Virulence factors and antibiotic resistance. In *Foodborne Diseases*. Academic Press, 8: 213-238. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811444-5.00008-7>
- Cavalcante F, Schuenck R, Caboclo R, Ferreira D de C, Nouér S, Dos Santos K. 2013. Tetracycline and trimethoprim/sulfamethoxazole at clinical laboratory: can they help to characterize *Staphylococcus aureus* carrying different SCCmec types?. *Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46 (1):100-102. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-868216062013>
- Caycedo, L. L., Ramírez, L. C. C. & Suárez, D. M. T. 2021. Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *Nova*, 19 (36): 49-94. <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/1770>

- Cervantes, E. F., Villegas, D. G. A., Cesín, V. A. & Espinosa, O. A. 2018. Los quesos mexicanos genuinos. 2ª edición. Editorial Biblioteca Básica de Agricultura. Estado de México. <https://www.researchgate.net/publication/322626141>
- Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. 2014. Características generales del *Staphylococcus aureus*. Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio, 61 (1): 28-40. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=48300>
- Chacón-Villalobos, A. & Pineda-Castro M. L. 2009. Características químicas, físicas y sensoriales de un queso de cabra adaptado del tipo "Crottin de Chavignol". Agronomía Mesoamericana, 20 (2):297-309. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43713059010>
- Agudelo, C. J., Valencia, J. U. S., & Molina, D. A. R. 2015. Efecto de la Adición de dos Tipos de Almidones en las Propiedades Texturales de Queso Análogo. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 68 (1): 7545-7555. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v68n1.47843>
- Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C. & Comi, G. 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. Applied and Environmental Microbiology, 67 (11): 5113-5121. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.5113-5121.2001>
- Codex Standard (CODEX-STAN). 2013. Norma General del Codex para el Queso. Codex Standard 283-1978. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y Organización de las Naciones Unidas. Consultado 03 de diciembre de 2020. <http://www.fao.org/docrep/015/i2085s/i2085s00.pdf>
- Commission Internationale pour l'Eclairage (CIE). 1976. Colorimétrie - Partie 4: Espace chromatique L\*a\*b\*CIE 1976. Standard colorimetric systems international, Vienna, Austria. Consultado 20 de enero de 2022. <http://cie.co.at/>
- Cremonesi, P., Luzzana, M., Brasca, M., Morandi, S., Lodi, R., Vimercati, C., Agnellini, D., Caramenti, G., Moroni, P. & Castiglioni, B. 2005. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. Molecular and Cellular Probes, 19 (5): 299-305. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2005.03.002>

- da Silva, A.C., Rodrigues, M.X. & Silva, N.C.C. 2020. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en alimentos y prevalencia en Brasil: una revisión. Braz J Microbiol, 51: 347-356. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00168-1>
- de la Haba-Ruiz, M. A. 2017. Caracterización fisicoquímica y sensorial de los quesos artesanos andaluces. Tesis de doctorado. Universidad de Córdoba. España. <https://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/15085>
- Diario Oficial de la Federación. NMX-F-374-1983. Alimentos. Almidón. Determinación cualitativa (prueba del Lugol). Método de prueba. Consultado 02 de septiembre de 2021. [https://nanopdf.com/download/nmx-f-374-1983-alimentos-almidon-determinacion-cualitativa\\_pdf](https://nanopdf.com/download/nmx-f-374-1983-alimentos-almidon-determinacion-cualitativa_pdf)
- Díaz, G. E. P. 2016. Detección de *Staphylococcus aureus* ORSA/MRSA en quesos frescos artesanales comercializados en mercados populares en el valle de Toluca. Tesis de maestría. Universidad Autónoma del Estado de México. Estado de México, México. <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/58793>
- Dufour, S., Dohoo, I. R., Barkema, H. W., DesCôteaux, L., Devries, T. J., Reyher, K. K., & Scholl, D. T. 2012. Manageable risk factors associated with the lactational incidence, elimination, and prevalence of *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. Journal of Dairy Science, 95 (3): 1283-1300. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4711>
- El-Sayed, A., Alber, J., Lämmle, C., Jäger, S., Wolter, W. & Castañeda-Vázquez, H. 2006. Estudio comparativo de las características genotípicas de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de casos de mastitis clínica y subclínica en México. Veterinaria México, 37 (2): 165-179. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=8854>
- Evenson, M. L., Hinds, M. W., Bernstein, R. S. & Bergdoll, M. S. 1988. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. Int. J. Food. Microbiol, 7: 311-316. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(88\)90057-8](https://doi.org/10.1016/0168-1605(88)90057-8)
- Farahmand, A. S., Ahmadi, M., Dastmalchi, S. H. & Anassori, E. 2013. Identification of Toxic Shock Syndrome Toxin-1 (tsst-1) gene in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis milk, Archives of Razi Institute, 68 (1):17-22. [https://archrazi.areeo.ac.ir/article\\_103906.html](https://archrazi.areeo.ac.ir/article_103906.html)

- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M. & McSweeney, P. L. 2000. Fundamentals of Cheese science. Editorial Springer-Verlang. Nueva York, Estados Unidos. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4899-7681-9>
- Frazier & Westhoff. 2000. Microbiología de los Alimentos, Editorial Acribia, Zaragoza España. <https://iselavictoria06wordpress.files.wordpress.com/2019/04/l33.pdf>
- Gacto, F. M. 2014. Bacterias de electricidad. Academia de Ciencias de la Región de Murcia. España. <https://www.um.es/acc/bacterias-y-electricidad/>
- Gamboa-Alvarado, J. G., Almaraz, R. D. & Ramírez-Rivera, E. J. 2012. Calidad Físicoquímica y sensorial de queso tipo Manchego durante la maduración. Revista Científica UDO Agrícola, 12 (4): 929-938. <http://www.bioline.org.br/pdf?cg12106>
- García-Islas. B. 2006. Caracterización físico-química de diversos tipos de quesos elaborados en el valle de Tulancingo Hidalgo con el fin de proponer normas de calidad. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Tulancingo, Hidalgo. <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/handle/231104/506>
- Ghasemi, P. & Mahdavi, S. 2018. Study of Prevalence of Toxic Shock Syndrome Toxin (TSST-1) and Methicillin Resistance (MecA) Genes of *Staphylococcus aureus* Isolates from Local Cheese in Northwest of Iran. Gene, Cell and Tissue, 5 (4): 1-5.
- Gnanamani, A., Hariharan, P. & Paul-Satyaseela, M. 2017. *Staphylococcus aureus*: Overview of bacteriology, clinical diseases, epidemiology, antibiotic resistance and therapeutic approach. Frontiers in *Staphylococcus aureus*, 4: 28. <https://brieflands.com/articles/gct-82372.html>
- González, A. G. M., Marques, L. M. P., Gomes, M. D. S. A., Beltrão, J. C. D. C., Pinheiro, M. G., Esper, L. M. R. & Aguiar-Alves, F. 2017. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in minas frescal cheese: evaluation of classic enterotoxin genes, antimicrobial resistance and clonal diversity. FEMS Microbiol Lett. 364(23): fnx232 <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx232>
- González, E. P. 2010. Caracterización de la composición físicoquímica del queso fresco elaborado artesanalmente en Sehuilaca, municipio de Minatitlán, Veracruz. Undergraduate, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana, Tesis de doctorado. Veracruz, México. <https://www.researchgate.net/publication/279441134> Caracterizacion de la composicion f

[isico quimica del queso fresco elaborado artesanalmente en Sehualaca municipio de Minatitlan Veracruz](#)

- González-Montiel, L. & Franco-Fernández, M. J. 2015. Perfil microbiológico del queso de aro consumido en la Cañada Oaxaqueña. *Brazilian Journal of Food Technology*, 18 (3): 250-257. <https://www.scielo.br/j/bjft/a/jLGgkMhFgD3MxS8BVRybM5K/?lang=es#:~:text=El%20queso%20de%20Aro%20que,y%20algunos%20de%20importancia%20industrial>
- Gorwitz, R. J., Kruszon-Moran, D., McAllister, S. K., McQuillan, G., McDougal, L. K., Fosheim, G. E., & Kuehnert, M. J. 2008. Changes in the Prevalence of Nasal Colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001–2004, *The Journal of Infectious Diseases*, 197(9): 1226-1234. <https://doi.org/10.1086/533494> .
- Grumann, D., Nübel, U., y Bröker, B. M. 2014. *Staphylococcus aureus* toxins—their functions and genetics. *Infection, Genetics and Evolution*, 21: 583-592. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.013>
- Gutiérrez-Oropeza, Y. 2009. Caracterización fisicoquímica, sensorial e inocuidad de quesos análogos asaderos producidos en Jesús María y Pabellón de Arteaga del Estado de Aguascalientes. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México. <http://bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/handle/11317/573>
- Guzmán-Hernández, R. L., Hernández-Vélez, R. M., Morales-Estrada, A. I., Fernández-Rendón, E., López-Merino, A. & Contreras-Rodríguez, A. 2016. Aislamiento e identificación de *Brucella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus* en quesos frescos no pasteurizados de una zona tropical del golfo. *Revista Científica de Veterinaria*, 26 (5): 324-331. <https://www.researchgate.net/publication/313821033>
- Hanssen, A. M. & Ericson, S. J. U. 2006. SCC*mec* in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 46 (1): 8-20. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2005.00009.x>
- Hennekinne, J. A., De Buyser, M. L. & Dragacci, S. 2012. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS microbiology reviews*, 36 (4): 815-836. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x>

- Herrera, F. & Santos, J. 2015a. Presencia de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes en queso doble crema artesanal. Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica, 18 (1): 29-37. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-42262015000100005&script=sci\\_abstract&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-42262015000100005&script=sci_abstract&tlng=es)
- Herrera, F. & Santos, J. 2015b. Genes enterotoxigénicos en cepas de *Staphylococcus spp.*, aisladas de queso elaborado en Pamplona-Colombia. Revista MVZ Córdoba, 20 (1): 4472-4481. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-02682015000100010&script=sci\\_abstract&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-02682015000100010&script=sci_abstract&tlng=es)
- Herrera, F. A., & Santos, J. B. 2015c. Perfiles de PCR-RFLP en *Staphylococcus aureus* Meticilina-resistentes aislados a partir de queso fresco artesanal. Ciencia y Tecnología Alimentaria, 13 (2): 145-153. [https://revistas.unipamplona.edu.co/ojs\\_viceinves/index.php/ALIMEN/article/view/1885](https://revistas.unipamplona.edu.co/ojs_viceinves/index.php/ALIMEN/article/view/1885)
- Herrera, F., García-López, M. L. & Santos, J. A. 2016. Short communication: Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk fresh cheese in Colombia, Journal of Dairy Science, 99 (10): 7872-7876. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11322>
- Holmberg, S. D. & Blake, P. A. 1984. Staphylococcal food poisoning in the United States. New facts and old misconceptions. JAMA, 251: 487-489. <https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/391167>
- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). 2020. Catálogo de localidades. Consultado 05 de enero de 2021. <https://www.inegi.org.mx/sistemas/scitel/consultas/index>
- Institute of Medicine (US). 1997. Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. In Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride. National Academies Press. Washington, Estados Unidos. <https://nap.nationalacademies.org/catalog/5776/dietary-reference-intakes-for-calcium-phosphorus-magnesium-vitamin-d-and-fluoride>
- Islas, A. R. M. 2010. Proceso de elaboración de queso análogo, propiedades, ventajas y desventajas, así como la función de los ingredientes utilizados. Memoria de trabajo. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Coahuila, México. <https://es.scribd.com/document/339674706/61069s>

- Ito, T., Katayama, Y. & Hiramatsu, K. 1999. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43 (6): 1449-1458. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.6.1449>
- Kato, T., Frei, B., Heinrich, M. & Sticher, O. 1996. Antibacterial hydroperoxysterols from *Xanthosoma robustum*. *Phytochemistry*, 41 (4): 1191-1195. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00765-2](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00765-2)
- Komatsu, R. S., Rodrigues, M. A. M., Loreno, W. B. N. & Santos, K. A. 2010. Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo minas frescal produzido em Uberlândia-MG. *Bioscience Journal*, 26 (2):316-321. <https://seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/7159>.
- Kümmel J, Stessl B, Gonano M, Walcher G, Bereuter O, Fricker M, Grunert T, Wagner M, Ehling-Schulz M. 2016. *Staphylococcus aureus* Entrance into the Dairy Chain: Tracking *S. aureus* from Dairy Cow to Cheese. *Front Microbiol.* 7:1603. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01603>
- Leonti, M. Heike Vibrans, Otto Sticher, Michael Heinrich. 2001. Ethnopharmacology of the Popoluca, Mexico: an evaluation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53 (12): 1653-1669. <https://doi.org/10.1211/0022357011778052>
- Licata, M. 2009. “Los quesos. Composición, elaboración y propiedades nutricionales”. Zonadiet.com. Consultado 10 de marzo de 2021. <https://goo.gl/9Mea5>
- Liu, J., Dingqiang C., Brian M., Peters, Lin, L., Bing, L., Zhenbo, X., Mark E. & Shirliff. 2016. Staphylococcal chromosomal cassettes *mec* (SCC*mec*): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Microbial Pathogenesis*, 101: 56-67. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.10.028>
- López, C. S. 2003. Mejoremos nuestro quesillo. Tecnología alimentaria. Procesamiento de la leche productos lácteos. Quesillo. Editorial ITDG. Lima, Perú, 27 pp. [http://redmujeres.org/wp-content/uploads/2019/01/mejoremos\\_quesillo.pdf](http://redmujeres.org/wp-content/uploads/2019/01/mejoremos_quesillo.pdf)
- López, R., Hernández-Montes, A., Villegas, d. G. A. & Santos-Moreno, A. 2015. Caracterización socio técnica del queso Bola de Ocosingo, Chiapas. Ecorfan®, 2 (2): 345-353. <https://docplayer.es/34213356-Caracterizacion-socio-tecnica-del-queso-bola-de-ocosingo-chiapas.html>

- López-Guzmán, I. K. 2010. Propiedades fisicoquímicas, texturales y sensoriales del queso elaborado en el municipio de Vega de Alatorre, Ver., y su relación con algunas características del queso de La Joya, Ver. Tesis de maestría. Universidad Veracruzana. Xalapa-Enriquez, Veracruz.  
<https://cdigital.uv.mx/handle/123456789/46793>
- López-Sánchez, M. W. 2015. Cinética del deterioro fisicoquímico del queso mantecoso. Universidad Nacional de Trujillo. Tesis de licenciatura. Trujillo. Perú.  
<http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/4295>
- López-Vázquez, M., Martínez-Castañeda, J. S., Talavera-Rojas, M., Valdez-Alarcón, J. J. & Velázquez-Ordóñez, V. 2015. Detección de los genes *mecA*, *mecR1* y *mecI* en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina de origen bovino aisladas en unidades de producción lechera familiar. Archivos de Medicina Veterinaria, 47: 245-249. <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2015000200018>
- Ma, X. X., Ito, T., Tiensasitorn, C., Jamklang, M., Chongtrakool, P., Boyle-Vavra, S., & Hiramatsu, K. 2002. Novel Type of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Identified in Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46 (4): 1147-1152.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.46.4.1147-1152.2002>
- Maldonado, R. & Llanca, L. 2008. Estudio de la calidad del queso de mano comercializado en el Municipio Girardot, Estado Aragua, Venezuela. Revista Científica, 18 (4): 431-436. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95918414>
- Manjarrez, A. M. S., Díaz, Z. F., Salazar, G. B., Valladares, C. A., Gutiérrez, C. A., Barbabosa, P. M., Talavera, R. M., Alonso, F. U. & Velázquez, O. V. 2012. Identificación de biotipos de *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras de producción familiar con mastitis subclínica en la región centro-este del Estado de México. Revista Mexicana Ciencias Pecuarias, 3 (2): 265-274.  
[https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-11242012000200008](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242012000200008)
- Márquez, M. L. F., Burgos, M. J. G., Aguayo, M. C. L., Pulido, R. P., Gálvez, A., & Lucas, R. 2017. Characterization of biocide-tolerant bacteria isolated from cheese and dairy small-medium enterprises. Food Microbiology, 62: 77-81.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.008>

- Mehrotra, M., Wang, G. & Johnson., W. M. 2000. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (3): 1032-1035.
- Miranda Novales G. M. 2011. Resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* en México. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 68 (4): 262-270. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1665-11462011000400003](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462011000400003)
- Molinos, J. 1981. Análisis de queso de cabra. Tesis de licenciatura. Universidad Católica de Chile. Chile. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.3.1032-1035.2000>
- Mullarky, I. K., Su, C., Frieze, N., Park, Y. H. & Sordillo, L. M. 2001. *Staphylococcus aureus* agr Genotypes with Enterotoxin Production Capabilities Can Resist Neutrophil Bactericidal Activity. *Infection and Immunity*, 69 (1): 45-51. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC97853/>
- Muñoz, Z. R. 2000. Diccionario enciclopédico de gastronomía mexicana. Editorial Larousse S.A de C.V. México.
- Ortiz, R., Gutiérrez, R., Vega, S., Díaz, G. & Schettino, B. 2008. Contaminación de los alimentos. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. *Revista ReCITeLA*. 8 (1): 3-24. <https://revistareciteia.es.tl/v-.6-n.-1-a--v.-9-n.-2.htm>
- Pascual, D. B. 2015. Líneas genéticas, virulencia y resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus* de diferentes orígenes: Análisis de marcadores de adaptación al huésped y comportamiento en *Caenorhabditis elegans*. Tesis de doctorado. Universidad de La Rioja. Logroño, España. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=46745>
- Procuraduría General del Consumidor (PROFECO). 2016. Calidad de quesos. Dirección de Investigaciones Químico-Biológicas, Coordinación General de Investigación. Consultado 20 de junio de 2021. [http://www.profeco.gob.mx/revista/pdf/est\\_00/quesos.pdf](http://www.profeco.gob.mx/revista/pdf/est_00/quesos.pdf)
- Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba”. Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010. Diario Oficial de la Federación. Consultado 14 de enero de 2021. [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5160755&fecha=27/09/2010](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5160755&fecha=27/09/2010)

- Puerto, P. P., Baquero, M. F., Romero, C. D. & Martín, J. D. 2003. Caracterización físico-química de quesos frescos elaborados con leche de cabra en la isla de Tenerife. *Cyta-journal of food*, 4 (2): 103-108. <https://doi.org/10.1080/11358120309487750>
- Queiroga, R. C. R. E., Santos, B. M., Gomes, A. M. P., Monteiro, M. J., Teixeira, S. M., Souza, E. L., Pereira, C. J. D. & Pintado M. M. E. 2013. Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture. *LWT - Food Science and Technology*, 50: 538-544. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.08.011>
- Quispe-Ramos, C. 2019. Efecto de los cuajos naturales sobre el rendimiento, consistencia y color en la elaboración del queso fresco. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional José María Arguedas. Apurímac, Perú. <https://repositorio.unajma.edu.pe/handle/20.500.14168/528>
- R Core Team. 2022. R: A language and environment for statistical computing. R. Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Rahimi, E. & Safai, H. G. 2010. Detection of classical enterotoxins of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Isfahan, Iran. *Veterinary Microbiology*, 141 (3/4): 393-394. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.023>
- Rahmaniar, R. P., Yunita, M. N., Effendi, M. H. & Yanestria, S. M. 2020. Encoding gene for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from nasal swab of dogs. *Indian Veterinary Journal*, 97 (2): 37-40. [https://www.researchgate.net/publication/339998373\\_Encoding\\_Gene\\_for\\_Methicillin\\_Resistant\\_Staphylococcus\\_aureus\\_MRSA\\_Isolated\\_from\\_Nasal\\_Swab\\_of\\_Dogs](https://www.researchgate.net/publication/339998373_Encoding_Gene_for_Methicillin_Resistant_Staphylococcus_aureus_MRSA_Isolated_from_Nasal_Swab_of_Dogs)
- Raisman, J. & Gonzalez, A. M. 2000. Nutrición bacteriana. Hipertextos del Área de la Biología. Consultado 20 de marzo de 2022. <http://www.biologia.edu.ar/bacterias/nutric%7E2.htm>
- Ramírez-López, C. & Vélez-Ruiz, J. F. 2012. Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6 (2): 131-148. <https://www.researchgate.net/publication/303959697>
- Ramírez-Navas, J. S. 2010. Espectrocolorimetría: caracterización de leche y quesos. *Tecnología Láctea Latinoamericana*, 61: 52-58. <https://www.researchgate.net/publication/257890462>

- Ramírez-Navas, J. S., Aguirre-Londoño, J., Aristizabal-Ferreira, V. A. & Castro-Narváez, S. 2017. La sal en el queso: diversas interacciones. *Agronomía Mesoamericana*, 28 (1): 303-316. <http://dx.doi.org/10.15517/am.v28i1.21909>
- Ramos, B. G., Nichorzon, M. R. & Silva, R. A. 2020. Calidad bacteriológica de la leche en sistemas de ordeño en el municipio Maturín, Monagas, Venezuela. *Revista Espamciencia*, 11 (2): 68-74. <https://www.researchgate.net/publication/350029077>
- Rizek, C. F., Matté, M. H., Dropa, M., Mamizuka, E. M., de Almeida, L. M., Lincopan, N. & Germano, P. M. L. 2011. Identification of *Staphylococcus aureus* carrying the *mecA* gene in ready-to-eat food products sold in Brazil. *Foodborne Pathog Disease*. 8(4): 561-563. <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0706>
- Rodríguez, J. 2009. Efecto de la variación de acidez y temperatura sobre el rendimiento y calidad de queso tipo panela y chihuahua. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México.
- Romero-Castillo, E. A., Leyva, G., Cruz-Castillo, J. G. & Santos-Moreno, A. 2009. Evaluación de la calidad sanitaria de quesos crema tropical mexicano de la región de Tonalá, Chiapas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 8 (1): 111-119. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1665-27382009000100011#:~:text=Los%20quesos%20no%20cumplieron%20con,n%C3%BAmero%20de%20bacterias%20coliformes%20fecales](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382009000100011#:~:text=Los%20quesos%20no%20cumplieron%20con,n%C3%BAmero%20de%20bacterias%20coliformes%20fecales)
- Rosado-Zarrabal, T. L., Corto-González, H., Morales-Fernández, S. D., Velázquez-Méndez, A. M. & Wong-Villarreal, A. 2013. Caracterización fisicoquímica de quesos étnicos del estado de Chiapas. *Ciencia UAT*, 8 (1): 6-10. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8217785>
- Salguero-Cevallos, C. E. 2016. Efecto del ahumado sobre la vida útil y la calidad sensorial del queso fresco. Tesis de licenciatura. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Chimborazo, Ecuador. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/5717#:~:text=El%20an%C3%A1lisis%20sensorial%20no%20present%C3%B3,consumido%20ampliamente%20en%20el%20pa%C3%ADs>
- Salto, S. J. V., Márquez, B. Y. J., López, A. A. I., Martínez, A. J. & Guerrero, P. D. G. 2018. La implementación de procedimientos estandarizados en la prevención de enfermedades transmitidas por los alimentos. Conteo microbiológico del

- Staphylococcus aureus* en quesos frescos. Revista Médica Electrónica, 40 (2): 371-382. <http://www.revmedicaelectronica.sld.cu/index.php/rme/article/view/2729>
- Sánchez, M., Orville, H., Astrid V. L., Rivas, D., Marín, A., González, L. A. & Duque, C. 2013. Caracterización del gen *mecA* de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina aislados de tres grupos poblacionales de la ciudad de Medellín. Infectio, 17 (12): 66-72. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-93922013000200004](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922013000200004)
- Sánchez-Estrada, M. & Sánchez-Estrada, K. 2020. Revalorización de un queso fresco artesanal del municipio de Villa Victoria, Estado de México. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México. <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/109471>
- Sánchez-Valdés, J. J., Colín-Navarro, V., López-González, F., Avilés-Nova, F., Castelán-Ortega, O. A. & Estrada-Flores, J. G. 2016. Diagnóstico de la calidad sanitaria en las queserías artesanales del municipio de Zacazonapan, Estado de México. Salud Pública de México, 58: 461-467. <https://doi.org/10.21149/spm.v58i4.8027>
- Schinitman, N. I. 2005. Alimentos: Prevención de su contaminación. Consultado 10 de diciembre 2021. [https://www.ecoportat.net/salud/alimentos\\_prevencion\\_de\\_su\\_contaminacion/](https://www.ecoportat.net/salud/alimentos_prevencion_de_su_contaminacion/)
- Serrano-Altamirano, V., Silva, M. A., Cano, G., Medina, G., Medina, G. & Ruiz, C. A. 2005. Estadística climatológica básica del estado de Oaxaca. Instituto nacional de investigación forestales agrícola y secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. Libro técnico 4. Oaxaca, México. 272 pp. <http://www.inifapcirne.gob.mx/Biblioteca/Publicaciones/49.pdf>
- Shanebandi, D., Baradaran, B., Sadigh-Eteghad, S. & Zarredar, H. 2014. Occurrence of methicillin resistant and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in traditional cheeses in the North West of Iran. International Scholarly Research Notices, 2014 (2): 129580. <https://doi.org/10.1155/2014/129580>
- Shankar, N., Soe, P. M. & Tam, C. C. 2020. Prevalence and risk of acquisition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among households: A systematic review. International Journal of Infectious Diseases, 92: 105-113. <https://doi.org/10.1155/2014/129580>

- Soles, R. & Oswaldo, L. 2014. Características bromatológicas del queso fresco comercializado en los mercados del distrito de Trujillo, marzo-abril del 2014. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo Perú.  
<https://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/1603>
- Talledo-Castillo, L. M. 2020. Evaluación de la calidad y rendimiento del queso fresco elaborado con leche de vaca utilizando dos tipos de cuajo: natural y artificial. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional de Piura. Piura, Perú.  
<https://repositorio.unp.edu.pe/handle/20.500.12676/2457>
- Tenhagen, B., Alt, K., Pfefferkorn, B., Wiehle, L., K€ asbohrer, A. & Fetsch, A. 2018. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in conventional and organic dairy herds in Germany. Journal of Dairy Science, 101: 3380-3386.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2017-12939>
- Tigselema-Ortega, W. A. 2012. Bases para el diseño del sistema de análisis de riesgos y puntos críticos de control para leche de calidad en un ordeño manual. Tesis de licenciatura, Universidad Técnica de Cotopaxi. Cotopaxi, Ecuador.  
<http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/673>
- Toribio-Jiménez, J., Romero, R. Y., Rodríguez, B. M. Á., Cadena, G. E. & Ruvalcaba, L. J. C. 2016. *Staphylococcus aureus* MRSA-biofilms positive isolated from artisanal cheese in Guerrero. Ciência y Técnica Vitivinícola, 31 (2): 101-112.  
<http://ri.uagro.mx/handle/uagro/851>
- Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED). 2022. Guía de Alimentación y Salud. Alimentación durante la adolescencia. Necesidades de nutrientes: Minerales. Consultado 20 de marzo de 2022. [https://www2.uned.es/pea-nutricion-y-dietetica-I/guia/etapas/adolescencia/neces\\_minerales.htm](https://www2.uned.es/pea-nutricion-y-dietetica-I/guia/etapas/adolescencia/neces_minerales.htm)
- Valero-Leal, K., Rivera-Salazar, J., Valbuena, E., Boscán, L., Valeris, R., Castrota, G. & Briñez, W. 2012. Caracterización bioquímica y producción de enterotoxinas de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche cruda y queso fresco artesanal en fincas del estado Zulia. Revista Científica, 22 (4): 303-314.  
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95922874002>
- Vanegas, M., González, L., Martínez, A. & Buitrago, F. 2008. Aislamiento y caracterización de cepas de *Staphylococcus* enterotoxigénicos aislados de quesos en Bogotá. Revista MVZ Córdoba, 13 (2): 1288-1293.

[http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-02682008000200003&script=sci\\_abstract&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-02682008000200003&script=sci_abstract&tlng=es)

- Van-Hekken, D. L. & Farkye, N. 2003. Hispanic Cheeses: The quest for cheese. Food Technology Chicago, 57: 32-38. [https://www.ift.org/news-and-publications/food-technology-magazine/issues/2003/january/features/developing-foods\\_hispanic-cheeses-the-quest-for-queso](https://www.ift.org/news-and-publications/food-technology-magazine/issues/2003/january/features/developing-foods_hispanic-cheeses-the-quest-for-queso)
- Vargas-Uscategui, R., Arenas-Clavijo, A. & Ramírez-Navas, J. S. 2017. Efecto del proceso de acidificación sobre el color de queso cottage. Agronomía Mesoamericana, 28 (3): 677-690. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15517/ma.v28i3.22876>
- Velasco, A. S. 2004. Evaluación de la Calidad Microbiológica del Queso Mozzarella Utilizando Diferentes Niveles de Leche Descremada sin Pasteurizar. Tesis de licenciatura. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Chimborazo, Ecuador. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/884>
- Vilgis, T. A. 2015. Soft matter food physics--the physics of food and cooking. Reports on Progress in Physics, 78 (12): 124602. [https://www.researchgate.net/publication/283500188\\_Soft\\_matter\\_food\\_physics\\_-\\_The\\_physics\\_of\\_food\\_and\\_cooking](https://www.researchgate.net/publication/283500188_Soft_matter_food_physics_-_The_physics_of_food_and_cooking)
- Villegas, G. A. 2004. Tecnología quesera, Primera Edición, Editorial Universidad Autónoma de Chapingo. 45-48 pp.
- Villegas, G. A., Escoto, C. F., Cesin, V. A., Espinoza, O. A., Hernandez, M. A., Santos, M. A. & Martínez, C. A. R. 2014. Atlas de los quesos mexicanos genuinos, 5(637). [https://www.researchgate.net/profile/Fernando-Cervantes-Escoto/publication/314205827\\_Atlas\\_de\\_los\\_Quesos\\_Mexicanos\\_Genuinos/links/58b9960faca27261e51f532f/Atlas-de-los-Quesos-Mexicanos-Genuinos.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Fernando-Cervantes-Escoto/publication/314205827_Atlas_de_los_Quesos_Mexicanos_Genuinos/links/58b9960faca27261e51f532f/Atlas-de-los-Quesos-Mexicanos-Genuinos.pdf)
- Villegas, G. A., Moreno, A. S. & Escoto, F. C. 2016. Los quesos mexicanos tradicionales. Universidad Autónoma Chapingo. México. 195 pp. [https://www.researchgate.net/profile/Fernando-Cervantes-Escoto/publication/314206970\\_Los\\_quesos\\_mexicanos\\_tradicionales/links/58b9a9e792851c471d4e13ea/Los-quesos-mexicanos-tradicionales.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Fernando-Cervantes-Escoto/publication/314206970_Los_quesos_mexicanos_tradicionales/links/58b9a9e792851c471d4e13ea/Los-quesos-mexicanos-tradicionales.pdf)
- Villegas-Soto, N. R., Díaz-Abreu, J. A. & Hernández-Monzón, A. 2017. Evaluación de la eficiencia tecnológica en la elaboración artesanal de queso fresco de coagulación

enzimática. Tecnología Química, 37 (3): 380-391.  
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445552858002>

- Von-Atzingen, M. C. & Machado-Pinto, e S. M. E. 2005. Evaluación de la textura y color de almidones y harinas en preparaciones sin gluten. *Journal of Food*, 4 (5): 319-323. <https://doi.org/10.1080/11358120509487658>
- Waage, S. T., Mørk, A., Røros, D., Aasland, A., Hunshamar, S. A. & Odegaard. 1999. Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, 82 (4): 712-719. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10212457/>
- Weese, J.S. & Van, D. E. 2010. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Staphylococcus pseudintermedius in veterinary medicine*. *Veterinary Microbiology*, 140 (3-4): 418-429. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.01.039>
- Xu, J., Tan, X., Zhang, X., Xia, X. & Sun, H. 2015. The diversities of staphylococcal species, virulence and antibiotic resistance genes in the subclinical mastitis milk from a single Chinese cow herd. *Microbial Pathogenesis*, 88: 29-38. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.08.004>
- Yugcha, P. S. P. 2016. Determinación de la presencia de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes y multiresistentes aislados en quesos frescos artesanales elaborados en zonas rurales de Riobamba. Tesis. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Chimborazo, Ecuador.  
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/4983>
- Zendejas-Manzo, G. S., Avalos-Flores, H. & Soto-Padilla, M. Y. 2014. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica*, 25 (3): 129-143. <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v25i3.42>
- Zschöck, M., Botzler, D., Blöcher, S., Sommerhäuser, J. & Hamann, H. P. 2000. Detection of genes for enterotoxins (ent) and toxic shock syndrome toxin-1 (tst) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase-chain-reaction. *International Dairy Journal*, 10 (8): 569-574. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00084-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00084-4)

Anexo 1  
 Cuestionario para ventas de queso tipo fresco  
 Mercado Benito Juárez, Colonia Centro,  
 Mpio de San Pedro Mixtepec, Distr. Juquila  
 Puerto Escondido, Oaxaca México

Fecha de aplicación del cuestionario: \_\_\_\_\_  
 Nombre del local: \_\_\_\_\_  
 Nombre completo de la persona entrevistada:  
 Edad de la persona entrevistada:  
 Cargo que tiene en la quesería: dueño \_\_\_\_, empleado \_\_  
 Letra de referencia: \_\_\_\_\_

**Sección 1. Origen y transporte del queso**

Nota: las pregunta 2 a la 4 solo se contestan si responden si a la pregunta 1, de lo contrario pasar a la pregunta 5.

Preguntas	Si	No
1. ¿Son fabricantes de los quesos?		
2. ¿En qué localidad (Ciudad y Municipio) producen los quesos		
3. ¿Cuánto tiempo pasa desde elaboran el queso hasta que llega a este local?		
4. ¿Cómo transportan el queso hasta este local?	Hieleras con hielo____, hieleras sin hielo____, otro tipo de transporte (especificar ampliamente)	
5. ¿Utilizan su propia leche?		
6. ¿Elaboran el producto el mismo día que reciben la leche?		
7. ¿Utilizan cuajo natural?		
8. ¿Entregan los quesos el mismo día que son elaborados?		
9. ¿Cómo empaacan los quesos? Hoja ____, Aro ____, Petate ____, Otro (especifique) _____		
10. ¿Qué cantidad de sal que utilizan por kg de queso (gr sal/gr queso)?		
11. ¿Pasteurizan la leche?		
12. ¿Emplean guantes y/o cubrebocas durante el proceso de elaboración?		
13. Si usan guantes, ¿de qué material son?		
14. Si usan guantes, ¿con qué frecuencia se los cambian?		

En caso de no utilizar su propia leche, indicar la(s) lechería(s) que le surten y su ubicación

15. En caso de no ser fabricantes de los quesos, indicar la(s) quesería(s) que le surten y su ubicación

**Sección 2. Almacenaje de los quesos**

	Si	No
16. ¿Almacenan los quesos en hieleras____, refrigeradores__ ninguno, ____ otro(especifique)?		
17. Mientras se venden, los quesos están en bolsas____, expuestos____, guardados____, otro (especifique): ____		
18. ¿Reciben los quesos el mismo día de su venta?		
19. ¿Un queso tarda más de un día en venderse?		
20. Los quesos que no se venden durante el día ¿Se reciclan?		
21. ¿Etiquetan el producto?		

## Anexo 2

Tabla XXII. Análisis de correspondencia múltiple utilizando todas las variables

Variable	Dim1	Dim2
pH	1.00	1.00
IA	1.00	1.00
h°	1.00	1.00
Calcio	1.00	1.00
NaCl	1.00	1.00
Coa	1.00	0.00
EntE	0.95	0.05
etB	0.95	0.05
Tsst	0.72	0.28
Locus D	0.00	0.00
Eigenvalores	0.78	0.58
% de la varianza explicada	12.86	9.53

Dim1= Dimensión 1.

Dim2= Dimensión 2.

IA= Índice Amarillo/Azul.

h°= Ángulo de matiz o tonalidad.

NaCl= Cloruro de Sodio.

Coa= Coagulasa positivo.

EntE= Enterotoxina E.

etB= Toxina exfoliativa B.

Tsst= tsst-1 Toxina del síndrome de choque tóxico.

Tabla XXIII. Análisis de correspondencia múltiple para las variables NaCl, EntE, etB y Tsst

Variable	Dim1	Dim2
NaCl	1.00	1.00
EntE	0.95	0.05
etB	0.95	0.05
Tsst	0.72	0.28
Eigenvalores	0.90	0.35
% de la varianza explicada	25.84	9.87

Dim1= Dimensión 1.

Dim2= Dimensión 2.

NaCl= Cloruro de Sodio.

EntE= Enterotoxina E.

etB= Toxina exfoliativa B.

Tsst= tsst-1 Toxina del síndrome de choque tóxico.