

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y AMBIENTE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE**



**RIESGO POTENCIAL POR EL CONSUMO DE QUESOS
FRESCOS EN EL CENTRO DE TLAXCALA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE

PRESENTA:

Ariadna Guadalupe Jiménez González

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

M. en C. Estrella Carro Córdoba
Dr. Héctor Santos Luna Zendejas

TUTORES:

M. en C. Madai Romero Muñoz
M. en C.A. Raquel Ortiz Marttelo



Ixtacuixtla, Tlax., Enero de 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y AMBIENTE
MAESTRIA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Código: 505-RGE-04
 Publicación: Febrero 2019
 Revisión: 9001:2015 03

LIC. ARIADNA GUADALUPE JIMENEZ GONZALEZ
 CANDIDATA A MCSA
P R E S E N T E

En cumplimiento al artículo 52 fracción "d" del Reglamento General de Evaluación Académica, el comité de titulación ha revisado el trabajo de investigación titulado: "Riesgo potencial por el consumo de queso fresco en el centro de Tlaxcala", realizado bajo la dirección del Dr. Héctor Santos Luna Zendejas y la Mtra. Estrella Carro Córdoba. No habiendo encontrado objeción alguna, se autoriza su impresión:

- Dra. Edelmira García Nieto
- M. en C. Madaí Romero Muñoz
- M. en C. Estrella Carro Córdoba
- Dr. Héctor Santos Luna Zendejas
- Dra. Guillermina García Juárez

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

"POR LA CULTURA A LA JUSTICIA SOCIAL"
 Ixtacuixtla, Tlax., 04 de diciembre de 2019.



DRA. EDELMIRA GARCIA NIETO
COORDINADORA GENERAL DEL CIGVA Y DEL POSGRADO
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y AMBIENTE
MAESTRIA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE

c.c.p. Expediente



Agradecimientos

Laboratorio de Toxicología y Química Ambiental del Centro de Investigación en Genética y Ambiente de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Laboratorio de Salud Pública del estado de Tlaxcala.

Universidad Autónoma de Hidalgo

CONACYT

A ustedes

M. en C Estrella Carro Córdoba

Dr. Héctor Santos Luna Zendejas

M. en C. Madai Romero Muñoz

Dra. Edelmira García Nieto

Dra. Libertad Juárez Santacruz

Por sus conocimientos tiempo y paciencia para la realización de este trabajo, además del apoyo incondicional que tuve por parte de cada uno, tanto académicamente como personalmente.

Dedicatoria

Eternamente agradecida con Dios y mi familia sin ellos no hubiera culminado mis estudios.

Mis hijos Romi y Rodri

Mi mami Guadalupe González del Razo

Mi esposo Erick Arturo Cabrera Muñoz

Mis hermanos Mari, Emma y Vena

Cada uno de ellos fue mi motor y quienes me dieron ánimos para continuar y no desistir, los amo con todo el corazón.

ÍNDICE

| | Página |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| ÍNDICE DE FIGURAS | VI |
| ÍNDICE DE TABLAS | IX |
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 5 |
| 1.1 Riesgo en salud humana | 6 |
| 1.2 Leche | 8 |
| 1.2.1 pH y acidez de la leche | 10 |
| 1.3 Quesos | 10 |
| 1.4 Proceso de elaboración de quesos | 11 |
| 1.5 Características físicas y químicas de los quesos frescos | 14 |
| 1.6 Genuinidad y tipicidad de quesos mexicanos | 14 |
| 1.7 Producción nacional de quesos | 15 |
| 1.8 Producción en Tlaxcala | 16 |
| 1.9 Organismos infecciosos | 17 |
| 1.9.1 <i>Escherichia coli</i> | 18 |
| 1.9.2 <i>Staphylococcus aureus</i> | 18 |
| 1.10 Elementos potencialmente Tóxicos (EPT) | 19 |
| 1.10.1 Origen y distribución de elementos potencialmente tóxicos (EPT) | 20 |
| estudiados | |
| 1.11 Análisis de riesgo | 21 |
| 1.11.1 Evaluación de riesgo en salud | 22 |
| 2. ANTECEDENTES | 24 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 29 |
| 4. OBJETIVOS | 30 |
| 5. HIPÓTESIS | 30 |
| 6. METODOLOGÍA | 31 |
| 6.1 Área de estudio | 31 |
| 6.2 Muestreo | 31 |
| 6.3 Cepas control | 31 |
| 6.4 Determinación de la presencia de coliformes fecales, coliformes totales y <i>Escherichia coli</i> | 31 |

| | | |
|-------|---------------------------------------------------------|----|
| 6.4.1 | Preparación de muestras | 32 |
| 6.4.2 | Determinación de Coliformes Totales y Fecales | 33 |
| 6.4.3 | Determinación de <i>E. coli</i> | 34 |
| 6.5 | Determinación de <i>Shaphylococcus aureus</i> | 36 |
| 6.5.1 | Análisis microbiológico para la <i>S. aureus</i> | 37 |
| 6.5.2 | Prueba de coagulasa | 40 |
| 6.5.3 | Para la prueba de termonucleasa | 40 |
| 6.6 | Determinación de elementos potencialmente tóxicos (EPT) | 41 |
| 6.6.1 | Preparación de muestra | 41 |
| 6.6.2 | Digestión de la muestra y determinación EPT | 41 |
| 6.7 | Estimación de riesgo en salud humana | 44 |
| 7. | RESULTADOS | 46 |
| 7.1 | Visitas al área de estudio | 46 |
| 7.2 | Observación de muestras de <i>E. coli</i> | 46 |
| 7.3 | Presencia de <i>S. aureus</i> en queso | 52 |
| 7.4 | Determinación de humedad y pH | 55 |
| 7.5 | Concentración y estimación de riesgo a la salud de EPT | 58 |
| 8. | DISCUSIÓN | 62 |
| 9. | CONCLUSIONES | 65 |
| 10. | RECOMENDACIÓN | 65 |
| 11. | LITERATURA CITADA | 66 |
| 12. | ANEXOS | 74 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Figura 1. Principio del análisis para la determinación <i>E. coli</i> – a. Preparación de material. – b. Pesado de la muestra en balanza analítica (OAHUS PIONER). – c. Trituración de queso (Stomacher 400 CIRCULATOR). – d. Diluciones en frascos con solución de fosfato. | 33 |
| Figura 2. Representación esquemática de la técnica de NMP. | 33 |
| Figura 3. Agar azul metileno de Levin (EMB-L) y tubos positivos a coliformes totales y fecales. | 35 |
| Figura 4. Inoculación de <i>S. aureus</i> y barrido sobre superficie en agar Baird Parker. | 38 |
| Figura 5. Representación esquemática para la determinación de <i>S. aureus</i> con base en la NOM-210-SSA1-2014 (DOF, 2015). | 39 |
| Figura 6. Pruebas de confirmación termonucleasa y coagulasa para <i>S. aureus</i> . a. – Agar azul de toluidina ADN. – b Incubación de colonias típicas en BHI. c. – Muestras de <i>S. aureus</i> con inóculo a baño maría. | 40 |
| Figura 7. Preparación de muestra con HNO ₃ | 42 |
| Figura 8. Digestión de muestras en el horno de microondas (CEM MARS 6). | 43 |
| Figura 9. Filtración y dilución de muestra de queso con agua desionizada. | 43 |
| Figura 10. Resultados positivos a coliformes totales y fecales. – a. Positivo a coliforme totales y fecales, campana de Durham elevada por la presencia de gas. – b. Control negativo. – c. Positivos en coliformes totales y fecales en todas las muestras de quesos. | 47 |
| Figura 11. Prueba de confirmación de coliformes totales y fecales. – a. Siembra en caldo Verde Brillante de Bilis y caldo EC. – b. Confirmación de coliformes totales y fecales. | 47 |
| Figura 12. Prueba confirmativa de <i>E. coli</i> en agar EMB-L, colonias con centro negro planas, con y brillo metálico. | 49 |
| Figura 13. Colonias presentes de <i>E. coli</i> en agar Cuenta Estándar (CE) | 49 |
| Figura 14. Pruebas de confirmación positivas para <i>E. coli</i> (Citrato ^a , Indol ^b , Rojo de metilo ^c y Voges Proskauer ^d). | 50 |
| Figura 15. Colonias típicas de <i>S. aureus</i> en placas con agar Baird Parker. | 52 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 16. Prueba confirmativa de coagulasa para <i>S. aureus</i> en plasma humano. | 53 |
| Figura 17. Prueba confirmativa termonucleasa para <i>S. aureus</i> en agar azul de toloudina ADN. | 54 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Página |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Tabla I. Composición química de la leche (%) de diferentes razas de vacas. | 9 |
| Tabla II. Principales elementos minerales de la leche de vaca. | 9 |
| Tabla III. Composición de diversas variedades de quesos por 100 g. | 13 |
| Tabla IV. Fuente de contaminación por metales en alimentos. | 20 |
| Tabla V. Número de puestos ambulantes en los que se ofertan quesos frescos. | 46 |
| Tabla VI. Diluciones en caldo verde brillante de Bilis y Caldo EC, para confirmación de coliformes fecales y totales. | 48 |
| Tabla VII. Presencia de coliformes fecales en cada muestra. | 48 |
| Tabla VIII. Resultados confirmativos de presencia de <i>E. coli</i> en quesos frescos expendidos en tres mercados municipales del estado de Tlaxcala en el periodo junio – diciembre 2018. | 51 |
| Tabla IX. Resultados confirmativos de la presencia de <i>S. aureus</i> en quesos frescos expedidos en tres mercados municipales del estado de Tlaxcala en el periodo junio – diciembre de 2018. | 53 |
| Tabla X. Estimación de UFC/g de <i>S. aureus</i> en quesos frescos. | 55 |
| Tabla XI. Determinación de humedad, para quesos frescos, en comparación con la NMX-116-SSA1-1994 y CXS 283-1978. | 56 |
| Tabla XII. Determinación de pH y temperatura de los quesos frescos recolectados de tres mercados, Apizaco, Santa Ana Chiautempan y Tlaxcala. NMX-F-317-1978 (DOF, 1978). | 58 |
| Tabla XIII. Comparación de concentraciones de Zinc (mg/kg), con ingesta recomendada por edad y MRL en muestras de quesos frescos recolectados de tres mercados, Apizaco, Santa Ana Chiautempan y Tlaxcala. | 59 |
| Tabla XIV. Estimación de riesgo infantil (3 a 6 años), niños (10 a 14 años) y adultos. | 61 |

RESUMEN

El queso fresco es elaborado con leche de vaca, algunas veces pasteurizada, con una vida de anaquel de 10 días, en la actualidad en diversos lugares aún emplean métodos artesanales para la realización de este producto, se tiene la idea que de ello depende el sabor, aroma y textura del queso (López, 2004). Sin embargo, la leche puede estar contaminada por diversos microorganismos presentes en ella de forma autóctona y del ambiente local donde se produce el queso (Martínez *et al.*, 2013), los metales pesados pueden estar presentes en la leche debido a que las vacas consumen agua o alimentos contaminados (Yuzbasi *et al.*, 2003), además de los equipos utilizados durante su elaboración (Moreno *et al.*, 1994).

En la presente investigación se evaluó la presencia de microorganismos patógenos *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* además de elementos potencialmente tóxicos (EPT) como lo son algunos metales pesados. Se analizaron dieciocho muestras procedentes de tres mercados del estado de Tlaxcala (Apizaco, Santa Ana Chiautempan y Tlaxcala), los puntos de venta no cuentan con las medidas adecuadas de conservación y a pesar de ello ofertan el producto. Los resultados obtenidos muestran la presencia de *E. coli* en todas las muestras evaluadas de los tres puntos de venta, mientras que las de *S. aureus* mostraron valores que sobrepasan la NOM-243-SSAI-2010 (<100 UFC/g,) en mercados de Santa Ana Chiautempan y Tlaxcala, este último alcanzando valores de hasta 1 500 000 UFC/g.

Los EPT evaluados en los quesos como Cadmio, Cobre, Manganeseo y Plomo no presentaron concentraciones detectables en las muestras, sin embargo, el Zinc presentó valores entre 11.332 y 29.8425 mg/kg que sobrepasan la ingesta recomendada por la OMS/FAO (2002) tanto para niños como para mujeres y hombres adultos. Por otra parte, se calculó el riesgo cancerígeno en infantes, niños y adultos, los cuales no presentaron un riesgo por consumir este alimento.

Los diversos problemas de contaminación en agua, suelo y alimentos son factores que conllevan riesgos microbiológicos y químicos en diversos productos, presentan

un riesgo para la salud, por ello es de suma importancia conocer los procesos de producción, transformación, venta y almacenaje de productos alimenticios.

Palabras clave: Queso, microorganismos, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, elementos potencialmente tóxicos (EPT).

ABSTRACT

The fresh cheese is made with cow's milk, sometimes pasteurized, with a shelf life of 10 days, today in various places still employ artisanal methods to make this product, you have the idea that this depends on the taste, smell and texture of the cheese (Lopez, 2004). However, milk may be contaminated by various microorganisms present in it in an indigenous way and from the local environment where the cheese is produced (Martínez *et al.*, 2013), heavy metals may be present in milk because cows consume water or contaminated food (Yuzbasi *et al.*, 2003), in addition to the equipment used during its production (Moreno *et al.*, 1994).

The presence of pathogenic microorganisms *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in addition to potentially toxic elements (PTSD) such as some heavy metals was assessed in this investigation. Eighteen samples from three markets in the state of Tlaxcala (Apizaco, Santa Ana Chiautempan and Tlaxcala) were analyzed, the outlets do not have adequate conservation measures and yet offer the product. The results obtained show the presence of *E. coli* in all the evaluated samples from the three outlets, while those of *S. aureus* showed values that go over NOM-243-SSAI-2010 (<100 UFC/g,) in markets in Santa Ana Chiautempan and Tlaxcala, the latter reaching values of up to 1 500 000 CFUs/g.

PEPs measured in cheese such as Cadmium, Copper, Manganese and Lead showed no detectable concentrations in the samples, however Zinc had values between 11,332 and 29,8425 mg/kg exceeding the WHO/FAO recommended intake (2002) for both children and adult women and men. In addition, the carcinogenic risk in infants, children and adults was calculated, which did not present a risk for consuming this food.

The various problems of contamination in water, soil and food are factors that carry microbiological and chemical risks in various products, present a risk to health, so it is of utmost importance to know the processes of production, transformation, sale and storage of food products.

Keywords: Cheese, microorganisms, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, potentially toxic elements (PTSD).

1. INTRODUCCIÓN

Las demandas de los consumidores actualmente son: ingerir alimentos seguros, con un alto valor nutritivo, menos procesados y uso de conservadores naturales; las diversas enfermedades causadas por la ingesta de alimentos contaminados representan un riesgo para la salud, por tal motivo es de suma importancia conocer donde comienza y quienes son los involucrados en la producción de un alimento inocuo, lo cual garantizara obtener un atributo de calidad (OMS, 2017).

La inocuidad alimentaria cumple y lleva consigo condiciones y medidas necesarias durante la obtención de las materias primas, producción y/o elaboración, almacenamiento y distribución de los alimentos; para que el consumidor tenga asegurado que una vez ingeridos no representen un riesgo para la salud, tomando en cuenta que existen diferencias individuales de la inocuidad de los alimentos, debido a que existen personas que son intolerantes o alérgicos a ciertos productos. En gran medida la responsabilidad de asegurar la inocuidad alimentaria y que se lleve a cabo son: el gobierno a través de la ejecución de normas y reglamentos, la industria a fin de que cumplan esos lineamientos y los consumidores que hagan un manejo adecuado de estos (Garzón, 2009).

Las enfermedades causadas por alimentos contaminados constituyen un serio problema para la salud de la población. Actualmente es común escuchar reportes de personas que contraen padecimientos debido a la ingesta de alimentos o agua que están contaminados por microorganismos y/o químicos tóxicos que llegan a causar diversas enfermedades o incluso hasta producir la muerte. Los síntomas como diarrea, calambres estomacales y vómitos pueden complicarse hasta causar enfermedades como insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica y trombocitopenia (deficiencia de plaquetas) provocados por la presencia de *Escherichia coli*, representando una grave amenaza para la salud, afectando principalmente a niños, mujeres embarazadas, y personas de la tercera edad (OMS, 2019).

Por otra parte, la resistencia a diversos antibióticos como a la Metilcilina por parte de *Staphylococcus aureus*, ha favorecido al uso indiscriminado de otros antibióticos, lo cual ha generado que cepas de este género, induzcan enfermedades infecciosas simples como foliculitis hasta complicaciones más severas como endocarditis, septicemias, meningitis, neumonías o bacteriemias. Las infecciones causadas por este microorganismo atacan principalmente a neonatos, niños y adultos; quienes albergan a *S. aureus* en la nasofaringe, ocasionalmente en piel y excepcionalmente en vagina o en recto (Bisso, 2011).

Además, los elementos potencialmente tóxicos como algunos metales pesados, encontrados en alimentos provienen de diversas fuentes, entre las más importantes están: suelos contaminados en el que se producen estos para el ser humano y animales; lodos residuales, fertilizantes químicos y plaguicidas empleados en la agricultura, así como del agua que ingieren los bovinos. La exposición humana a estos compuestos se produce de diferentes maneras, incluida la inhalación, el contacto dérmico y por la ingesta de los alimentos, que representan al menos el 90% de la exposición humana global (Llobet *et al.*, 2008).

La exposición de los alimentos a microorganismos, a elementos potencialmente tóxicos, antimicrobianos y agentes físicos extraños, afectan la calidad de vida y salud del ser humano al ser consumidos, puesto que son causantes de diversas enfermedades como disfunción renal, trastornos nerviosos, anemia, cáncer, gastroenteritis, esterilidad y muerte neonatal; quienes pueden llegar a causar intoxicación aguda o crónica, especialmente entre los niños y adolescentes (Klaassen, 2013).

Actualmente los estudios sobre los peligros que provocan las enfermedades transmitidas por los alimentos y de los riesgos propios que representan para los consumidores, junto con la capacidad de adoptar intervenciones adecuadas, debería permitir a los gobiernos y al sector privado reducir significativamente los riesgos relacionados con la alimentación (OMS, 2009).

1.1 Riesgo en salud humana

En salud, riesgo es sinónimo de que haya la probabilidad de que un efecto no deseado, ocurre como resultado de la exposición a diferentes agentes (tóxicos, xenobióticos, contaminantes, microorganismos, etc.). Se debe considerar que la ocurrencia de un efecto adverso depende no solo de la dosis interna que se alcance de un determinado tóxico tras la exposición, sino también de otros factores como la variabilidad interindividual asociada a factores biológicos (genética, edad, sexo, raza, toxicocinética, etc.) y de estilos de vida individuales (Hernández *et al.*, 2009).

Los riesgos en salud se generan por una exposición a agentes causales. En general, éstos pueden ser químicos (sustancias químicas contaminantes del ambiente, fármacos, productos industriales, etc.), físicos (radiación), o biológicos (microorganismos patógenos). Si bien la naturaleza de estos diversos peligros que pueden llegar a suponer una amenaza para la salud humana obliga a aproximaciones metodológicas distintas. Además, se debe considerar que los tóxicos que se encuentren presentes tendrán que someterse a una evaluación de riesgos, tomando en cuenta dos factores: i) la concentración del contaminante y ii) la temporalidad de la exposición (Hernández *et al.*, 2009).

Para que exista un riesgo, la población debe entrar en contacto con el tóxico, es decir, debe haber exposición. Sin embargo, para que ocurra un efecto biológico que puede o no terminar en un daño a la salud, normalmente el contacto no es suficiente, sino que se requiere de la entrada del tóxico al organismo del ser vivo expuesto. En este contexto, el proceso de evaluación del riesgo se transforma en materia de salud pública y adquiere relevancia. No obstante, la evaluación del riesgo no siempre se materializa, ya que lograrla implica contar con información de tres factores: i) la fuente del agente causal (por ejemplo, la fuente de contaminación); ii) el medio por el cual este agente entra en contacto con la población receptora; y iii) la población receptora (Hernández *et al.*, 2009).

Por lo anterior descrito, la leche al ser un alimento completo dado el alto contenido y variedad de nutrimentos importantes para mantener la vida sana de cada individuo, es por ello ha sido ampliamente recomendada para su consumo diario y regular (Soares *et al.*, 2010). Sin embargo, hay evidencia de que la leche y otros

productos lácteos pueden contener cantidades variables de diferentes contaminantes. Surgiendo así el interés de determinar los riesgos de enfermedades causadas por agentes patógenos, cancerígenas y no cancerígenas derivadas del consumo de productos de la leche.

1.2 Leche

La leche destinada para consumo humano es un producto proveniente de la secreción natural de las glándulas mamarias de las vacas sanas, se excluye el producto obtenido quince días antes del parto y cinco días después de éste o cuando produzca calostro (DOF, 1996). Al ser un líquido cuya composición es compleja, de color blanco y opaco, de sabor dulce y un pH cercano a neutral, lo hacen ser un alimento natural exclusivo de mamíferos tras su nacimiento, que no puede ser sustituida por otros al contener un alto valor proteico, grasas, sales e hidratos de carbono. Dentro de su conservación tenemos una gran variedad de productos que existen en el mercado: leches de consumo no modificadas (excepto por la influencia de calentamiento y/o desnato parcial) leche cruda, leche pasteurizada y esterilizada, leches concentradas (condensadas o evaporadas), leches modificadas (fermentadas o acidificadas); crema, mantequilla, queso y subproductos como el requesón (Alais, 2003).

Badui (2006) hizo referencia a que después del parto, la vaca comienza con secreciones mamarias, que duran de dos a tres días, produciendo el calostro, líquido con alto contenido nutrimental para el becerro; con un sabor y olor amargo, también contiene inmunoglobulinas (anticuerpos) y cuya composición promedio es 79% de agua, 10% proteínas, 7% grasa, 3% lactosa y 1% de cenizas; destinado para fortalecer el sistema inmunológico de la cría. Pasado este período la vaca comienza a sintetizar la leche durante la lactancia que va de 180 a 300 días, la producción diaria varía alrededor de 3 litros para vacas de pastoreo y sin atención médica y hasta 25 litros para vacas con buenas condiciones de salud y alimentación.

La leche entera por sí sola contiene un alto contenido de agua 87.89%, además proteínas 3.28%, grasa 3.66% y lactosa 4.65% (Charley, 2007). Las diversas razas, así como su alimentación y etapa de lactancia hacen que varíe la composición de

la leche (Tabla I), además los periodos estacionales del año, la región y la hora de ordeño, afectan o benefician, la calidad y cantidad de leche que producen las vacas (Kirk *et al.*, 2011).

Tabla I. Composición química de la leche (%) de diferentes razas de vacas.

| Raza | Agua | Grasa | Proteínas | Lactosa | Cenizas |
|------------|------|-------|-----------|---------|---------|
| Holstein | 88.1 | 3.4 | 3.1 | 4.6 | 0.71 |
| Ayshire | 87.3 | 3.9 | 3.4 | 4.4 | 0.73 |
| Suiza café | 87.3 | 3.9 | 3.3 | 4.6 | 0.72 |
| Guarnsey | 86.3 | 4.5 | 3.6 | 4.7 | 0.75 |
| Jersey | 85.6 | 5.1 | 3.7 | 4.7 | 0.74 |

(Badui, 2006).

Alais (2003) citó que la leche contiene de 3 a 10 g/L de sales minerales, asimismo, Villegas (2012) determinó que están formadas por la combinación de los cationes Mg^{++} , Na^+ , K^+ , Ca^{++} y los aniones Cl^- , PO_4^- y citratos principalmente (Tabla II), además forman parte del sistema coloidal de caseínas. Prácticamente es posible cuantificar la materia mineral como “cenizas” por una técnica de calcinación de la leche a 550 °C.

Tabla II. Principales elementos minerales de la leche de vaca (g).

| Potasio (K) | Calcio (Ca) | Cloruros (Cl) | Sodio (Na) | Azufre (S) | Magnesio (Mg) | Fósforo (P) | Citratos |
|-------------|-------------|---------------|------------|------------|---------------|-------------|----------|
| 1.41 | 1.23 | 1.19 | 0.58 | 0.30 | 0.12 | 0.95 | 1.6 |

(Villegas, 2012).

Los minerales de la leche se determinan generalmente por incineración, encontrándose de 7 a 8.5 g de cenizas por litro, son alcalinas y dentro de ellas hay una modificación de equilibrio ácido-básico, en el transcurso de la incineración. Por otra parte, hay pérdida de elementos volátiles y modificaciones; como el yodo que regularmente desaparece, el fósforo que forma fosfatos, los citratos se destruyen completamente, en tanto el azufre forma sulfatos y carbonatos por acción del CO_2 . Asimismo, se ha indicado que las diversas propiedades de la leche dependen de factores ambientales, alimenticios y de la edad del animal (Alais, 2003), también de los componentes como la densidad, tensión superficial, calor específico, mientras que otras dependen de las sustancias disueltas: índice de refracción, punto de congelación; por otra parte, otras dependen de los iones: pH (reacción iónica) y conductividad, y por las sustancias reductoras (potencial Redox).

1.2.1 pH y acidez de la leche

La acidez de la leche se ha relacionado con la riqueza de sólidos totales no grasos (proteínas) y con la acidificación de esta por la actividad de la microbiota acidificante (Villegas, 2012). De este modo puede hallarse leches frescas con elevada acidez natural, sin que haya desarrollado ácido láctico aún por vía microbiana a partir de la lactosa. Pero cuando se encuentran leches con baja acidez, puede revelar un estado de desnutrición de la vaca o de adición de agua, esto repercute en la disminución de proteínas. Para determinar la acidez se emplea una titulación con hidróxido de sodio décimo normal (NaOH 0.1 N) reportándose en grados Dornic; en México la acidez de la leche es entre 14 y 18 grados Dornic (Sainos *et al.*, 2007).

La leche tiene una reacción iónica cercana a la neutralidad, con un pH comprendido de entre 6.6 y 6.8 por la presencia de caseínas y de los aniones fosfórico y cítrico; el pH varía durante el ciclo de lactación y alimentación de la vaca. Los valores de pH y acidez no están ligados, tienen variaciones sensibles entre cada uno, en algunos casos el pH puede ser el indicado pero la acidez puede estar por arriba de 18 grados Dornic o puede haber leches con acidez aceptable, pero con pH mayores a 6.8 (Alais, 2003).

1.3 Quesos

La NOM-121-SSA1-1994 establece que los quesos son elaborados con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior por calentamiento, drenado, prensado o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, que dan lugar a las diferentes variedades de quesos: frescos, madurados y procesados (DOF, 1996).

Los pasos principales para la elaboración de quesos son coagulación de leche, corte de coágulo, eliminación del suero (desuerado), salado, prensado y maduración si lo requiere. En México los “quesos frescos” son los mayormente consumidos, estos

tipos no necesitan un proceso de maduración, sólo se consumen con sal o sazonados, y con la adición de algunas especias (Baduí, 2006). En el mundo existen cerca de 1000 variedades de quesos y por supuesto varios de ellos tienen procesos similares de elaboración. Las diversas características como textura, aroma y sabor se debe principalmente a la variedad de origen de la leche (vaca, cabra, búfala, oveja, etc.), también por el proceso de pasteurización, la concentración en la enzima coagulante, los microorganismos o enzimas añadidas, la velocidad e intensidad de acidez, la concentración de la enzima coagulante, el grado y forma de deshidratación del coágulo, la cantidad de sal, la forma y tamaño del queso y las condiciones de temperatura, maduración y humedad. También es importante considerar a aquellos factores que determinan la gran variedad de quesos como los son el uso de leche, crema y en algunos casos la utilización del suero (Charley, 2007).

Los quesos contienen la mayoría de los nutrimentos de la leche, son ricos en proteínas y excelente fuente de calcio y fosforo, además de vitamina A, riboflavina, etc. (Tabla III).

1.4 Proceso de elaboración de quesos

Los quesos frescos o artesanales mexicanos tienen una elevada cantidad de agua (58%), son perecederos y básicamente la calidad de la leche aporta el sabor, aroma, textura y características alimenticias del producto. La leche que se ocupa debe estar libre de agentes físicos como materia fecal, insectos o agua agregada, agentes químicos pueden ser alcohol, almidón, la cal, o el azúcar y agentes microbiológicos tiene que estar libre de microorganismos patógenos como *Brucella*, *Campylobacter*, *Crytosporidium*, *E. coli*, *Listeria* y *Salmonellas*; todos los mencionados son extraños a su composición (López, 2004).

Se comienza con el análisis de la leche con pruebas de acidez titulable debido a la sospecha de presencia de biota bacteriana natural o por adición de agua a la leche por una baja densidad. La pasteurización se realiza para eliminar microorganismos patógenos presentes, pero sin alterar las propiedades físicas y químicas propias de

la leche, esta se puede realizar a 60 °C por 20 min, a 62.8 °C durante 30 s o a 71.7 °C por 15 s. Enseguida se enfría hasta 32 °C para la adición de cuajo; es sumamente importante agitar para evaporar gases que generan sabores y olores desagradables. Se continua con el corte de cuajada en forma horizontal o vertical con liras de acero, obteniéndose el llamado grano y por otro parte el suero (FAO, 2011).

Posteriormente se deja reposar de 5 a 10 min y se comienza a calentar de nuevo a 38 °C para poder dar textura al queso. En el desuerado y salado, se retira casi la totalidad de la cuajada. Por último, se realiza el moldeado, dejando escurrir de 15 a 20 min.

Tabla III. Composición de diversas variedades de quesos por 100 g.

| Queso | Agua% | Calorías | Proteína (g) | Grasas (g) | Carbohidratos (g) | Calcio (mg) | Fósforo (mg) | Hierro (mg) | Vitamina A (U.I) | Tiamina (mg) | Riboflavina (mg) | Niacina (mg) |
|---------------------------|--------------|-----------------|-------------------------|-----------------------|------------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| Natural | | | | | | | | | | | | |
| Azul | 42.41 | 353 | 21.40 | 28.74 | 2.34 | 528 | 387 | 0.31 | 721 | 0.029 | 0.382 | 1.016 |
| Brick | 41.11 | 371 | 23.24 | 29.68 | 2.79 | 674 | 451 | 0.43 | 1083 | 0.014 | 0.351 | 0.118 |
| Cheddar | 36.75 | 403 | 24.90 | 33.14 | 1.28 | 721 | 512 | 0.68 | 1-059 | 0.027 | 0.375 | 0.080 |
| Cottage Cremoso | 78.96 | 103 | 12.49 | 4.51 | 2.68 | 60 | 132 | 0.14 | 163 | 0.021 | 0.163 | 0.126 |
| Crema | 53.75 | 349 | 7.55 | 34.87 | 2.66 | 80 | 104 | 1.20 | 1427 | 0.017 | 0.197 | 0.101 |
| Gjetost | 13.44 | 466 | 9.65 | 29.51 | 42.62 | 400 | 444 | B | b | b | b | 0.813 |
| Limburger | 48.42 | 327 | 20.05 | 27.25 | 0.49 | 497 | 393 | 0.13 | 1281 | 0.080 | 0.503 | 0.158 |
| Parmesano Rallado | 17.66 | 456 | 41.56 | 30.02 | 3.74 | 1376 | 807 | 0.95 | 701 | 0.045 | 0.365 | 0.042 |
| Suizo | 37.21 | 376 | 28.43 | 27.45 | 3.38 | 961 | 605 | 0.17 | 845 | 0.022 | 0.365 | 0.042 |
| Americano | | | | | | | | | | | | |
| Procesado Pasteurizado | 39.16 | 375 | 22.15 | 31.25 | 1.60 | 616 | 745 | 0.39 | 1210 | 0.027 | 0.353 | 0.069 |
| Queso Americano | 47.65 | 290 | 16.41 | 21.23 | 8.73 | 562 | 712 | 0.33 | 788 | 0.048 | 0.431 | 0.131 |

Adaptación de U.S. Dept. Agr. Manual N°8-1. Composición de alimentos. Productos diarios. Crudo, procesado y preparado.

1.5 Características físicas y químicas de los quesos frescos

Este tipo de quesos contiene una humedad entre 46 y 57%, del 18 a 29 % de grasa, de 17 a 21% de proteína, sal de 1 a 3% y pH >6.1 (Hwang y Gunasekaran, 2001; Path, 1991; Alias, 2003).

Díaz *et al.* (2017) analizaron 64 muestras de quesos fresco que se comercializaron en los mercados del municipio de Toluca del Estado de México a temperaturas de entre 7.8 a 26.2 °C, con un pH entre 4.84 y 6.07, con una humedad de entre 42.71 y 66.66%, materia seca de 1.68 a 3.38%, cenizas de 2.64 a 5.24%, NaCl de 0.29 a 1.44%, proteínas de 16.81 a 26.62% y contenido de grasa de 12 a 32%. En el estudio se detectaron un total de 10 vendedores fijos y 54 ambulantes, lo cual mostro que existe una mayor oferta del queso fresco en los mercados populares o “tianguis” comparados con los mercados municipales fijos, situación que puede comprometer la trazabilidad del producto.

1.6 Genuinidad y tipicidad de quesos mexicanos

Villegas y Cervantes (2011) definieron genuino a: “aquello que es derivado de..., y por lo tanto pertenece a”, trasladándolo al caso de los quesos mexicanos genuinos que, en otras palabras, son el resultado de su propia historia, cultura y saber-hacer. De acuerdo con la Real Academia de la Lengua Española, genuino significa: puro, propio, legitimo, natural, adecuado, auténtico; mientras que Larousse Cocina (2017) definió genuino, para denominar a aquellos que no tienen o casi no contienen colorantes u otros elementos químicos. Por lo general son quesos regionales, artesanales, de autoconsumo o de comercialización muy limitada; también se les conoce como quesos naturales o puros.

Los quesos genuinos, se han producido en nuestro país desde hace más de 350 años, son hechos a base de leche cruda; cuando se introdujo nueva tecnología que incluía descremar, pasteurizar, refrigerar y agregar cultivos lácticos seleccionados, se dio paso a los quesos de leche pasteurizada, en el país existen más de 40 variedades de quesos genuinos, algunos gozan de una amplia difusión, con altos volúmenes producidos, como ejemplo el queso Chihuahua, el tipo Manchego,

Panela, Asadero y Cotija. Otros se conocen y consumen en ciertas regiones, como queso Crema de Chiapas, queso Guaje, de Hoja y queso de Poro de Tabasco (Villegas y Cervantes, 2011).

Marescotti (2006) definió de forma genérica, la tipicidad de un producto agroalimentario, por ejemplo, un queso, es la particularidad que deriva de una liga (relación) con el territorio donde se elabora, pero considerando las tradiciones históricas y culturales particulares en las que se ha desarrollado.

Desde el punto de vista normativo, la Ley General de Salud desde 1989 reconoció a los quesos genuinos como quesos frescos o maduros, a los fundidos o procesados y a los llamados “imitación de queso o quesos de imitación”. Estos últimos se refieren a una multitud de productos que parecen quesos, pero no lo son, siendo quesos simulados; unido a esto la demanda por el consumo de quesos no naturales producto de imitación como los quesos Panela, Oaxaca y Chihuahua; puede conllevar a que México sea el principal productor de quesos de imitación a nivel mundial (aunque no existe estudios sistematizados que lo soporten); industriales y técnicos del sector quesero y consumidores, priva la confusión sobre la naturaleza y propiedades de los productos aparentemente semejantes denominados quesos no genuinos, no naturales, de imitación, rellenados, análogos, sucedáneos, alternativos, o “naturales” (Villegas y Cervantes, 2011).

Por tal motivo, Villegas (2004) propuso una clasificación para quesos y productos similares encontrados en México. Los quesos de la categoría genuino pueden ser de leche pasteurizada o de leche cruda; los de la categoría imitación son los quesos rellenados (con grasa vegetal), los quesos extendidos con grasa vegetal, los quesos recombinados con grasa butírica y vegetal, los quesos análogos elaborados a base de soya y sales de calcio y magnesio o procesos de acidificación) y los quesos de la categoría procesado son tajados y untables.

1.7 Producción nacional de quesos

SAGARPA (2016) publicó que la leche bovina en el tercer trimestre de 2016 alcanzó una producción de 8 mil 634 millones de litros, con un incremento de 1.7%

superando al del mismo periodo de 2015 en estados como Chihuahua, Coahuila, Jalisco y Guanajuato, mientras que en estados como Puebla y Chiapas disminuyeron su volumen en comparación al año anterior. Por otra parte, en agosto de 2016 la elaboración de productos derivados y fermentados lácticos como queso, crema y yogurt alcanzó un volumen de 751 mil 370 t. La industria de quesos produjo 245 mil t en el periodo entre enero y agosto de 2016, entre los más consumidos están los Quesos Frescos 17%: Panela 14/%, Doble Crema 13%, Amarillo 13%, Chihuahua 11%, Crema 9%, Manchego 9%, Oaxaca 6% y otros 8% (SIAP, 2016).

1.8 Producción en Tlaxcala

Las pequeñas queserías, familiares en el estado de Tlaxcala cuentan con un espacio generalmente anexo a la vivienda, destinado exclusivamente a la producción de los derivados lácteos. Su infraestructura es básica: parrilla de gas, botes para calentar la leche (de acero inoxidable en algunos casos), aros de madera o de pvc, prensa, queseras de madera, moldes, botes de plástico, también algunos cuentan con descremadora eléctrica; los insumos utilizados son los mínimos, esencialmente, cuajo y sal. En promedio, estas queserías procesan 235 L de leche cada día; debido a que en la región no hay cadena de frío -más allá de la refrigeración por aire que poseen un tercio de los queseros para almacenar su producto y de los refrigeradores domésticos en que se preservan los derivados lácteos por las pocas horas que transcurren entre su producción y su comercialización- la leche se acopia y los derivados lácteos se producen dos veces al día (Vargas, 2007).

Los sistemas de venta que utilizan los productores de quesos en el estado de Tlaxcala son: establecimiento de un “puesto” fijo en algún mercado, venta itinerante en los tianguis de las poblaciones vecinas, venta a mayoristas en otras ciudades, venta de casa en casa en distintas poblaciones y entrega periódica de producto en cremerías de varias ciudades.

1.9 Organismos infecciosos

La leche por su variada composición química ofrece un medio de cultivo óptimo para el desarrollo especialmente de las bacterias. En este grupo podemos encontrar bacterias que se alimentan básicamente ya sea de la proteína, lactosa o de las grasas. Sus actividades bioquímicas sobre cada uno de estos compuestos serán proteolíticas, sacorolíticas o lipolíticas, respectivamente (Keating, 1992).

Villegas (1993) consideró que la leche al ser la materia prima alimentaria más perecedera de todas, debido a su alta concentración de microorganismos (> 500 000 células/mL), a su riqueza de nutrimentos y a su elevado porcentaje en agua (> 85 %), la transformación de la leche en queso debe realizarse dentro de unas horas a partir de la ordeña (antes de 6 h si es “bronca” y menos de 24 h si es enfriada y pasteurizada)

Las bacterias lácticas transforman la lactosa en ácido láctico bajando el pH hasta 4.5. A esta acidez se impide la acción de estas bacterias y otros gérmenes. Las bacterias coliformes llegan a la leche y subproductos durante su manejo y procesos de elaboración dadas las malas condiciones higiénicas presentes. La temperatura óptima para su desarrollo es aproximadamente 37 °C. En la leche cruda recién ordeñada, estas bacterias se multiplican rápidamente formando esporas y se pueden destruir por la pasteurización a temperatura baja (Meyer, 1987). Por lo que se emplean como indicadores de la higiene en el manejo de la leche después de este proceso (Keating, 1992).

Las bacterias coliformes producen ácido láctico y acético, bióxido de carbono e hidrógeno a partir de la lactosa. Con base en la formación de estos gases, se puede determinar la presencia de bacterias coliformes, cuya presencia indica además la existencia de bacterias patógenas (Meyer, 1987).

Eck (1990) mencionó que las bacterias *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes* son microorganismos gram-negativos y anaerobios facultativos que se encuentran generalmente en el intestino de hombre y animales, en suelo, heno o polvo principalmente; estos microorganismos indican una deficiencia en los métodos de

producción, transporte y venta. En el queso, las bacterias coliformes provocan la formación de muchos agujeros pequeños en la pasta conocido como hinchamiento precoz, por ocurrir antes de las 48 h, y constituye un elemento de depreciación del producto.

1.9.1 *Escherichia coli*

Este tipo de bacteria se transmite al ser humano principalmente por el consumo de alimentos contaminados, como productos de carne cruda o poco cocida, leche cruda y derivados, hortalizas y semillas germinadas crudas contaminadas. *E. coli* puede crecer a temperaturas que oscilan entre los 7 y 50 °C, a temperatura óptima de 37°C. Algunas pueden proliferar en alimentos ácidos, hasta pH de 4,4, y en alimentos con una actividad de agua (a_w) mínima de 0,95. Se destruyen al coser los alimentos a temperatura de 70 °C o más (OMS, 2017).

Debido a su alta presencia en el intestino, *E. coli* se utiliza como el indicador principal para detectar y medir la contaminación fecal en la evaluación de la inocuidad del agua y alimentos, se transmite a través de la contaminación cruzada o por contacto humano directo durante la preparación de los alimentos. A pesar de la gravedad o ausencia de los síntomas de la enfermedad, las personas y animales infectados pueden liberar entre 10⁶ a 10⁹ unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de heces (FAO, 2016).

1.9.2 *Staphylococcus aureus*

Es la especie más patógena, pertenece a la familia Micrococcaceae, tienen la forma de coco, generalmente se agrupan formando racimos, inmóviles, son gram positivos, aerobios y anaerobios facultativos, su temperatura óptima para su crecimiento es de 37°C. Producen un pigmento amarillo dorado y son halotolerantes, producen enzimas como la coagulasa, fosfatasa y desoxirribonucleasa que le distinguen de otros estafilococos, asimismo, exotoxinas como la hemolisina y enterotoxina (Murray *et al.*, 2009; Forbes *et al.*, 2009; MacFaddin, 2004). *S. aureus* está presente en el ambiente, agua, aire y alimentos; en especial en derivados lácteos y embutidos (Elika, 2013).

Los reportes internacionales sobre intoxicaciones alimentarias causadas por *S. aureus* no son notificadas a los sistemas de vigilancia epidemiológica y por consecuencia la intoxicación alimentaria estafilocócica (IAE) se debe principalmente, a que es una enfermedad autolimitante (la recuperación normalmente ocurre sin suministro de medicamentos) y los organismos de salud frecuentemente no la incluyen dentro de las enfermedades de declaración obligatoria, tal como sucede en Estados Unidos de América (Doyle, 2001).

Se ha estimado que solo del 1 al 5% de todos los casos de IAE que ocurren en Estados Unidos son reportados al Departamento de Salud Pública; a su vez, se estima que la IAE corresponde al 14% del total de las ETA, siendo la tercera causa más común de tipo bacteriano en este país (Doyle, 2001), mientras que en Francia, *S. aureus* enterotoxigénico es la segunda causa de ETA después de *Salmonella spp* (Kérouanton, 2007).

1.10 Elementos potencialmente Tóxicos (EPT)

La tabla periódica contiene cerca de 70 elementos metálicos, de ellos 59 son considerados metales pesados (MP), que son aquéllos con peso atómico mayor al del hierro (55,85 g/mol). Londoño *et al.* (2016) mencionaron que son elementos químicos con alta densidad, mayor a 4 g/cm³, tóxicos en concentraciones bajas, algunos de estos son el aluminio (Al), bario (Ba), berilio (Be), cobalto (Co), cobre (Cu), estaño (Sn), hierro (Fe), manganeso (Mn), cadmio (Cd), mercurio (Hg), plomo (Pb), arsénico (As), cromo (Cr), molibdeno (Mo), níquel (Ni), plata (Ag), selenio (Se), talio (Tl), vanadio (Va), oro (Au) y zinc (Zn).

Los elementos traza u oligoelementos, son componentes químicos que se requieren en bajas cantidades para asegurar un crecimiento y desarrollo adecuados. Su ausencia o concentración por encima del nivel tolerable puede ser perjudicial para el organismo humano, animales y plantas, llegando a ser tóxicos si se toman en cantidades excesivas. Están presentes en bajas concentraciones (mg/kg⁻¹) en la corteza de la Tierra. En general todos los elementos traza son tóxicos si se ingieren

o inhalan en cantidades suficientemente altas y durante largos períodos de tiempo. Los principales oligoelementos necesarios en la vida de la especie humana son el Cu, Co, Mn, F, Fe, Se, I, Ni, Zn y Mo (Plant *et al.*, 2001). Muchos de estos son fácilmente movilizados por las actividades humanas en proporciones que exceden en gran medida las de los procesos geológicos (Galán y Romero, 2008).

En general se considera que los MP son perjudiciales, pero muchos resultan ser esenciales en la dieta humana y en algunos casos su deficiencia o exceso puede conducir a problemas de salud. Otros en cambio no cumplen una función fisiológica conocida, alteran la salud y es mejor evitarlos siempre (Londoño, 2016).

1.10.1 Origen y distribución de elementos potencialmente tóxicos (EPT) estudiados

Se encuentran de manera natural en el ambiente en concentraciones que por lo general no perjudican las diferentes formas de vida. Los metales pesados no son degradados o destruidos, sin embargo, pueden ser disueltos por agentes físicos y químicos y ser lixiviados. Algunos forman complejos solubles, que son transportados y distribuidos a los ecosistemas hasta incorporarse a las cadenas tróficas, primordialmente aquéllos procedentes de áreas contaminadas (Tabla IV).

Tabla IV. Fuente de contaminación por metales en alimentos.

| Origen de contaminación | Elementos potencialmente tóxicos (EPT) |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Natural, proviene del suelo | Cadmio, bromo, flúor, cobre |
| Uso de insecticidas, desinfectantes y medicamentos | Arsénico, cobre, plomo mercurio |
| Del suelo arenoso y de envases de vidrio | Silicio |
| Por el equipo de procedimiento | Cobre, hierro, níquel, estaño, plomo, zinc, hierro, níquel, estaño, plomo, cadmio. |
| Debido al almacenamiento | Estroncio |
| Por oxidación de los envases | Hierro y cobre |
| Debido al procesamiento | Cobre, cadmio, arsénico |
| Suplementos alimenticios en dietas de animales | Cobre, cadmio, hierro, zinc, arsénico |

Adaptación de Arnold (1980) por Londoño (2016).

1.11 Análisis de riesgo

Actualmente es alarmante el número de casos de infección por alimentos contaminados, sobre todo en países subdesarrollados (OMS/FAO, 2012). Las enfermedades más comunes son diarreas o en casos extremos cáncer, provocadas por alimentos insalubres que contienen bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas nocivas causando más de 200 enfermedades, generalmente son de carácter infeccioso o tóxico que penetran el organismo a través del agua o de alimentos contaminados (OMS, 2017).

En el artículo 5 del Acuerdo sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias (MSF) se pide a los países que se aseguren de que sus medidas sanitarias o fitosanitarias se basen en una Evaluación de Riesgos existentes para la vida y salud de las personas y de los animales o para la preservación de los vegetales, teniendo en cuenta las técnicas de Evaluación de Riesgos elaboradas por las organizaciones internacionales competentes. En el artículo 9 del mismo acuerdo se señala la obligación de los países de prestar asistencia técnica a otros países subdesarrollados con el fin de mejorar sus sistemas de inocuidad de los alimentos (OMS, 2007).

La OMS (2007) mencionó que el análisis de riesgos es una forma sistemática de evaluar riesgos asociados a la presencia de peligros en los alimentos para facilitar la adopción de decisiones en materia de gestión de riesgos y su comunicación. Consta de un proceso integrado por fases, cuyo objetivo es determinar la naturaleza de un riesgo, expresarlo en términos cualitativos o cuantitativos y establecer las medidas adecuadas para minimizarlo o limitarlo a un nivel aceptable. Este análisis se integra por las siguientes fases:

1. Evaluación de riesgos, es el procedimiento que estima la probabilidad de que ocurra un riesgo. Este proceso científico consiste en tres pasos: identificación de peligros, caracterización de peligros, evaluación de exposición y caracterización de riesgos.

2. Gestión de riesgos, proceso en el cual las autoridades competentes y basándose en los resultados de la primera fase elige las opciones adecuadas para disminuir los riesgos, aplican dichas medidas (incluidas las legislativas) y se lleva a cabo el seguimiento de estas. En esta fase se determina la importancia del riesgo estimado, se comparan los costos de su reducción frente a los beneficios sociales de correr dichos riesgos y se lleva adelante el proceso político e institucional para reducir dicho riesgo.
3. Comunicación de riesgos, proceso interactivo de intercambio de información entre la evaluación, gestión y el resto de las partes implicadas.

Torres *et al.* (2005) mencionaron que las metodologías de evaluación de riesgo para salud humana y para biota (riesgo ecológico) se han desarrollado de manera independiente; sin embargo, paulatinamente se reconoce cada vez la exigencia de establecer mejores niveles de protección tanto al ser humano como a los otros componentes del ambiente, por ello surge la necesidad de diseñar una a una metodologías de evaluación de riesgo integradas que contemplen tanto a la población humana como a los otros receptores ecológicos en un solo proceso.

1.11.1 Evaluación de riesgo en salud

Surge por la necesidad de evaluar los riesgos en salud en sitios contaminados, bajo una metodología científica, la Agencia de Protección Ambiental (EPA por sus siglas en inglés; EPA, 2004) como la Agencia para las Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades –(ATSDR por sus siglas en inglés; ATSDR, 2008) generaron opciones metodológicas.

Estas opciones parten de una amplia evaluación ambiental (cuantificando tóxicos en los medios involucrados en las rutas de exposición) para después, mediante definición de escenarios de exposición y tratamiento probabilístico de la información (como los modelos de simulación Montecarlo), generar estimados cuantitativos de riesgo. Estas metodologías son útiles, pero en mayor o menor grado se enfrentan a incertidumbres, siendo una de las mayores la incertidumbre relativa a la exposición (Hernández, 2009).

En América Latina, ante la pobreza, la educación insuficiente, la falta de empleos adecuados bien remunerados, y ante otras muchas carencias sociales, la cuestión ambiental no es de alta prioridad. Es decir, no es posible arriesgar la erogación de recursos económicos cuantiosos en limpieza de sitios solo por una mala definición de riesgo. Es así como la Organización Panamericana de la Salud (Díaz-Barriga, 1999) encabezó un análisis crítico de las metodologías existentes para mejorarlas, disminuyendo su incertidumbre. Como resultado se propuso el uso de biomarcadores de exposición y biomarcadores de efecto.

Los primeros implican el monitoreo de las sustancias tóxicas o sus metabolitos en fluidos biológicos o tejidos del individuo supuestamente expuesto. Por ejemplo, no solo es realizar la metodología de muestrear plomo en suelo, sino que también debe realizarse un análisis de plomo en sangre, que certificaría la absorción del compuesto. Por otra parte, el empleo de biomarcadores de daño o de efecto, representa el hecho que el tóxico ya absorbido ha comenzado a afectar la función celular. Ejemplos de estos biomarcadores de efecto o de daño son la actividad de enzimas como las colinesterasas en pacientes expuestos a insecticidas organofosforados (Joshaghani *et al.*, 2007); la apoptosis en niños expuestos al dicloro difenil tricloroetano (DDT) (Pérez-Maldonado *et al.*, 2004) y la disminución del coeficiente intelectual en niños expuestos a plomo (García-Vargas *et al.*, 2001; Canfield *et al.*, 2003).

2. ANTECEDENTES

La salud pública está bajo la perspectiva de enfrentarse a múltiples factores sociales, ambientales, culturales y de salud, cuya interrelación se manifiesta a través de enfermedades como diarreas, infecciones respiratorias, enfermedades infectocontagiosas y transmisibles, así como intoxicaciones por exposición a plaguicidas y alimentos contaminados. De aquí que, desde una perspectiva internacional, en los países pobres, un niño muere cada 15seg por enfermedades diarreicas (Morris, 2004), 200 millones de niños en el mundo no alcanzan su desarrollo potencial (OMS, 2008), más de cinco millones de infantes de 0-14 años mueren cada año por enfermedades relacionadas con condiciones ambientales adversas, principalmente en países en desarrollo, lo que significa en promedio 13000 muertes infantiles por día (UNICEF/OMS, 2002). Por ello es importante tener una evaluación del riesgo microbiológico que debe incluir la identificación de peligros, la evaluación de la exposición, la caracterización del peligro y la caracterización del riesgo (Codex, 1999).

Martínez *et al.* (2013) reportaron el recuento de microorganismos presentes en quesos frescos de tres regiones de Cuba; los valores hallados fueron superiores a 5×10^2 UFC/g en todas las zonas analizadas, para *Staphylococcus* se determinaron valores de 1×10^3 UFC/g, mientras que para *E. coli* fueron de 1×10^3 UFC/g. Asimismo, el 19% de las muestras fueron positivas para *Salmonella* spp y 14% fueron positivas para *E. coli*. Atribuyen la presencia de estas bacterias enteropatógenas a la deficiencia de higiene que constituye una alerta de riesgo para la salud pública.

El estudio hecho por Duran *et al.* (2010) quienes determinaron la presencia de microorganismos patógenos en quesos comercializados en un municipio de Colombia, utilizando la técnica del número más probable (NMP) hallando a *E. coli* en 16 muestras, también como resultado obtuvieron un recuento de organismos mesófilos aeróbico en promedio de 1.5×10^{-8} UFC/g y como indicador sanitario a *E. coli* con 2.5×10^3 UFC/g. Concluyendo que la presencia de este microorganismo se debe a la manipulación higiénica deficiente durante la elaboración del producto.

La determinación de indicadores sanitarios en 12 muestras de quesos en la Habana, Cuba por parte de Martínez *et al.* (2016) quienes reportaron que los microorganismos presentes en 11 de las muestras analizadas formaron 5×10^6 UFC/g, también reportaron coliformes totales con el 83.2% con valores de 10^4 UFC/g, hongos y levaduras en un intervalo de 10^4 – 10^6 UFC/g. Los resultados presentados evidenciaron deficiencias sanitarias en los quesos analizados, lo que hace necesario exigir el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura a lo largo de todo el proceso, desde la obtención de la leche hasta llegar al producto final, para evitar que se produzcan enfermedades de transmisión alimentaria en la población.

Martínez *et al.* (2013) realizaron una evaluación sobre la calidad e inocuidad de quesos frescos artesanales en la provincia de Cuba, determinaron la presencia de diversos microorganismos entre los encontrados *Staphylococcus* quien mostro resultados positivos a la prueba de confirmación coagulasa, además de valores superiores a 1×10^3 UFC/g en las muestras de las tres diferentes regiones de Cuba evaluadas, concluyendo en que estos resultados son indicativos de deficiencias higiénicas en la fabricación de quesos frescos artesanales, lo cual se encuentra asociado al elevado contenido bacteriano, causando de esta forma el rápido deterioro del producto.

Rodas *et al.* (2016) efectuaron un estudio sobre la presencia de *S. aureus* en quesos comercializados en la ciudad de Milagro, Ecuador, analizaron microbiológicamente 54 muestras de quesos. 30 muestras de quesos correspondientes al 55.56%, resultaron contaminados por *S. aureus*, mientras que las restantes 24 (44.4%) fueron negativas a la presencia de dicho microorganismo. De los 54 quesos muestreados 18 fueron artesanales, 18 pasteurizados y 18 tipo mozzarella. Los resultados por cada tipo de queso por la presencia de *S. aureus* fue, de 18 quesos artesanales se presentó en todas las muestras (100%); 11 en quesos pasteurizados (61%) y 1 en queso mozzarella (5%), contaminados por la presencia del

microorganismo. El porcentaje de contaminación entre cada tipo de quesos demuestra el riesgo inminente de que se presenten infecciones en los humanos, conllevando a problemas de salud pública por intoxicaciones estafilocócicas. Por otro lado, los niveles de contaminación en los quesos estudiados superan los parámetros permisibles por las normas INEN del Ecuador, debido a las condiciones higiénicas deficientes en su proceso de elaboración, manejo y expendio.

Gaona (2011) realizó la determinación de elementos químicos en queso Cotija, en la sierra Jalisco-Michoacán; las concentraciones encontradas de As de 0.5 ppm y Pb de 0.1 ppm, fueron superiores al límite máximo permisible establecido en la NOM-735-COFOCALEC-2018 (DOF, 2019).

Mohamadreza *et al.* (2015) midieron niveles de EPT en la leche de vaca bronca de sitios de producción en Irán, con un total de 32 muestras realizaron el análisis con espectrómetro de absorción atómica donde encontraron concentraciones de mercurio y arsénico, las cuales oscilaron entre 7.29 y 14.95 $\mu\text{g/L}$ y de 15.20 a 25.90 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. Citan textualmente que todos los valores estuvieron dentro de los límites permisibles establecidos por *Codex Alimentarius* y PTWI. Suponiendo que el consumo anual per cápita es de 150 litros de leche, el estimado de los dos metales pesados, en la región fue de 4.50 μg / día para Hg y 8.52 μg / día para As. Mientras que, para el análisis del contenido de níquel y estaño, las muestras contuvieron cantidades mínimas de 45.10 ($\mu\text{g/L}$) y 29.78 ($\mu\text{g/L}$) y máximas de 310.55 ($\mu\text{g/L}$) y 314.64 ($\mu\text{g/L}$), respectivamente. Además, reportaron que las ingestas diarias de Ni y Sn por el consumo de leche se estimó de 34.92 μg y 28.23 μg , respectivamente.

Por otra parte los riesgos sanitarios que enfrentan las poblaciones humanas conduce no solo a la evaluación de la exposición a sustancias tóxicas y/o nocivas y a sus respectivos efectos sobre su salud, sino también a la identificación y análisis de otros factores ambientales adversos relacionados con la falta de agua potable y de servicios de saneamiento básicos, la falta de infraestructura, así como a la carencia educativa y hábitos de higiene en poblaciones que, además, viven bajo

condiciones de alta marginación y pobreza. Estas comunidades son, entonces, altamente vulnerables no solo por las múltiples exposiciones ambientales, sino por el ambiente social que les rodea (Lee, 2002).

Maas *et al.* (2011) realizó una evaluación de la leche cruda utilizada para la producción de queso en Francia, encontrando concentraciones de Zn entre 20 y 30 mg/mL, sin embargo, las concentraciones en el producto final fueron superiores a las iniciales de 33 mg/g y de 41 mg/g, respectivamente.

En dos estudios epidemiológicos, los trabajadores no tuvieron una mayor incidencia de cánceres asociados con la exposición ocupacional inhalatoria al zinc (Logue *et al.*, 1982; Neuberger y Hollowell, 1982).

Los trabajadores de nueve plantas electrolíticas de zinc y cobre fueron estudiados por Logue *et al.* (1982) encontrando que los trabajadores de dos de estas plantas estuvieron expuestos a zinc o zinc/cobre; en las siete plantas restantes, los trabajadores estaban expuestos al cobre. No se encontró una asociación entre la mortalidad por cáncer y la exposición al zinc.

Neuberger y Hollowell (1982) estudiaron la mortalidad excesiva por cáncer de pulmón asociada a la residencia en una antigua área de minería y fundición de plomo/zinc del medio oeste de los Estados Unidos. Las tasas de mortalidad ajustadas por edad y sexo se compararon con las tasas estatales y nacionales. El análisis determinó que la mortalidad por cáncer de pulmón era elevada en la región, pero no se encontró que estuviera asociada con los niveles de plomo o zinc. Muchos factores de confusión no fueron considerados en el análisis, como el tabaquismo, ocupación y la duración de la residencia en la zona en cuestión.

En tanto una evaluación del riesgo para la salud de los niños debido al consumo de leche de vaca en áreas contaminadas en Puebla y Tlaxcala, realizada por Castro *et al.* (2017), la cual presento EPT como Cd, Pb, Ni, Cu, Cr y Zn. Además de realizar

una estimación a riesgo a la población. Los valores presentaron fueron por debajo de 1 y se consideraron no cancerígenos para la salud de los niños.

3. JUSTIFICACIÓN

Los peligros biológicos de origen alimentario incluyen organismos como las bacterias, estos organismos están frecuentemente asociados a manipuladores y productos contaminados en establecimientos. El uso de aguas residuales para producir granos y forrajes para alimentar al ganado vacuno pueden convertirse en una fuente de los diversos compuestos tóxicos contenidos por la leche, entre los que se encuentran los elementos potencialmente tóxicos (EPT), que se caracterizan por su bioacumulación causan problemas de salud pública por ser citotóxicos, causar enfermedades cancerosas y mutagénicas. Además de los factores ambientales, la falta de agua potable y de servicios de saneamiento básicos, la poca infraestructura, hábitos de higiene con lleva a la vulnerabilidad de que productos frescos como los quesos representen un riesgo a la salud.

Por estas razones resulta de particular importancia determinar el impacto que representa la venta y manipulación de quesos artesanales en vía pública, dada la proliferación de enfermedades infecciosas producidas por la contaminación de *E. coli* y *S. aureus*. Asimismo, detectar la presencia de EPT no permitidos en los alimentos para el consumo humano, que puedan representar un riesgo a la salud de una población.

4. OBJETIVOS

- **General**

Evaluar la presencia de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y de elementos potencialmente tóxicos como cadmio, cobre, plomo y zinc en quesos frescos procedentes de mercados de los municipios de Tlaxcala, Santa Ana Chiautempan y Apizaco.

- **Específicos**

Determinar la presencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* aislados de quesos frescos por técnicas microbiológicas, para descartar riesgo biológico.

Estimar las concentraciones de elementos potencialmente tóxicos como Cadmio, Cobre, Plomo, Manganeso y Zinc en quesos frescos, por medio de espectrofotometría de absorción atómica.

Determinar el riesgo potencial en salud humana por consumo de queso.

5 HIPÓTESIS

La manipulación y venta de quesos frescos en puestos ambulantes expuestos al aire libre son factores que influyen en el desarrollo de microorganismos infecciosos como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, quienes representan un riesgo potencial

En la actualidad el uso desmedido de agroquímicos y el riego con aguas residuales en la producción de forrajes pueden ser una de las fuentes que generen la presencia de algunos elementos potencialmente tóxicos en el producto lácteo.

6 METODOLOGÍA

6.1 Área de estudio

El estudio se realizó en tres mercados del estado Tlaxcala: Mercado Sabatino ubicado en Tlaxcala centro, Mercado 12 de Mayo del municipio de Apizaco y Mercado Dominical de Santa Ana Chiautempan. Las zonas de muestreo son consideradas como puntos claves de abastecimiento de alimentos para la población tlaxcalteca.

6.2 Muestreo de queso fresco

Se recolectaron al azar seis muestras de queso fresco en diferentes puntos de venta de cada uno de los mercados seleccionados (Tlaxcala, Santa Ana Chiautempan y Apizaco), dando un total de 18 muestras. La obtención de las muestras se llevó a cabo entre enero y diciembre de 2018.

6.3 Cepas control

Las cepas control utilizadas para la determinación de microorganismos patógenos fueron cepa control positiva *Escherichia coli* clave ESP24 y control negativo *Enterobacter aerogenes* clave ESP8, mantenidas en un medio de cultivo BAB, mientras que para *Staphylococcus aureus*, la cepa control positivo fue *S. aureus* clave ESP31 y para el control negativo *S. epidermis* ATCC/2228 clave ESP25, todas ellas proporcionadas por el Laboratorio Estatal de Salud del Estado de Tlaxcala. Cada una de las cepas se inocularon y se mantuvieron bajo las mismas condiciones, que las muestras analizadas (ANEXO 1).

6.4 Determinación de la presencia de coliformes fecales, coliformes totales y *Escherichia coli*

La determinación de este microorganismo se realizó con base en la NOM-121-SSA1-1994, "Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados" (DOF, 1995) y la NOM-210-SSA1-2014, "Productos y servicios. Métodos de pruebas microbiológicas. Determinación de microorganismos indicadores patógenos" (DOF, 2015).

El principio de la técnica se basa en la dilución de la muestra en tubos múltiples, de tal forma que todos los tubos de la menor dilución sean positivos y todos los tubos de la dilución mayor sean negativos. El resultado positivo se demuestra por la presencia de gas en cada uno de los tubos con las diversas diluciones, cuya producción es a partir de la fermentación de la lactosa a $45.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (en alimentos) dentro de las 48 h de incubación, además del crecimiento microbiano (DOF, 2015)

Para obtener el NMP se aplica la teoría de la probabilidad, considerando distribución aleatoria de las bacterias presentes en la muestra, esta técnica consiste en una prueba presuntiva y confirmativa, para considerar la serie de diluciones es importante conocer el origen de la matriz, así como probable riesgo de contaminación, cabe recalcar que esta prueba indica a presencia o ausencia del organismo, considerándola, así como prueba cualitativa (DOF, 2015).

6.4.1 Preparación de muestras

Las 18 muestras, fueron depositadas en bolsas plásticas y etiquetadas para su identificación con base en su procedencia con las siguientes claves Tlaxcala(T-1 a T-6), Apizaco (A-1 a A-6) y Santa Ana Chiautempan (S-1 a S-6) ; se guardaron en hieleras herméticas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su traslado al Laboratorio Estatal de Salud Pública del estado de Tlaxcala para realizar posteriormente las de pruebas microbiológicas, partiendo de la determinación de coliformes fecales, enseguida coliformes totales y por último la identificación de *E. coli* además de *S. aureus*.

Para el análisis microbiológico se tomaron 25 g de cada muestra de queso fresco pesándose en una balanza analítica (OAHUS PIONER), cada muestra se inoculó en 225 mL medio de cultivo APA, las muestras en conjunto con el medio de cultivo se colocaron en bolsas plásticas herméticas estériles para triturarlas con un equipo Stomacher (400 CIRCULATOR) durante 1 min; transcurrido el tiempo, la muestra triturada se colocó nuevamente en el frasco de origen para ser considerada como primera dilución, a partir de esta se realizaron las siguientes series de diluciones en frascos que contenían 90 mL de solución de fosfatos, hasta la dilución de 10^{-7} (Figura 1).

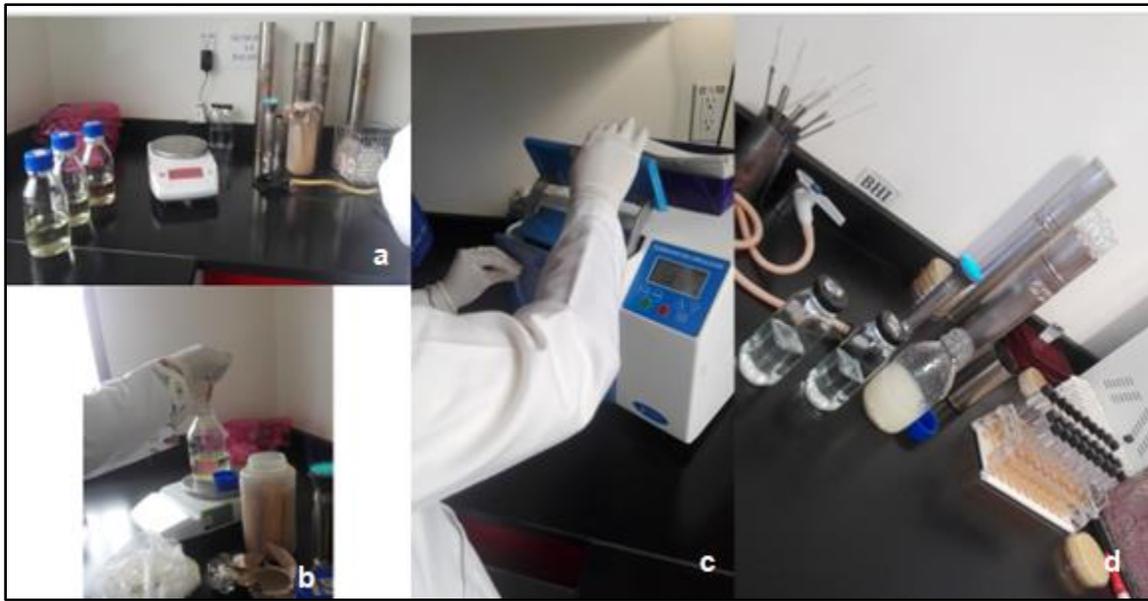


Figura 1 (a-d). Determinación de *E. coli*. a) Preparación del material, b) Pesado de la muestra en balanza analítica (OAHUS PIONER), c) Trituración de la muestra de queso (Stomacher 400 CIRCULATOR), d) Diluciones en frascos con solución de fosfato.

6.4.2 Determinación de Coliformes Totales y Fecales

De las diluciones realizadas, se seleccionaron tres y cuatro diluciones de la 10^{-1} a 10^{-4} , se inocularon con 1 mL de muestra en tubos con medio de cultivo Caldo Lauril, se hizo por triplicado en sulfato triptosa que contenían campanas Durham para la observación de producción de gas (Figura 2).

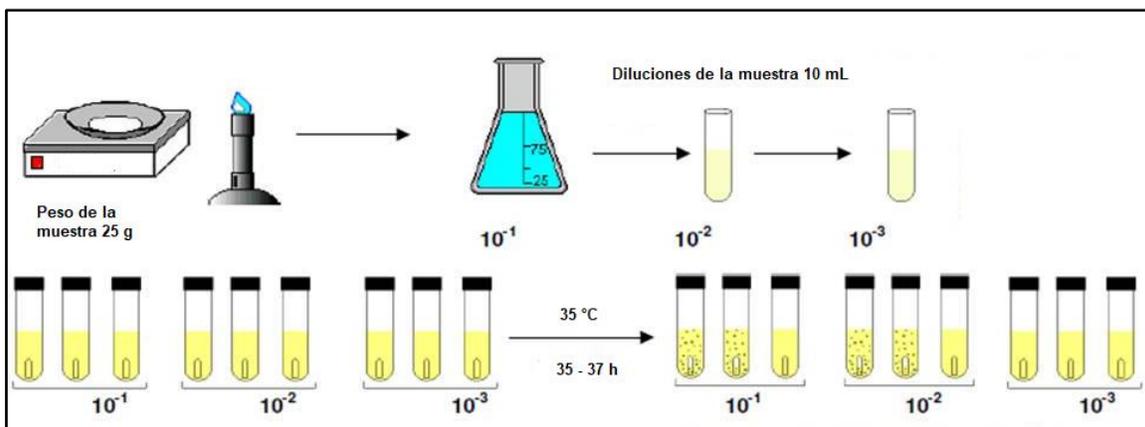


Figura 2. Representación esquemática de la técnica de NMP (Camacho, *et al.*, 2009).

Los tubos inoculados fueron incubados (incubadora-SHE-LAB) de 24 a 48 h a una temperatura entre los 35-37 °C, para verificar la prueba se utilizaron cepas de *E. coli* (control positivo) y *E. aerogenes* (control negativo), además de un control de esterilidad que contenía medio de cultivo estéril.

Transcurrido el tiempo de incubación se realizó una lectura de tubos y se observó si había turbidez y producción de gas en las campanas Durham. A los tubos con presencia de gas se les realizó una resiembra en tubos con medio de cultivo Caldo *E. coli* (EC) y Caldo Verde Brillante, la resiembra se realizó tomando una alícuota para ser inoculada en tubos con medio de cultivo EC y Caldo Verde Brillante, para después incubarlos durante 24 a 48 h a 35-37 °C, en incubadora, esta resiembra se llevó a cabo con controles positivos y negativos.

6.4.3 Determinación de *E. coli*

Después de la lectura y al observar producción de gas, se sembraron en medio de cultivo (por estría cruzada) en agar Agar azul metileno de Levin (EMB-L) y se incubaron de 18-24 h a 44 °C, para observar colonias características de *E. coli* (Figura 3).



Figura 3. Agar azul metileno de Levin (EMB-L) y tubos positivos a coliformes totales y fecales.

Transcurrido el tiempo de incubación, se seleccionaron dos colonias semejantes a las típicas formadas por *E. coli* (colonias planas con centro negro, con o sin brillo metálico), se resembraron en placas de Agar para Métodos Estándar durante 24h a 35°C, después del tiempo de incubación se realizó una Tinción de Gram, con la finalidad de observar bacilos cortos gram negativos. Se continuo con la identificación del microorganismo con pruebas bioquímicas o de confirmación llamadas Indol, Rojo de metilo, Voges Proskauer y Citrato de Simmons, las cuales consisten en cambios de coloración.

Con la prueba Indol se determina si la bacteria produce la enzima triptofanasa, la cual hidroliza el triptófano en indol y alanina. El caldo de triptona al 1% se inocula e incuba a 35°C por 48 h y adicionar 0.2 o 0.3 mL de reactivo de Ehrlich, el resultado positivo se presenta con una coloración rosa-rojizo en la superficie, indica que se

ha formado un complejo colorado entre el indol y el p-dimetilamino benzaldehído. El alcohol amílico concentra el complejo colorado en la superficie, indicando positivo a *E. coli*.

Con la prueba Rojo de Metilo se detecta la fermentación ácido-mixta. La acumulación de ácidos acético o fórmico que modifican el pH, haciéndolo muy ácido, este cambio de pH se detecta añadiendo el indicador Rojo de Metilo al cultivo. Se inocula el medio de Clark-Lunbs (MR-VP) e incubar a 37 °C por 48 h y añadir 5 gotas de Rojo de Metilo, la presencia del color rojo en el interior del tubo muestra resultado confirmativo a la presencia de *E. coli*.

En tanto la prueba de Voges Proskauer revela la fermentación butanodiólica, mediante un reactivo alfa-naftol de hidróxido de potasio, detecta la presencia de un precursor del butanoidol (acetilmetilcarbinol o acetoína) que en presencia de oxígeno se oxida a diacetilo, con ayuda del reactivo alfa naftol incrementa la sensibilidad de la reacción. El diacetilo origina una coloración roja, por el contacto de la potasa y oxígeno. El medio empleado es Clark-Lunbs (MR-VP) se incuba a 37 °C por 48 h y adiciona el reactivo alfa naftol. La coloración roja indica negativo a la presencia de *E. coli*.

Por último, la prueba bioquímica Citrato de Simmons, se utiliza citrato como fuente de carbono y energía. La prueba emplea un medio Simmons con citrato, se inocula por estría cruzada con aza de platino e incuba a 35 °C por 48 h, si hay una coloración verde, el resultado es negativo a la presencia de *E. coli* y se es azul indica un resultado positivo a su presencia.

6.5 Determinación de *Shaphylococcus aureus*

Esta estimación permite saber cuántos organismos de *S. aureus* están presentes en alimentos. Para la preparación de muestras, material y medios de cultivo se realizó con base en las NOM-210-SSA1-2014 y NOM-115-SSA1-1994 (DOF 2015, 1995).

Se hace el vertido directamente en placas de medio de cultivo selectivo y diferencial, con la confirmación mediante las pruebas de coagulasa y termonucleasa. Este método es adecuado para el análisis de alimentos en los cuales se esperen más de 100 células de *S. aureus* por gramo. Baird-Parker es un medio parcialmente selectivo que utiliza la capacidad de los estafilococos de reducir el telurito a telurio y detectar la lecitinasa a partir de la lecitina del huevo.

Para la determinación de *S. aureus*, se utilizó un medio selectivo sólido Agar Baird-Parker (BP), el cual contiene las fuentes de carbono y nitrógeno necesarias para su crecimiento. La glicina, el cloruro de litio y telurito potásico que actúan como agentes selectivos, en tanto la yema de huevo constituye el sustrato para determinar la producción de lecitinasa, además de la actividad de lipasa. Los estafilococos producen colonias grises oscuro a negro debido a la reducción del telurito, los estafilococos que producen lecitinasa descomponen la yema de huevo y crean zonas transparentes alrededor de las colonias.

Es posible que se forme una zona de precipitación debido a la actividad de lipasa; el medio no debe utilizarse para el aislamiento de estafilococos diferentes de *S. aureus*, dentro de la identificación se utiliza pruebas bioquímicas, en este paso se identifica el género y especie del organismo enterotoxigénico (*S. aureus*). Estas pruebas bioquímicas se realizan de acuerdo con la NOM-210-SSA1-2014 (NOM, 2015), tiene la presencia de la enzima coagulasa, formación de un coagulo lo que muestra positivo a la presencia de *S. aureus* y presencia de la enzima termonucleasa, coloración rosa indicando positivo a este organismo.

6.5.1 Análisis microbiológico para *S. aureus*

Para la determinación de *S. aureus* se partió con el procedimiento para la determinación de *E. coli* (diluciones, en solución de fosfato), una vez que se realizaron las diluciones y considerando las de mayor representatividad 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} se inoculo 0.1 mL a placas con Agar Baird Parker por duplicado (Figura 4); con ayuda de un triángulo de vidrio se expandió la muestra sobre toda la superficie

de cada caja Petri, técnica conocida como de barrido, en esta técnica se utilizó como control positivo *S. aureus* y como control negativo *S. epidermidis* bajo las mismas condiciones (Figura 5).



Figura 4. Inoculación de *S. aureus* y barrido sobre superficie en agar Baird Parker.

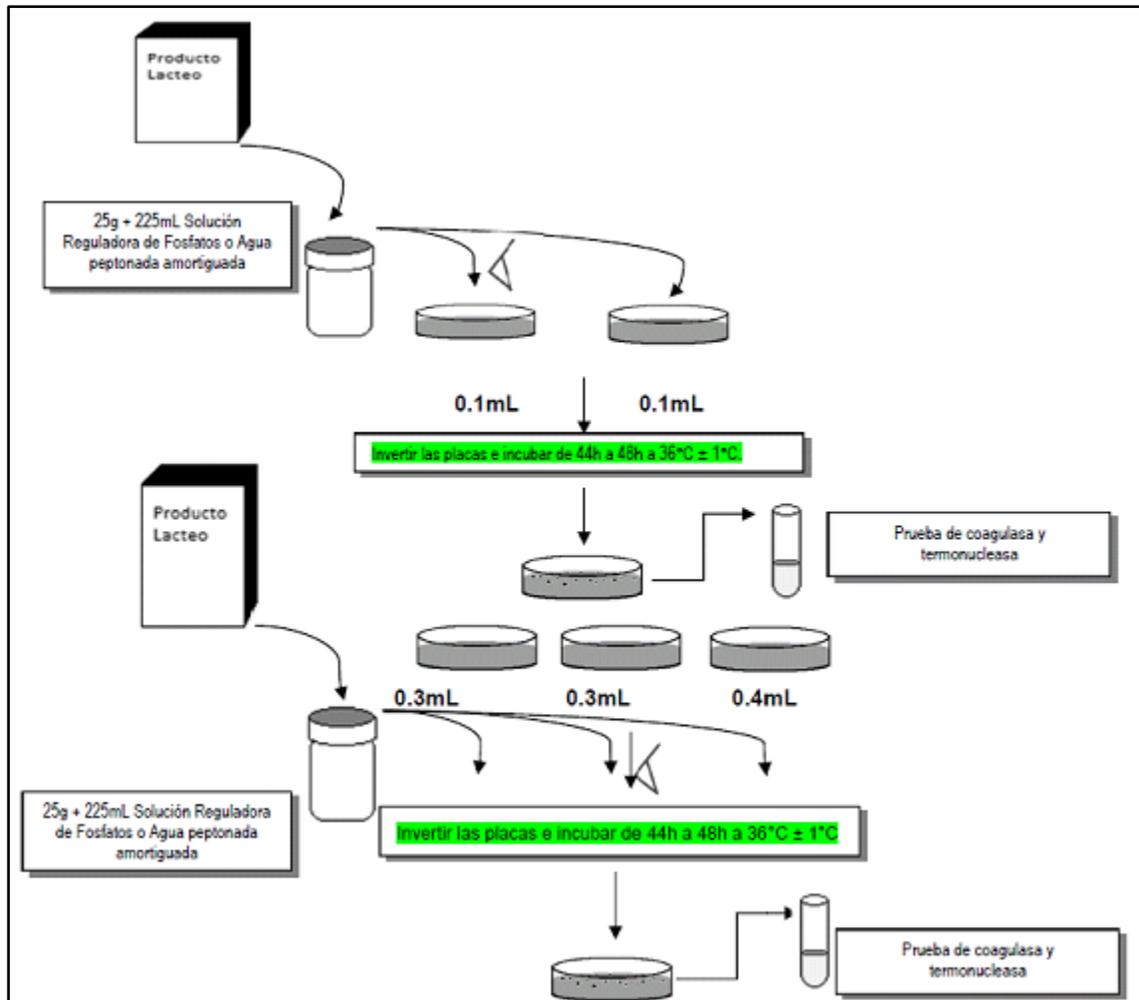


Figura 5. Representación esquemática de la determinación de *S. aureus* con base en la NOM-210-SSA1-2014 (DOF, 2015).

Una vez que la muestra fue absorbida por el medio de cultivo, se incubó de 24 a 48 h a 35°C, posteriormente se realizó el conteo de las colonias típicas de *S. aureus* caracterizadas por la formación de colonias negras, circulares, brillantes, convexas, lisas de diámetro de 1 a 2 mm, con una zona opaca y halo claro alrededor de ella.

Posteriormente se seleccionaron las placas que formaron de 15 a 150 colonias típicas y atípicas de *S. aureus*, de estas placas se seleccionaron 5 colonias típicas por muestra para su confirmación, realizando las pruebas de termonucleasa y coagulasa, (para la prueba de coagulasa el plasma liofilizado de conejo fue sustituido por plasma de humano, por lo que se realizaron las pruebas de validación con controles positivos y negativos a la par del proceso).

Las colonias seleccionadas se inocularon en un tubo con 0.5 mL de Caldo Infusión Cerebro de Corazón (BHI) por 24 h a 35 °C para ambas pruebas. Después de la incubación el tubo con 0.5 mL se dividió en tubos estériles 0.2 mL para prueba de coagulasa y 0.3 mL prueba de termonucleasa (Figura 6).

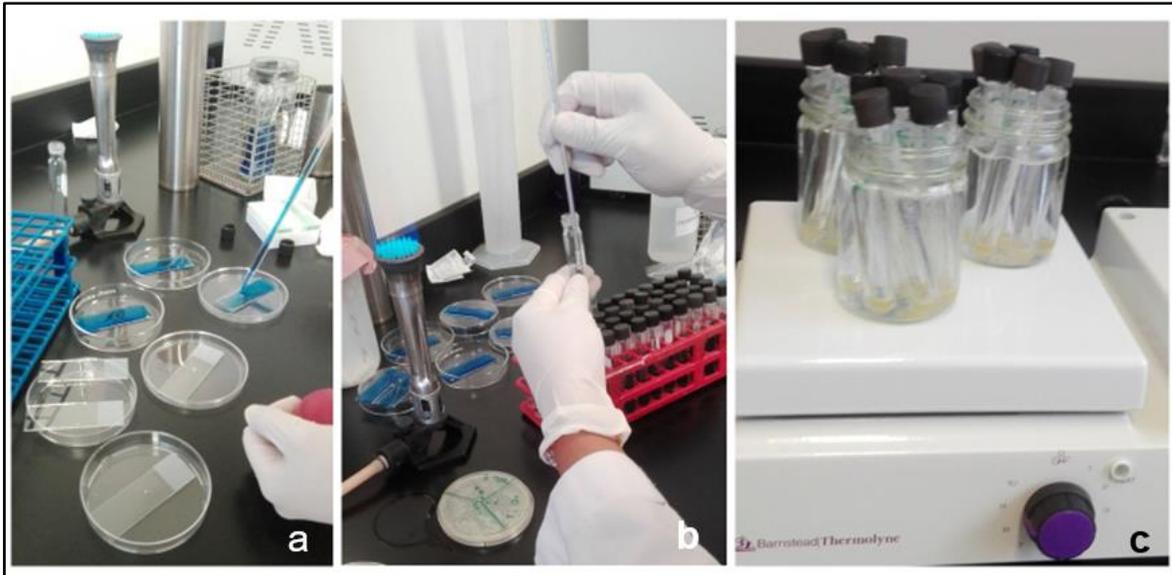


Figura 6 (a-c). Pruebas de confirmación termonucleasa y coagulasa para *S. aureus*. A) Agar azul de toluidina ADN, b) Incubación de colonias típicas de *S. aureus* en BHI, c) Muestras de *S. aureus* con inoculo en baño maría.

6.5.2 Prueba de coagulasa

Para esta prueba de confirmación coagulasa, se utilizaron tubos con 0.2 mL de BHI, agregando 0.1 mL de plasma humano, estos fueron incubados durante 24 hrs. a 35°C.

6.5.3 Prueba de termonucleasa

En esta prueba de confirmación se utilizó agar azul de toluidina – ADN fundido a flujo de vapor, posteriormente se expandió sobre un porta objetos, se esperó a que gelificara y con ayuda de pipetas Pasteur estériles, se realizaron orificios sobre el agar para adicionar una gota de muestra, de control positivo y negativo, previamente sometidos a baño maría; los porta objetos se depositaron en una cámara húmeda. La formación de un halo rosa alrededor del orificio confirma positivo a la presencia de *S. aureus*.

6.6 Determinación de elementos potencialmente tóxicos (EPT)

Con base en los parámetros establecidos en la norma mexicana NOM-117-SSA1-1994, bienes y servicios (DOF, 1995), se empleó el método de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, fierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y purificada por espectrometría de absorción atómica. La comprobación de la presencia de EPT se basó en hacer pasar un haz de luz monocromática de una frecuencia tal que pueda ser absorbida por el analito que se encuentra presente en forma de vapor atómico. La medida de la intensidad luminosa antes y después de su paso por el vapor atómico permitió determinar el porcentaje de absorción. La cantidad de absorción aumenta con la concentración de los átomos en el medio absorbente, es decir, la medida de la absorción aumenta con la concentración del elemento en la muestra, ya sea que esté en su condición original o sujeta a pretratamiento.

6.6.1 Preparación de muestra

El principio operacional del método de determinación de humedad es utilizando una estufa y balanza analítica, se prepara la muestra, pesa, enfría y la muestra se pesa nuevamente (Nollet, 1996).

Las 18 muestras de queso fresco se les realizó la lectura de pH, se esperó a que las muestras se encontraran a temperatura ambiente y nuevamente se tomó lectura de pH de cada una de las muestras. Subsiguientemente en cápsulas de porcelana previamente secadas y taradas se pesaron 6 g de muestra, las muestras se mantuvieron en una estufa de secado de 50-70 °C durante 20 a 30 días, hasta que las muestras alcanzaran un peso constante (ANEXO 2).

6.6.2 Digestión de la muestra y determinación EPT

Se utilizan 0.5 g de cada muestra de queso con 0% de humedad, añadiéndoles 10 mL de ácido nítrico (HNO₃) de alta pureza, dejándose reposar por 15 min para iniciar a continuación la digestión (Figura 7). Las muestras preparadas se colocaron en el carrusel del horno de microondas (CEM MARS 6) a 200 °C por 20 min, una vez finalizada la digestión se dejan enfriar las muestras durante 15 min (Figura 8) y se

diluyen con 50 mL de agua desionizada para ser filtradas utilizando papel filtro (Whatman #1/125 mm). Los blancos utilizados fueron preparados bajo las mismas condiciones (HNO_3 y agua desionizada) para cada serie de digestión (Figura 9).



Figura 7. Preparación de muestra con HNO_3



Figura 8. Digestión de muestras en el horno de microondas (CEM MARS 6).

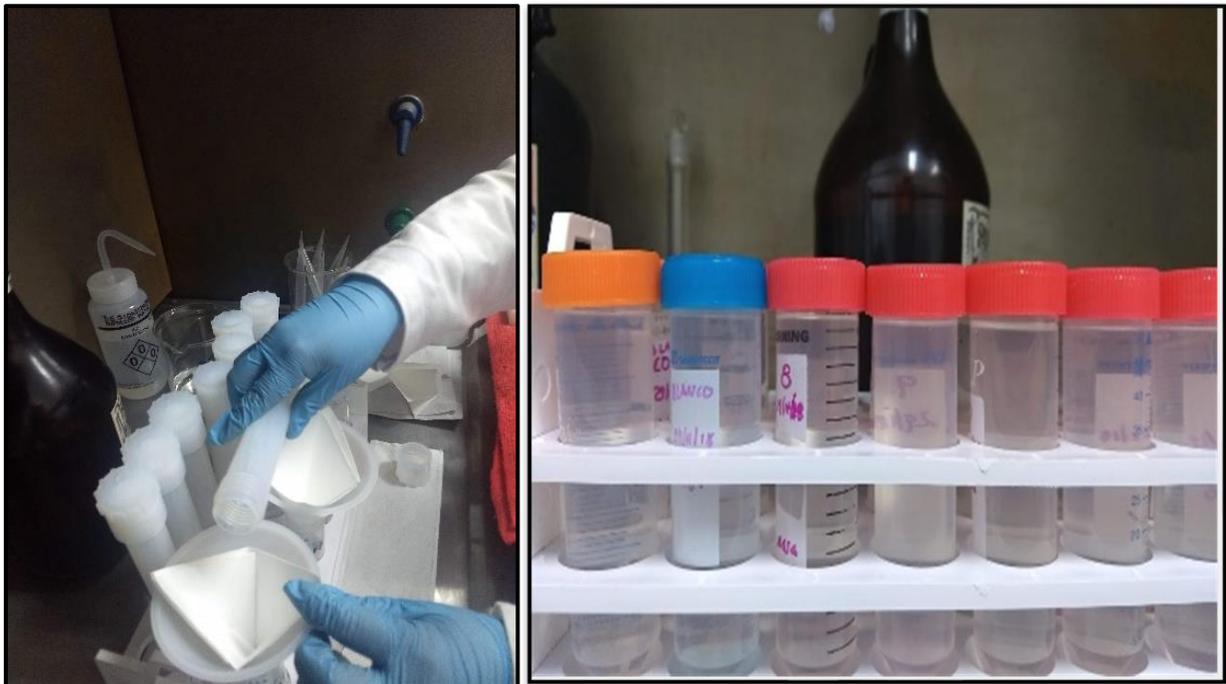


Figura 9. Dilución y filtración de muestra de queso con agua desionizada.

Se realizó una curva de calibración por cada elemento (Cd, Cu, Pb, Mn y Zn), en el espectrómetro de absorción atómica por flama (VARIAN modelo Spectr AA 880) las muestras se introdujeron manualmente comenzando con el blanco y enseguida cada muestra digerida, las lecturas realizadas se hicieron por triplicado en cada una de las muestras y blancos.

6.7 Estimación de riesgo en salud humana

Para determinar el riesgo en salud humana por la presencia de microorganismos y EPT presentes en las muestras de quesos frescos analizadas se consultaron y compararon con los límites máximos permisibles establecidos en las NOM-210-SSA1-1994 y NOM-243-SSA1-2010 (DOF, 2014 y 2010) para análisis microbiológicos, CODEX Alimentarius (CXS 283-1978), NMX-F-317-S-1978 y NOM-116-SSA1-1994 para determinación de pH y humedad (DOF, 1978 y 1995); mientras que los resultados para los EPT se utilizó la ingesta recomendada por diferentes organismos OMS/FAO (2002), ATCDR (2018) y por Research (1997) en consumo de leche.

Por lo tanto, con los datos obtenidos se realizó la estimación de riesgo de acuerdo con la metodología que recomienda la OPS (Díaz, 1999). Se calculó la dosis de exposición, empleando la siguiente fórmula:

$$DE = \frac{(C)(TI)(FE)}{PC}$$

Donde:

DE: Dosis de exposición (mg/kg/día)

C: Concentración del contaminante en el ambiente

TI: Tasa de ingesta

FE: Frecuencia de exposición

PC: Peso corporal

Para la estimación de riesgo individual y poblacional para efectos cancerígenos se empleó la de potencia cancerígena (FPC) aplicándose la siguiente fórmula:

$$\text{Riesgo individual} = \text{DE} * \text{FPC}$$

$$\text{Riesgo poblacional} = \text{Riesgo individual} * \text{total de la población}$$

En tanto la evaluación de riesgo para efectos no cancerígenos se compararon los resultados de la dosis de exposición estimada con el MRL (nivel de riesgo mínimo) aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Riesgo individual} = \text{DE} / \text{MRL} > 1 \text{ RIESGO}$$

$$\text{Riesgo poblacional} = \text{Riesgo individual} * \text{total de la población}$$

7 RESULTADOS

▪ Visitas al área de estudio

Se realizaron tres visitas a cada uno de los mercados (Mercado Sabatino - Tlaxcala, Mercado 12 de Mayo - Apizaco y Mercado Dominical - Santa Ana Chiautempan) recolectando 6 muestras de quesos frescos en cada una de las visitas en diferentes épocas del año, durante el periodo comprendido entre los meses de junio a diciembre de 2018 (Tabla V).

Tabla V. Número total de muestras de quesos frescos recolectadas en los tres mercados.

| | Mercados | | |
|----------------|----------|---------|-----------------------|
| | Tlaxcala | Apizaco | Santa Ana Chiautempan |
| Primera visita | 6 | 7 | 6 |
| Segunda visita | 6 | 4 | 6 |
| Tercera visita | 5 | 6 | 7 |
| Promedio | 6 | 6 | 6 |
| TOTAL | | | 18 |

7.2 Observación de muestras de *E. coli*

Los primeros resultados presuntivos obtenidos del análisis de las diluciones de la 10^{-1} a 10^{-4} de cada una de las 18 muestras, fueron positivos a coliformes totales y fecales con base en la presencia de gas en la campana de fermentación de los tubos Durham (Figuras 4, 10).

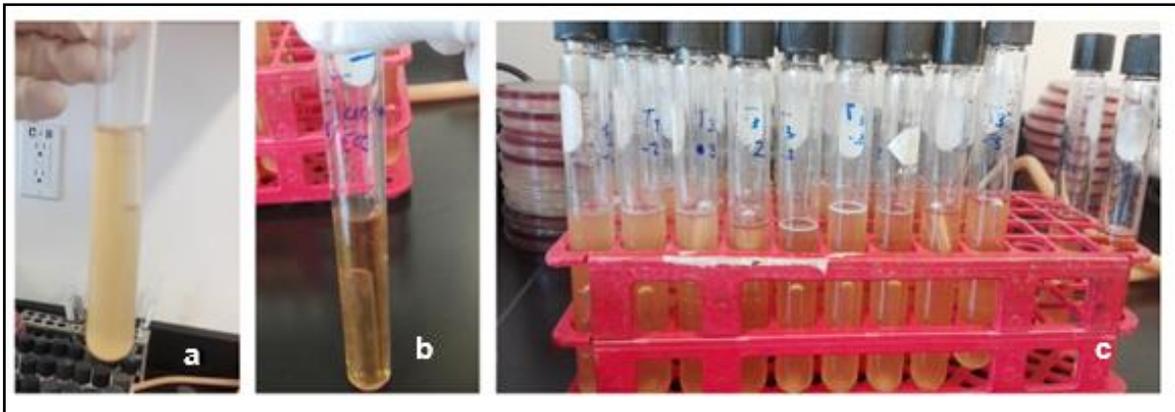


Figura 10 a-c. Resultados positivos a coliformes totales y fecales. a) Positivo a coliforme totales y fecales, presencia de gas en la muestra, b) Control negativo, c) Positivos a coliformes totales y fecales en todas las muestras de quesos.

Después de que cada tubo presentó formación de gas, se sembró en medio de confirmación, para bacterias coliformes totales en caldo Verde Brillante de Bilis y para coliformes fecales en caldo EC (Figura 11). El cambio de color y turbidez en cada uno de los tubos con el medio de cultivo de confirmación muestran positivo a la presencia de microorganismos fecales y totales, en cada una de las diluciones (Tabla VI), el resultado se expresa >1100 NMP/g (Anexo 3).

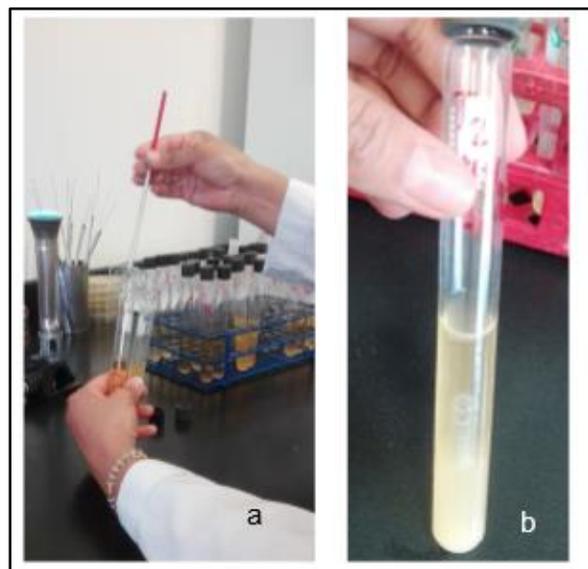


Figura 11. Prueba de confirmación de coliformes totales y fecales. a) Siembra en caldo Verde Brillante de Bilis y caldo EC, b) Confirmación de coliformes totales y fecales.

Tabla VI. Diluciones en caldo verde brillante de Bilis y Caldo EC, para confirmación de coliformes fecales y totales.

| Medio de cultivo | Dilución | Dilución | Dilución | Dilución | Estimación |
|--------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------|
| | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | NMP/g |
| Caldo Verde Brillante de Bilis | Presente | Presente | Presente | Presente | >1100 |
| Caldo EC | Presente | Presente | Presente | Presente | >1100 |

DOF (2015).

En la prueba confirmativa de los tubos de caldo EC se obtuvo positivo a 16 muestras, esto indica que hay presencia de coliformes fecales, sin embargo, las muestras identificadas como A-6 y S-6 indica tuvieron <3 NMP/g (Tabla VII).

Tabla VII. Presencia de coliformes fecales en cada muestra.

| Origen de muestra | Clave de identificación | No. de muestras | Tubos positivos | | | Estimación |
|-----------------------|------------------------------|-----------------|-----------------|---|---|------------|
| | | | | | | NMP/g |
| Apizaco | A-1 A-2, A-3, A-4, A-5 y A-6 | 6/5 | 0 | 0 | 1 | <3 |
| Santa Ana Chiautempan | S-1 S-2, S-3, S-4, S-5 y S-6 | 6/5 | 0 | 0 | 1 | <3 |
| Tlaxcala | T-1 T-2, T-3, T-4, T-5 y T-6 | 6/6 | 3 | 3 | 3 | >1100 |

DOF (2015).

Posteriormente de haber encontrado coliformes fecales en las muestras y de realizar la prueba de confirmación en agar EMB-L se obtuvieron colonias típicas de *E. coli* que también se presentaron en agar cuenta estándar CE (Figuras 12 y 13).



Figura 12. Prueba confirmativa de *E. coli*, en agar EMB-L, colonias con centro negro planas con brillo metálico.



Figura 13. Colonias presentes de *E. coli* en agar Cuenta Estándar (CE)

Por último, una vez aislado el microorganismo en agar (CE), se realizó la prueba de confirmación para *E. coli* por identificación bioquímica cómo lo indica la NOM-210-SSA1-2014 (DOF, 2015) (Figura 14) (Tabla VI).

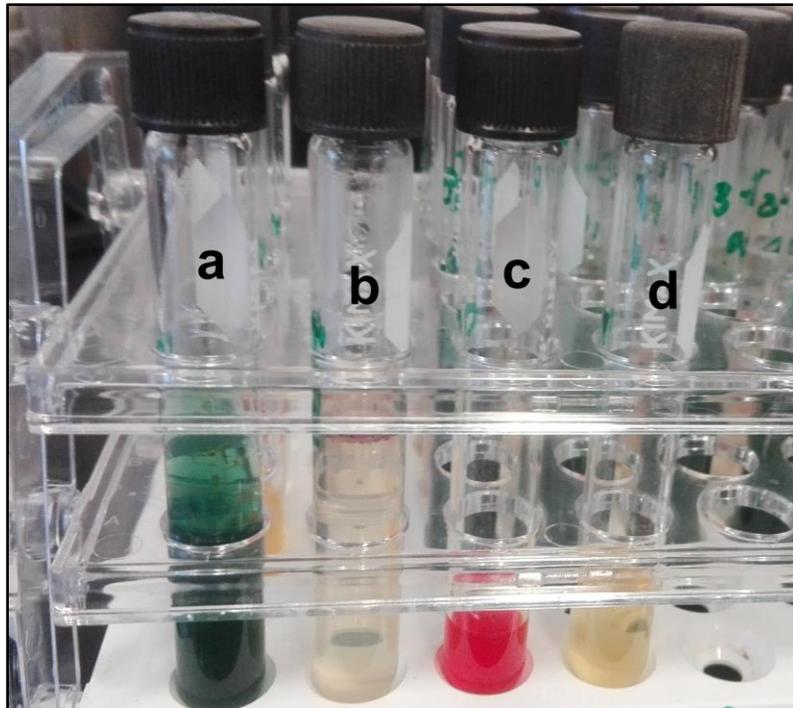


Figura 14. Pruebas de confirmación positivas para *E. coli* (Citrato^a, Indol^b, Rojo de metilo^c y Voges Proskauer^d)

Se destaca que en uno de los seis puestos ambulantes de los mercados de Apizaco (A6-3) y Santa Ana Chiautempan (S6-3) no se encontró presencias de *E. coli* (Tabla VIII), mientras que en las muestras restantes mostraron ser positivo a las pruebas bioquímicas de confirmación a *E. coli*. La interpretación de cada uno de los tubos (cambios de coloraciones) son con base en la NOM-210-SSA1-2014 (DOG, 2015) (ANEXO 4).

Tabla VIII. Resultados confirmativos de presnsencia de *E. coli* en quesos frescos expendidos en los tres mercados municipales enl estado de Tlaxcala en el periodo junio – diciembre 2018..

| | Control | Citrato | Indol | Voges Proskauer | Rojo metilo |
|-------------------------|-------------------------------|---------|-------|-----------------|-------------|
| Origen de la muestra | <i>Escherichia coli</i> | - | + | - | + |
| | <i>Enterobacter aerogenes</i> | + | - | + | - |
| Clave de nuestra | | | | | |
| Apizaco | A1-3 | - | + | - | + |
| | A2-3 | - | + | - | + |
| | A3-3 | - | + | - | + |
| | A4-3 | - | + | - | + |
| | A5-3 | - | + | - | + |
| | A6-3 | + | - | + | - |
| Santa Ana Chiautempan | S1-3 | - | + | - | + |
| | S2-3 | - | + | - | + |
| | S3-3 | - | + | - | + |
| | S4-3 | - | + | - | + |
| | S5-3 | - | + | - | + |
| | S6-3 | + | - | + | - |
| Tlaxcala | T1-3 | - | + | - | + |
| | T2-3 | - | + | - | + |
| | T3-3 | - | + | - | + |
| | T4-3 | - | + | - | + |
| | T5-3 | - | + | - | + |
| | T6-3 | - | + | - | + |

Las pruebas bioquímicas para la confirmación de *E. coli* se interpretan a cada resultado Citrato negativo, Indol positivo, Voges Proskauer negativo y Rojo de metilo positivo. *E. coli* conto con control positivo y negativo *E. aerogenes* para cada prueba.

7.3 Presencia de *S. aureus* en queso

Las características particulares para la identificación de UFC de *S. aureus* con base en la NOM-243-SSA1-2010 (DOG, 2015), son colonias típicas negras, circulares, lisas, con un halo claro alrededor de la colonia, como se muestran en la figura 15.

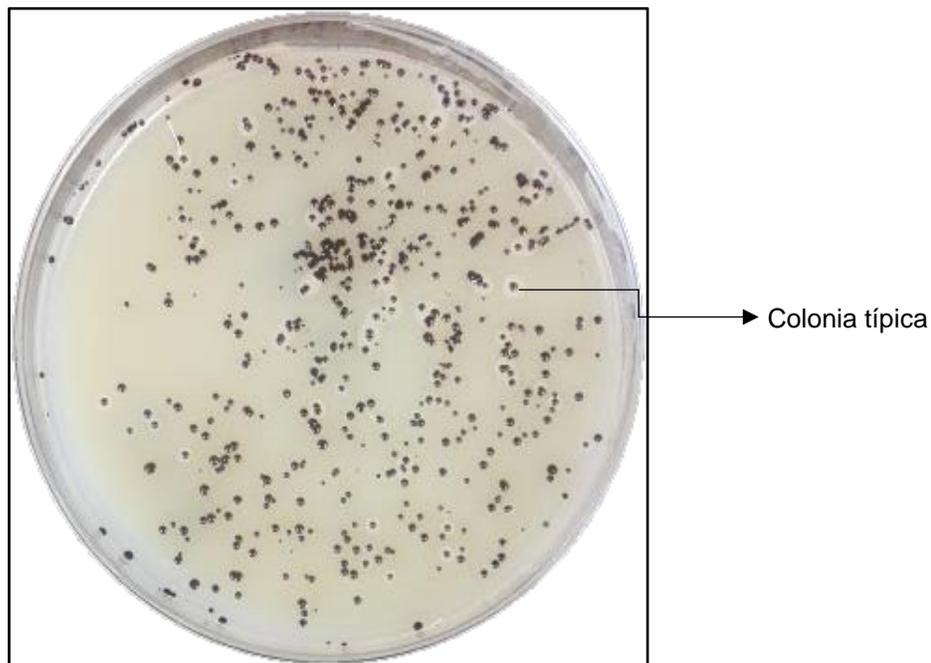


Figura 15. Colonias típicas de *S. aureus* en placas con agar Baird Parker.

Los resultados fueron positivos para la prueba de confirmación coagulasa en 12 muestras de los mercados de Tlaxcala (T-1-3, T2-3, T3-3, T4-3, T5-3 y T6-3) y Santa Ana Chiautempan (S1-3, S2-3, S3-3, S4-3, S5-3y S6-3), en tanto las muestras de Apizaco, solo tres de las mismas presentaron positivo a esta prueba (A1-3, A3-3 y A4-3), al realizar la prueba y después de 24 h la formación del coágulo en el fondo del tubo como se muestra en la figura 16, indica que *S. aureus* se encuentra en las muestras de queso en la tabla IX se especifica cada resultado de cada una de las 18 muestras.

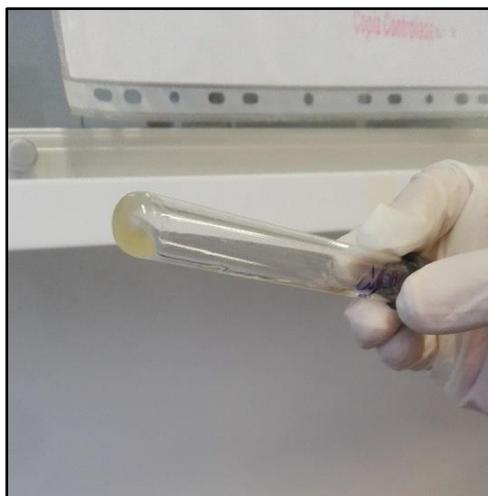


Figura 16. Prueba confirmativa de coagulasa para *S. aureus* en plasma humano.

Tabla IX. Resultados confirmativos de la presencia de *S. aureus* en quesos frescos expedidos en tres mercados municipales del estado de Tlaxcala durante el periodo junio – diciembre de 2018. NOM-210-SSA1-2014 (DOG, 2015).

| Origen de la muestra | Control | Prueba de confirmación | |
|-----------------------|----------------------------------|------------------------|-----------|
| | | Termonucleasa | Coagulasa |
| | <i>Staphylococcus. aureus</i> | + | + |
| | <i>Staphylococcus. epidermis</i> | - | - |
| | Clave de nuestra | | |
| Apizaco | A1-3 | + | + |
| | A2-3 | - | - |
| | A3-3 | + | + |
| | A4-3 | + | + |
| | A5-3 | - | - |
| | A6-3 | - | - |
| Santa Ana Chiautempan | S1-3 | + | + |
| | S2-3 | + | + |
| | S3-3 | + | + |
| | S4-3 | + | + |
| | S5-3 | + | + |
| | S6-3 | + | + |
| Tlaxcala | T1-3 | + | + |
| | T2-3 | + | + |
| | T3-3 | + | + |
| | T4-3 | + | + |
| | T5-3 | + | + |
| | T6-3 | + | + |

Los resultados de confirmación para *S. aureus* en la prueba de termonucleasa presentados en la figura 17, muestran una coloración rosada alrededor del inóculo; en el mercado de Apizaco las muestras A2-3, A5-3 y A6-3 mostraron resultados negativos a la presencia de *S. aureus*, señalados en la tabla IX. Los resultados de confirmación o de ausencia de este microorganismo en cada muestra se interpretaron conforme a la NOM-210-SSA1-2014 (DOG, 2015) (ANEXO 5).



Figura 17. Prueba confirmativa termonucleasa para *S. aureus* en agar azul ADN (Coloración rosa).

Una vez que se identificaron las colonias de *S. aureus* se realizó un conteo de placas por duplicado de cada muestra, donde se seleccionaron las placas que tuvieran entre 15 a 150 UFC de los tres diferentes sitios; las muestras se contabilizaron en la dilución 10^{-3} y 10^{-4} obteniendo un conteo entre 30 y 35 UFC. El resultado del conteo indica el número de unidades formadoras de colonias por cada gramo o mililitro (UFC/g o mL) en la muestra, la tabla X indica el número de colonias del microorganismo.

Tabla X. Estimación de UFC/g de *S. aureus* en quesos frescos.

| Origen de la muestra | Código de identificación | UFC/g o mL | NOM-243-SSA1-2010 |
|-----------------------|--------------------------|------------|-------------------|
| Apizaco | A-1 | <100 | 100 UFC/g |
| | A-2 | <100 | |
| | A-3 | <100 | |
| | A-4 | <100 | |
| | A-5 | <100 | |
| | A-6 | <100 | |
| Santa Ana Chiautempan | S-1 | <100 | |
| | S-2 | 370 000 | |
| | S-3 | 340 000 | |
| | S-4 | <100 | |
| | S-5 | <100 | |
| | S-6 | <100 | |
| Tlaxcala | T-1 | 60 000 | |
| | T-2 | 70 000 | |
| | T-3 | 200 000 | |
| | T-4 | <100 | |
| | T-5 | 1 500 000 | |
| | T-6 | 1 200 000 | |

Estimación de UFC de *S. aureus*, según el Apéndice B Normativo de la NOM-210-SSA1-2014 (DOF, 2015) y NOM-115-SSA1-1994 (DOF, 1995).

Las muestras del mercado de Tlaxcala sobrepasaron las 100 UFC/g límites máximos permitidos por la NOM-210-SSA1-2014 (DOF, 2015). Los valores de del sitio de Tlaxcala T-1 contó con 60 000 UFC/g, T-2 70 000 UFC/g, T-3 200 000 UFC/g, T-5 1 500 000 UFC/g y T-6 1 200 000 UFC/g, asimismo, dos puntos de venta del mercado de Santa Ana Chiautempan los S-1 y S-2 con 340 000 y 370 000 UFC/g, respectivamente, y en todas las muestras del mercado de Apizaco se encontraron entre los límites permisibles para consumo y venta del producto.

7.4 Determinación de humedad y pH

La humedad calculada para cada uno de los quesos osciló entre el 42.40 y 60.91%, al compararlos con los valores establecidos en la NMX-F-092-1970 (DOF, 1970), reporta que la humedad mínima requerida para quesos frescos debe de ser 45% y máximo de 65 %, por otra parte el CODEX Alimentarius (2018) reporta valores de 54 a 69% de contenido de humedad para queso fresco, por contener un alto porcentaje de agua estos alimentos se ven favorecidos por la presencia de microorganismos, en la tabla XI, se muestra la comparación en porcentaje de humedad de las muestras de origen con la Norma mexicana y el Codex Alimentarius. La materia seca se empleó para el análisis de determinación de los elementos potencialmente tóxicos (EPT).

Tabla XI. Determinación de humedad, para quesos frescos, en comparación con la NMX-116-SSA1-1994 y CXS 283-1978.

| Origen de la muestra | Clave de identificación | Humedad % | CXS 283-1978 | | NOM-116-SSA1-1994 | |
|-----------------------|-------------------------|-----------|--------------|--------|-------------------|--------|
| | | | mínima | máxima | mínima | máxima |
| Apizaco | A1 | 57.79 | | | | |
| | A2 | 60.91 | | | | |
| | A3 | 51.92 | | | | |
| | A4 | 57.27 | | | | |
| | A5 | 57.63 | | | | |
| | A6 | 53.02 | | | | |
| Santa Ana Chiautempan | S1 | 50.14 | | | | |
| | S2 | 42.40 | | | | |
| | S3 | 56.67 | 54% | 69% | 45% | 65% |
| | S4 | 54.97 | | | | |
| | S5 | 56,78 | | | | |
| | S6 | 56.32 | | | | |
| Tlaxcala | T1 | 56.83 | | | | |
| | T2 | 55.26 | | | | |
| | T3 | 57.05 | | | | |
| | T4 | 59.99 | | | | |
| | T5 | 60.30 | | | | |
| | T6 | 55.39 | | | | |

CXS 283-1978 (CODEX, 2018) y NMX-116-SSA1-1994 (DOF, 1978).

Ramírez y Vélez (2012) mencionaron que entre más baja sea la temperatura en alimentos frescos, se limita la actividad microbiana dentro del alimento, además el sabor y la textura de los quesos es el resultado del control de la temperatura y pH, asegurando así el cumplimiento de estándares de calidad. El pH de las dieciocho muestras osciló entre 4.2 y 6.2, especificados en la tabla XII.

Las muestras A-1, A-5 y A-6 provenientes del mercado de Apizaco contaron con valores de pH 6.35, 6.01 y 6.1; las muestras de Santa Ana Chiautempan el pH fue de 4.9 en la muestra S-3 y S-6 con un pH 6.09, por último las muestras de Tlaxcala T-5 y T-6 cuentan con valores de pH 6.15 y 6.05, que en comparación con la NMX-F-317-1978 (DOF, 1978) las muestras descritas se encuentran diferenciadas de lo establecido por la normatividad.

Tabla XII. Determinación de pH y temperatura de los quesos frescos recolectados en tres mercados; Apizaco, Santa Ana Chiautempan y Tlaxcala. NMX-F-317-1978 (DOF, 1978).

| Origen de la muestra | Clave de identificación | pH | Temperatura °C | NMX-F-317-1978 | |
|-----------------------|-------------------------|------|----------------|----------------|--------|
| | | | | mínima | máxima |
| Apizaco | A-1 | 6.35 | 17.5 | 5 | 6 |
| | A-2 | 5.75 | 17 | | |
| | A-3 | 5.2 | 18.5 | | |
| | A-4 | 5.85 | 19.2 | | |
| | A-5 | 6.01 | 15.8 | | |
| | A-6 | 6.1 | 15.7 | | |
| Santa Ana Chiautempan | S-1 | 5.5 | 19.1 | 5 | 6 |
| | S-2 | 5.0 | 19.2 | | |
| | S-3 | 4.9 | 19.2 | | |
| | S-4 | 5.62 | 15.7 | | |
| | S-5 | 5.93 | 15.6 | | |
| | S-6 | 6.09 | 15.8 | | |
| Tlaxcala | T-1 | 5.4 | 17.3 | 5 | 6 |
| | T-2 | 5.55 | 17.4 | | |
| | T-3 | 5.85 | 17.4 | | |
| | T-4 | 6.0 | 11.9 | | |
| | T-5 | 6.15 | 13.2 | | |
| | T-6 | 6.05 | 12.2 | | |

NMX-F-317-1978 (DOF, 1978).

7.5 Concentración y estimación de riesgo a la salud de EPT

Los elementos como el cadmio, cobre, manganeso y plomo no fueron detectados por el equipo, debido al límite de detección del espectrofotómetro de absorción atómica con atomizador de flama, el equipo mide ppm o los EPT no se encuentran presentes en el queso.

Sin embargo, el elemento Zinc se encontró en todas las muestras analizadas, en la tabla XIII se indica la concentración en mg/kg del elemento en la muestra de quesos,

posteriormente en la cuarta columna se indica el contenido de Zn en leche en mg/L, enseguida se muestra la ingesta recomendada en humanos de este elemento mg/kg, de acuerdo con la edad y género por último el MRL que es un indicativo de riesgo individual del elemento en humanos.

Tabla XIII. Comparación de concentraciones de Zinc (mg/kg), con ingesta recomendada por edad y MRL en muestras de quesos frescos recolectados de tres mercados, Apizaco, Santa Ana Chiautempan y Tlaxcala.

| Origen de la muestra | Clave de identificación | Concentración mg/kg | Leche mg/litro | Ingesta recomendada mg/kg | Edad y genero | MRL |
|-----------------------|-------------------------|---------------------|----------------|---------------------------|------------------------|---------------|
| Apizaco | A-1 | 19.36 | | | | |
| | A-2 | 19.56 | | 1.1-11.3 | 0 a 9 años | |
| | A-3 | 23.94 | | | | |
| | A-4 | 27.40 | | | | |
| | A-5 | 21.00 | | | | |
| | A-6 | 23.67 | | 15.5 | 10-18 años niñas | |
| Santa Ana Chiautempan | S-1 | 29.84 | | | | |
| | S-2 | 25.33 | | | | |
| | S-3 | 21.27 | | | | |
| | S-4 | 17.29 | | 19.2 | 10-18 años niños | 0.3 mg/kg/día |
| | S-5 | 20.73 | 3.92 | | | |
| | S-6 | 17.51 | | | | |
| Apizaco | T-1 | 17.99 | | 9.8-16.3 | 19 a 65 años mujeres | |
| | T-2 | 22.80 | | | | |
| | T-3 | 14.12 | | 9.8 | Más de 65 años mujeres | |
| | T-4 | 11.33 | | | | |
| | T-5 | 25.18 | | | | |
| | T-6 | 29.14 | | 14 | 19 a 65 años hombres | |

(Research, 1997; OMS/FAO, 2002; ATCDR, 2018).

Debido a que la concentración de zinc se encuentra por arriba de la ingesta recomendada de los diferentes grupos, se procedió a realizar una estimación de riesgo a la salud humana, de acuerdo con la metodología recomendada por la OPS para infantes (3-6 años), niños (10-14 años) y adultos.

Se comenzó calculando la dosis de exposición que pueden tener al día cada uno de los tres grupos, utilizando las diferentes variantes concentración del contaminante, tasa de ingesta, frecuencia de exposición y el peso corporal promedio. La dosis de exposición en cada una de las diferentes edades se presenta en la tabla XIV, esto indica los miligramos a los que está expuesto el ser humano a Zn al día, dependiendo el peso.

Por otra parte, a partir del MRL del Zn 0.3 mg/kg/día (dosis de referencia) se calculó el efecto cancerígeno y el no cancerígeno individual, tomando en cuenta la dosis de exposición. En la misma tabla se encuentran los valores de riesgo no cancerígeno menores a 1 esto indica que no existe algún riesgo cancerígeno en la salud por consumo de este alimento.

Tabla XIV. Estimación de riesgo infantil (3-6 años), niños (10-14 años) y adultos.

| Muestra de queso | Concentración | | Dosis de exposición | | | Efecto Cancerígeno riesgo individual | | | Efecto no cancerígeno riesgo individual | | | |
|------------------|-------------------------|-----------|---------------------|--------------------|-----------------|--------------------------------------|-----------|-----------|-----------------------------------------|----------|-------|---------|
| | Clave de identificación | mg/kg | MRL | Infantes mg/kg/día | Niños mg/kg/día | Adultos mg/kg/día | Infantes | Niños | Adultos | Infantes | Niños | Adultos |
| A1 | 19.36 | | | 0.010 | 0.007 | 0.001 | 8.084E-03 | 5.774E-03 | 1.155E-03 | 0.001 | 0.027 | 0.019 |
| A2 | 19.56 | | | 0.010 | 0.007 | 0.001 | 8.166E-03 | 5.833E-03 | 1.167E-03 | 0.001 | 0.027 | 0.019 |
| A3 | 23.94 | | | 0.012 | 0.009 | 0.002 | 9.996E-03 | 7.140E-03 | 1.428E-03 | 0.001 | 0.033 | 0.024 |
| A4 | 27.40 | | | 0.014 | 0.010 | 0.002 | 1.144E-02 | 8.172E-03 | 1.634E-03 | 0.002 | 0.038 | 0.027 |
| A5 | 21.00 | | | 0.011 | 0.008 | 0.002 | 8.767E-03 | 6.262E-03 | 1.252E-03 | 0.001 | 0.029 | 0.021 |
| A6 | 23.67 | | | 0.012 | 0.009 | 0.002 | 9.884E-03 | 7.060E-03 | 1.412E-03 | 0.001 | 0.033 | 0.024 |
| S1 | 29.84 | | | 0.015 | 0.011 | 0.002 | 1.246E-02 | 8.901E-03 | 1.780E-03 | 0.002 | 0.042 | 0.030 |
| S2 | 25.33 | | | 0.013 | 0.009 | 0.002 | 1.058E-02 | 7.554E-03 | 1.511E-03 | 0.002 | 0.035 | 0.025 |
| S3 | 21.27 | 0.3 | | 0.011 | 0.008 | 0.002 | 8.883E-03 | 6.345E-03 | 1.269E-03 | 0.001 | 0.030 | 0.021 |
| S4 | 17.29 | mg/kg/día | | 0.009 | 0.006 | 0.001 | 7.219E-03 | 5.156E-03 | 1.031E-03 | 0.001 | 0.024 | 0.017 |
| S5 | 20.73 | | | 0.010 | 0.007 | 0.001 | 8.655E-03 | 6.182E-03 | 1.236E-03 | 0.001 | 0.029 | 0.021 |
| S6 | 17.51 | | | 0.009 | 0.006 | 0.001 | 7.310E-03 | 5.221E-03 | 1.044E-03 | 0.001 | 0.024 | 0.017 |
| T1 | 17.99 | | | 0.009 | 0.006 | 0.001 | 7.513E-03 | 5.367E-03 | 1.073E-03 | 0.001 | 0.025 | 0.018 |
| T2 | 22.80 | | | 0.011 | 0.008 | 0.002 | 9.520E-03 | 6.800E-03 | 1.360E-03 | 0.001 | 0.032 | 0.023 |
| T3 | 14.12 | | | 0.007 | 0.005 | 0.001 | 5.896E-03 | 4.211E-03 | 8.422E-04 | 0.001 | 0.020 | 0.014 |
| T4 | 11.33 | | | 0.006 | 0.004 | 0.001 | 4.732E-03 | 3.380E-03 | 6.760E-04 | 0.001 | 0.016 | 0.011 |
| T5 | 25.18 | | | 0.013 | 0.009 | 0.002 | 1.051E-02 | 7.511E-03 | 1.502E-03 | 0.002 | 0.035 | 0.025 |
| T6 | 29.14 | | | 0.015 | 0.010 | 0.002 | 1.217E-02 | 8.691E-03 | 1.738E-03 | 0.002 | 0.041 | 0.029 |

(OPS, 2008; ATCDR, 2018).

8 DISCUSIÓN

De acuerdo con los datos obtenidos de los análisis microbiológicos realizados en quesos frescos, hay presencia de *E. coli* en un 80 % de las dieciocho muestras analizadas, pone en manifiesto que en los diferentes pasos de los procesos de fabricación como en el manejo, condiciones ambientales e higiene en que se oferta el alimento, tienen los medios necesarios para desarrollarse.

Sin embargo, Martínez *et al.* (2013) observaron que 73 muestras analizadas de quesos frescos en regiones de Cuba, solo presentaron el 14% positivo a *E. coli*, lo cual, lo atribuyeron al ambiente (local) en que se producen, elaboración manual, uso de herramientas tradicionales y fermentación espontánea, elementos que afectan la calidad e inocuidad de quesos frescos. Por otra parte, Duran *et al.* (2010) encontraron en 16 muestras analizadas presencia de este microorganismo, mencionan que se debe a la contaminación fecal y manipulación del alimento; quienes favorecen el crecimiento microbiano en queso.

A pesar de que solo tres muestras de queso en Apizaco mostraron negativo a pruebas de confirmación (A-2, A-5 y A-6) coagulasa y termonucleasa, la estimación de UFC/g para esas muestras fueron <100, indican que están por debajo de la NOM-243-SSAI-2010 (DOF; 2015) por ello se descarta un riesgo en la salud microbiológico (intoxicación) por ingesta de queso.

Mientras que las muestras de Tlaxcala (T-1, T-2, T-3, T-5 y T-6) tienen una media de 606 000 UFC/g y en Santa Ana Chiautempan (S-2 y S3) tienen en promedio de 355 000 UFC/g, ambos sitios sobrepasan la cantidad de *S. aureus* por la FDA (2003) quien establece que un alimento con 10^5 UFC/g es suficiente para causar síntomas de intoxicación, en tanto la NOM-243-SSAI-2010 (DOF; 2015) establece LMP ≤ 100 UFC/mL en un queso fresco. Por otra parte, los reportes de Pazmiño *et al.* (2016) y del Instituto Nacional de Salud (2011) en Colombia solo presentan resultados positivos a este microorganismo en pruebas de confirmación obteniendo solo resultados cualitativos.

El pH del queso fresco se encontró entre 4.9-6.35 dentro lo recomendable por la normatividad NMX-F-317-1978 (DOF, 1978) y CXS 283-1978 (CODEX, 2018) quienes establecen para este alimento un pH 5-6. El porcentaje de humedad se encontró entre 42.40 – 60.91 % parámetros recomendables por el CODEX, 2018 con 54-69 % y 45-65 % por la NOM-116-SSA1-1994 (DOF; 1997).

El reporte presentado por López *et al.* (2012) determinaron que los métodos y factores que afectan la calidad de quesos son un pH >6.1 y un porcentaje de humedad de 46-57% para queso fresco, mientras que Díaz *et al.* (2017) presentaron una caracterización de quesos los valores presentados de pH 5.0-5.2 y humedad 50.1-53.8% en 52 tianguis y 4 mercados fijos del estado de México, concluyen su investigación que la calidad de la leche, la disminución de pH, adición de sal, la microbiota nativa de la leche y del medio, modifican la composición química y las condiciones reológicas de la pasta, modificando las características del queso.

Los EPT Cd, Cu, Mn y Pb no fueron detectados por el espectrofotómetro, en cambio Zn se encuentra en cantidad por arriba del límite de ingesta reportados por OMS/FAO (2002) para niños; la ingesta recomendada para este grupo de personas es de 15.5 mg/kg entre edades de 10 a 18 años, los resultados presentados de los tres sitios, la concentración de Zn sobre pasan la ingesta en cada muestra; sin embargo la Dosis de Riesgo Mínimo (MRL) es 0.3 mg/kg/día es una dosis teórica realizado por la EPA (2000) a través de curvas de dosis-respuesta, como resultado de la estimación a la exposición diaria para humanos incluyen poblaciones sensibles a las que no se observan efectos adversos.

El Zinc que se encontró en todas las muestras analizadas, en comparación con la ingesta recomendada para el consumo de leche este elemento se presenta con 3.92 mg/L (Research, 1997); mientras que la OMS y la FAO (2002), reportan valores para diferentes edades y géneros para su ingesta 1.1 – 11.3 mg/kg para infantes de 0 a 9 años, 15.5 mg/g para niñas de 10 a 18 años, 19.2 mg/kg para niños de 10 a 18 años, 9.8 – 16.3 a mujeres de 19 a 65 años, 9.8 para mujeres con más 65 años y 14 mg/kg para hombres de 19 – 65 años. El MRL reportado por ATCDR (2018), menciona que la ingesta recomendada es 0.3 mg/kg/ día.

En tanto Gaona (2011) determinó peligros químicos en queso Cotija, en la sierra Jalisco-Michoacán, el cual presentó concentraciones de As y Pb 0.5 y 0.1 ppm, respectivamente; por otra parte, Maas *et al.*, (2011) realizaron una evaluación de la leche cruda utilizada para la producción de queso en Francia, encontrando concentraciones de Zn entre 20 y 30 mg/mL, sin embargo, las concentraciones en el producto final (queso) fueron superiores a las iniciales (33 - 41 mg/g).

En la estimación de riesgo humano calculado por cada muestra de cada sitio los resultados presentados indican que tanto en niños como en adultos no representan un riesgo a la salud por la ingesta de Zn en queso, la DE en niños se encuentra entre 0.004-0.011 mg/kg/día y en adultos 0.001-0.002 mg/kg/día, calculando el riesgo no cancerígeno resultaron valores <1 por lo cual no representan un riesgo a la salud, este estudio coincide con lo realizado por Castro *et al.* (2017) quien evaluó el riesgo en la salud de los niños por consumo de leche de vaca en áreas contaminadas en Puebla y Tlaxcala, los elementos medidos por espectrofotometría fueron Cd, Pb, Ni, Cu, Cr y Zn. Aunque encontró concentraciones de los elementos, al evaluar el riesgo en salud humana los valores estuvieron menores a 1.

9 CONCLUSIONES

Se detectó la presencia *E. coli* en las muestras procedentes de los tres mercados, sin embargo, estuvo ausente en dos muestras: A-6 de Apizaco y la S-6 de Santa Ana Chiautempan.

El conteo en placa de las UFC de *S. aureus* en las muestras procedentes del mercado de Apizaco, fueron <100 UFC/g, lo cual indica que no representan un riesgo a la salud de acuerdo con la NOM-243-SSAI-2010; sin embargo, las muestras A-1, A-3 y A-4 resultaron ser positivas a las pruebas de confirmación de termonucleasa y coagulasa.

Las muestras S-2 y S-3 provenientes del mercado de Santa Ana Chiautempan formaron 370 000 y 340 000 UFC/g de *S. aureus*, respectivamente, asimismo, cinco de las seis muestras analizadas del mercado de Tlaxcala (T-1, T-2, T-3, T-5 y T-6) presentaron valores entre 60 000 y 1500 000 UFC/g, los cuales representan un riesgo para la salud pública con base en lo establecido por la NOM-243-SSAI-2010 (DOF, 2015) y la FDA (2003).

Los factores extrínsecos como el aire, polvo y manejo del producto, además de los intrínsecos como la humedad, temperatura y pH del queso, favorecieron el desarrollo y presencia de los microorganismos patógenos (*E. coli* y *S. aureus*).

En las 18 muestras de queso analizadas, no se encontró la presencia de EPT como el Cd, Cu y Pb. Sin embargo, las concentraciones de Zn presentaron valores altos de concentración entre 11.33 y 29.84 mg/kg en todas las muestras analizadas. Pero al realizar la evaluación de riesgo en salud humana tanto en niños como adultos, los valores presentados no indican riesgo cancerígeno.

10 RECOMENDACIÓN

Por último, se exhorta a que se sigan realizando más investigaciones en diferentes matrices para poder monitorear y vigilar las zonas de riesgo a la salud y así realizar una caracterización completa de riesgo sanitario y de presencia de EPT.

11 LITERATURA CITADA

- ATSDR (2008) Public Health Assessment Guidance Manual. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). [www.atsdr. cdc.gov/ H AC / PH A ma nual /index. html#foreword](http://www.atsdr.cdc.gov/HAC/PHAMa nual /index. html#foreword)
- Agencia de Servicios a la Comercialización y Desarrollo de Mercados Agropecuarios ASERCA. 2013. Bolsas de productos agrícolas en Latinoamérica y el caribe. *Revista Claridades Agropecuarias*, 240(3), 28-77. Recuperado el 1 de diciembre de 2017, de <http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/revistas/240/ca240-28.pdf>
- Alais C. 2003. Ciencia de la leche. Principios de Técnica lechera. Barcelona.
- Baduí D. S. 2006. Química de los alimentos. Pearson, 5ta ed. México, D.F. pp. 603-628.
- Bisso A. A. 2011. Antibioticoterapia en las infecciones graves. *Acta Médica Peruana*, 28(1), 27-38. Recuperado el 07 de octubre de 2019, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172011000100006&lng=es&tlng=es.
- Caballero T.A., Carrera V.A., Legomin F.E. 1998. Evaluación de la vigilancia microbiológica de alimentos que se venden en las calles. *Revista Cubana Alimentaria Alimentación y Nutrición* 12(1) 7-10.
- Camacho A, Giles M, Ortegón A, Palao M, Serrano B y Velázquez. 2009. Técnicas para el análisis Microbiológico de Alimentos. 2da. Edición Facultad de Química, UNAM. México.
- Canfield R.L., Henderson C.R., Cory-Slechta D.A., Cox C., Jusko T.A., Lanphear B.P. 2003. Deterioro intelectual en niños con concentraciones de plomo en sangre inferiores a 10 microgramos por decilitro. *N. Eng. J. Med.* 348: 1517-1526.
- Codex. 1999. Principios y directrices para la realización de la evaluación microbiológica del riesgo CAC/GL-30. Recuperado el 24 de enero de 2020, de http://www.fao.org/docs/eims/upload/215254/CAC_G L30.pdf.
- Charley H. 2007. Tecnología de Alimentos. Procesos químicos y físicos en la preparación de alimentos. Limusa. México, D.F. pp. 411-433.
- Diario Oficial de la Federación. 1970. Norma Oficial Mexicana. NMX-F-092-1970. Calidad para quesos procesados.

- Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana. 1978. NOM-F-317-S-1978. Determinación de pH en alimentos. Determination of pH in foods. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
- Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana. 1995. NOM-115-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos.
- Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana. 1995. NOM-116-SSA1-1994 Bienes y servicios. determinación de humedad en alimentos por tratamiento térmico. Método por arena o gasa.
- Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana. 1995. NOM-117-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, hierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrometría de absorción atómica.
- Diario Oficial de la Federación. 1996. Norma Oficial Mexicana. NOM-121-SSA1-1994, Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados.
- Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana. 2010. NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Clasificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
- Diario Oficial de la Federación. 2012. Norma Oficial Mexicana Nom-155-SCFI-2012. "Leche-Denominaciones, Especificaciones Fisicoquímicas, Información Comercial y Métodos De Prueba".
- Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana. 2015. NOM-210-SSA1-2014. Productos y servicios. Métodos de pruebas microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores determinación de microorganismos patógenos.
- Diario Oficial de la Federación, 2019. Norma Mexicana NOM-F-735-COFOCALEC-2018, Sistema producto leche-alimento-lácteo-alimento lácteo regional-queso Cotija artesanal madurado-denominación, especificaciones y métodos de prueba.
- Díaz-Barriga F (1999) Metodología de Identificación y Evaluación de Riesgos para la Salud en Sitios Contaminados. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente. OPS/CEPIS/PUB/99.34. WHO. Perú.

- Díaz, G.P.E., Valladares, C. B., Del Carmen, G. A., Arriaga, J. C. M., Quintero, S. B., Cervantes, A. P. y Velázquez, O. V. 2017. Caracterización de queso fresco, comercializado en mercados fijos y populares de Toluca, Estado de México. *Rev. Mex.Cienc. Pecu.* 8(2):139-146
- Doyle M, Beuchat L, Montville T. 2001. *Microbiología de los Alimentos. Fundamentos y Fronteras.* Editorial Acribia. Zaragoza, España. pp.371-393.
- Durán L. M., Montero C. P., Flores D. W. Franco de la H. V. y Coneo R. R. 2010. Evaluación Higiénico- sanitaria y acción antagónica de cepas de *Lactobacilos* comerciales frente a organismos patógenos (*Escherichia coli*) Presentes en el queso de capa del municipio de Mompox. Colombia. 3:312-317
- Eck, A. 1990. *El queso tradicional* por Josép Mestres. Omega. Barcelona.
- EPA 2004. Risk Assessment Guidance for Superfund. Volume I-Human Health Evaluation Manual. U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC, EEUU. www.epa.gov/superfund/index.htm.
- FAO/OMS. 2000. Informe de la 32ª Reunión del comité CODEX sobre aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos. Recuperado el 1 de septiembre de 2017, de www.codexalimentarius.net.
- FAO. 2011. Serie Buenas Prácticas de Manejo de la leche. Manual de procesos para la elaboración de productos lácteos. Recuperado el 11 de septiembre de 2017 de <https://www.fao.org/3/a-b09545.pdf>
- FAO. 2016. Prevención de la *E. coli* en los Alimentos. Recuperado el 13 de septiembre de 2017 de http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecoli_es.pdf
- Forbes B.A., Sahm D. y Weissfeld A. 2009. Baile & Scott. Diagnóstico Microbiológico. Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Fundación Vasca para la seguridad agroalimentaria, Elika. 02013. *Staphylococcus aureus*. Recuperado el 24 de enero de 2020 de http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/Documento95/7.Staphylococcus.pdf
- Galán H. E, y Romero B. A. 2008. Contaminación de suelos por metales pesados. *Revista de la Sociedad Española de mineralogía.* 10:48-60.
- Gaona, S.V.A. 2011. Determinación de peligros químicos en queso Cotija. Tesis de Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable. Centro Interdisciplinario para el Desarrollo Integral Regional Unidad Michoacán. Instituto Politécnico Nacional.

- Garzón, T., (2009). La inocuidad de alimentos y el comercio internacional. *Revista Colombiana Ciencias Pecuarias*, 22(3), 330-338.
- García-Vargas G.G., Rubio-Andrade M., Del Razo L.M., Borja-Aburto V., Vera-Aguilar E., Cebrián M.E. 2001. Lead exposure in children living in a smelter community in region Lagunera, Mexico. *J. Toxicol. Env. Health*. 62: 417-429.
- Hart, F.L., 1991. Análisis de los alimentos. Acribia, S.A. Zaragoza. España.
- Hernández-Betancourt O., Ulloa-Cuesta Y., Del Río-Méndez D., Galdós M. *Staphylococcus aureus* y su identificación en los laboratorios microbiológicos. 2005. Recuperado el 24 de enero de 2020 de <http://www.amc.sld.cu/amc/2005/v9n1/997.htm>
- Ilizaliturri-Hernández, C., González-Mille D., Pelallo-Martínez N., Domínguez G. Mejía-Saavedra J. Torres-Dosal A. Pérez-Maldonado I., Batres-Esquivel L., Díaz-Barriga F. y Espinosa-Reyes G. 2009. Revisión de las metodologías sobre evaluación de riesgos en salud para el estudio de comunidades vulnerables en América Latina. *Rev. Int.*34:710-717.
- Hwang, C.H. y Gunasekaran, S. 2001 *Measuring crumbliness of some comercial Queso Fresco-type Latin American cheeses*. *Milchwissenschaft*. 56(8):446-450
- Keating, P. F. 1992. Introducción a la lactología. Limusa. México.
- Joshaghani H.R., Ahmadi A.R., Mansourian A.R. 2007. Efectos de la exposición ocupacional en la planta de pesticidas en el suero de los trabajadores y la actividad de la colinesterasa de eritrocitos. *Int J Occup Med. Env. Salud* 20: 381-385.
- Kérouanton A, Hennekinne JA, Letertre C, Petit L, Chesneau O, Brisabois A, De Buyser ML. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int J Food Microbiol*. 115(3):369-75
- Klaassen, C.D., Watkins J. B. Casarett L.J. Doull J. (2013). Manual de toxicología Casarett y Doull: la ciencia básica de los tóxicos. Octava edición. Nueva York: McGraw-Hill.
- Larousse cocina. 2017. Recuperado el 13 de septiembre de 2017, de <https://www.laurossecocina.mx/definiciónquesosgenuino>
- Lee C. 2002. Environmental justice: building a unified vision of health and the environmental. *Env. Health Persp*. 110: 141-143.

- Llobet J., Martí-Cid R., Castell V. y Domingo J. (2008). Tendencia decreciente en la exposición humana a PCDD/PCDF y PCB en Cataluña, España. *Cartas de Toxicología*, 178:117-126. doi:10.1016/j.toxlet.2008.02.012.
- Londoño F. L. F., Londoño M. P. T. y Muñoz G. F. G. 2016. Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal. 14:145 -153.
- López O. M. 2004. Mejoramiento de vida de anaquel en queso tradicional ranchero y queso de pasta hilada (Oaxaca). Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Iberoamericana.
- López, R.C. y Véñlez, R. J.F. 2012. Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 6-12(2012)131-148.
- MacFaddin 2004. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Marescotti A. 2006. El tamaño de la Tipología de Productos Agroalimentarios. Guía para la Valoración de Productos Agroalimentarios Típicos (conceptos, métodos y herramientas). Manual. Florencia, Italia. ARSIA.
- Martínez A, Villoch A, Ribot A, Ponce P. 2013. Evaluación de la calidad e inocuidad de quesos frescos artesanales de tres regiones de una provincia de Cuba. *Rev. Salud Anim.* 35(3):210-213.
- Martínez V.A., Montes. De O. N y Villoch C. A.2016. Determinación de indicadores sanitarios en quesos artesanales. *Rev. Salud Anim.* 38:64-66
- Mensah P., Yeboah-Manu. D., Owusu-Darko. K. y Ablordey A. (2002). Street foods in Accra, Ghana: how safe are they? *Bull Wolth Organ*, 80(7): 546-554.
- Meyer, M. 1987. Elaboración de productos lácteos. Trillas. México.
- Mohamadreza, 2015. Niveles de algunos metales pesados en la leche de vaca cruda de sitios de producción de leche seleccionados en Irán: ¿hay alguna preocupación de salud? 2015; 5 (3): 176 - 182.
- Moreno R., Amao L.M. Zuerera C. G. 1994. Cobre, variaciones de hierro y zinc en queso tipo manchego durante el proceso tradicional del queso. *Química de Alimentos*, 49: 62-67.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S. y Pfaller, M. A. 2009. Microbiología Médica. Panamericana. Bacteriología: *Staphylococcus* y cocos gran positivos relacionados. Elsevier, 6ta ed. Barcelona, España. pp 209-220

Morris K. 2004. Silent emergency of poor water and sanitation. Rev. The Lancet. 363: 954.

Nollet, L.M.1996. Manual de análisis de alimentos. Nueva York.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2012. Indicadores de seguridad alimentaria. Recuperado el 1 de diciembre de 2017, de <http://www.fao.org/economic/ess/ess-fs/ess-fadata/en/>

Organización Mundial de la Salud. OMS 2007. Análisis de riesgos relativos a la inocuidad de los alimentos. Guía para las autoridades nacionales de inocuidad. Roma, Italia. Recuperado el 24 de enero de 2020, de <file:///E:/busqueda%20de%20articulos/Analisis%20de%20riesgos.pdf>

Organización Mundial de la Salud. OMS 2009. Análisis de riesgos relativos a la inocuidad de los alimentos. Guía para autoridades nacionales de inocuidad de los alimentos. Recuperado el 20 de enero de 2020, de <http://www.fao.org/3/a-a0822s.pdf>

Organización Mundial de la Salud. OMS 2016. Inocuidad de alimentos. Recuperado el 1 de diciembre de 2017, http://www.who.int/topics/food_safety/es/

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2016. Prevención de *E. coli* en los alimentos. Recuperado el 1 de septiembre de 2017, de http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecoli_es.pdf

Organización Mundial de la Salud. OMS (2017). Inocuidad de los alimentos. Recuperado el 1 de diciembre de 2017, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>

Organización Mundial de la Salud. OMS, 2019. Inocuidad de los alimentos. Recuperado el 6 de octubre de 2019 <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/food-safety>

Organización Panamericana de la Salud. 1997. Vigilancia y prevención de las enfermedades transmitidas por los alimentos. Recuperado el 1 de diciembre de 2017, de <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/19075/doc232.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Pearson, D. 1993. Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos. Acriba, S.A. Zaragoza. España.
- Pérez-Maldonado I.N., Díaz-Barriga F., De la Fuente H., González-Amaro R., Calderón J., Yáñez L. 2004. DDT induces apoptosis in human mononuclear cells in vitro and is associated with increased apoptosis in exposed children. *Env. Res.* 94: 38-46.
- Pérez S.V.A. 2015. Normatividad vigente en México aplicada a la inocuidad de los alimentos. Recuperado el 1 de diciembre de 2017, de <https://www.legiscomex.com/BancoConocimiento/N/normatividad-mexico-inocuidad-alimentos-virginia-perez-actualizacion/normatividad-mexico-inocuidad-alimentos-virginia-perez-actualizacion.asp?CodSeccion=>
- Plant J. Smith D., Simith B. y Williams L. (2001). Environ mental geochemistry at the global scale. *Applied Geochemistry*, 16:1291-1308
- Rodas-Pazmiño K., Pazmiño-Gómez B., Rodas-Neira E., Cagua-Montaño L., Núñez-Rodríguez P., Coello-Peralta R, Rodas-Pazmiño J., Rodas-Pazmiño A., Pazmiño-Montalvan A, Pazmiño-Montalvan E. y Ayol-Pérez L. 2016. Presencia de *Shaphylococcus aureus* en quesos comercializados en la ciudad de Milagro, octubre-noviembre 2013. *Rev. Cum.* 2:25-29.
- Kirk. R. S., Sawyer R. y Egan H. 2011. Composición y Análisis de Alimentos. Pearson, 9a. ed. México, D. F. pp. 584-669.
- SAGARPA, SIAP (2016). Panorama de la lechería mexicana, septiembre 2016. Recuperado el 13 de diciembre de 2017, de https://www.infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Brochure%20leche_Septiembre2016.
- Sánchez-Valdés J.J., Colín-Navarro V., López-González F., Avilés-Nova F., Castelán-Ortega O.A., Estrada-Flores J.G. y Estrada-Flores J.G. Diagnóstico de la calidad sanitaria en las queseras artesanales de municipio de Zacazonapan, Estado de México. 2016. *Salud Pública de México.* 58(4), 461-467.
- Soares V., Kus M., De Castro A., Carrocci J., Salazar R. e Izário H. 2010. Determination of nutritional and toxic elements in pasteurized bovine milk from Vale do Paraiba region (Brasil). *Food Control. Rev. The Sevier* 21:45–49.

- Paltrinieri G. 2009. Manuales para educación agropecuaria. Taller de leche. Trillas, 3a ed. México D.F.
- Plant J., Smith D., Simith B. y Williams L. (2001). Environmental geochemistry at the global scale. *Applied Geochemistry*, Elsevier 16:1291-1308.
- Ramírez L. C. y Vélez R. J.F. 2012. Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. San Andrés Cholula, Puebla, México. *Rev. Temas Selectos de Alimentos* 6-2(2012):131-148.
- Sainos Carrero E., Sánchez G. C., Santana S. L. 2007. Manual de análisis de los alimentos. Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala.
- Vargas-Cesín A, Aliphat-Fernández M, Ramírez-Valverde B., Herrera-Haro J. G., Martínez -Carrera D. Ganadería lechera familiar y producción de queso. Estudio en tres comunidades del municipio de Tetlatlahuca en el estado de Tlaxcala, México *Técnica Pecuaria en México*, 2007. *Rev. Téc. Pecu. Méx.* 45(1):61-76.
- Villegas G. A. 1993. Los quesos mexicanos. CIESTAAM, Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Villegas G. A. 2004. Tecnología quesera. La denominación de origen (DO) y Marca Colectiva (MC) en quesos artesanales mexicanos una estrategia para contribuir el desarrollo regional. México D. F.
- Villegas de G.A y Cervantes E. F. 2011. La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanales mexicanos. Universidad Autónoma de Chapingo. México
- Villegas de G.A. Tecnología quesera. Trillas 2012. México D. F.
- Yuzbasi N, Sezgin E, Yıldırım M, Yıldırım N. 2003. Encuesta de plomo, cadmio, hierro, cobre y zinc en el queso Kasar. *Química de Alimentos*, 20 (5), 464-469.

ANEXO 1

Materiales y equipo para pruebas microbiológicas

1. Baño de agua con cubierta y recirculación constante que alcance una temperatura de 44.5 °C, 45.5 °C ± 0.2 °C.
2. Lámpara de luz UV de 365 nm longitud de onda.
3. Incubadora de aire que mantiene la temperatura de 35°C ± 0.5°C.
4. Balanza analítica con capacidad adecuada y sensibilidad de 0.1g.
5. Homogenizador Stomacher 400 circulator.
6. Potenciómetro con sensibilidad de 0.1 de unidad de pH.
7. Mecheros Bunsen
 1. Tubos de cultivo de 18mm x 150mm, 18mm x 200mm, 16mm x 150mm, 16mm x 160mm, 22 x 175mm con tapón de rosca.
 2. Tubos de fermentación (campanas de Durham).
 3. Gradillas de plástico y metal.
 4. Asas bacteriológicas.
 5. Lentes protectores.
 6. Termómetro de máximas para autoclave con división mínima de 0.5°C calibrado. Se deberá registrar la inspección trimestral de la columna de mercurio del termómetro con una lupa en búsqueda de rupturas de la misma, si se observa éste deberá salir de uso.
 7. Termómetro de inmersión total de 379mm de longitud de 25°C a 55°C, una escala auxiliar a 0°C con subdivisiones de 0.1°C con una precisión y exactitud de ± 0.1°C.
8. Bolsas estériles para homogeneizador peristáltico.
9. Pipetas graduadas bacteriológicas de 0.1mL, 1mL, 2mL, 5mL y 10mL.
10. Probetas de 100mL, 500mL y 1000mL.
11. Frascos de dilución de vidrio de borosilicato con tapón esmerilado.
12. Frascos con capacidad 500mL con tapa de rosca.
13. Espátulas, cucharas, cuchillos, pinzas.

Medios de cultivo

1. Caldo de pre enriquecimiento para coliformes (A-1)
2. Caldo lauril Triptosa
3. Caldo *E. coli* (EC)
4. Agar azul de Metileno de Levin (EMB-L)
5. Caldo triptona al 1%
6. Caldo RM – VP
7. Caldo Citrato de Koser
8. Citrato de Simmon
9. Caldo Lauril triptosa con MUG
10. Caldo Verde Brillante Lactosa Bilis
11. Agar Mc Conkey
12. Agar Nutritivo
13. Agar Cuenta Estándar

Reactivos

1. Regulador de fosfatos solución concentrada
2. Diluyente de peptona al 0.1%
3. Reactivo de Kovac
4. Reactivo de VP
5. Indicador rojo de metilo
6. Reactivos para la coloración de Gram

ANEXO 2

Materiales para la determinación de pH, humedad y EPT

1. Cápsulas de porcelana
2. Desecador
3. Estufa de cultivo
4. Balanza analítica
5. Espátula
6. Cuchillo
7. Ácido nítrico concentrado
8. Agua desionizada
9. Tubos cónicos para centrifuga Falcon de 50 mL
10. Horno de microondas CEM MARS®
11. Espectrofotómetro de absorción atómica

ANEXO 3

Intervalos de confianza para determinar NMP de Coliformes Totales CT y Coliformes fecales CF

NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando tres tubos con 0.1g, 0.01g y 0.001g de muestra.

| NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando tres tubos con 0.1g, 0.01g y 0.001g de muestra. | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-------|-------|---------------------|----------|-----------------|------|-------|-------|---------------------|----------|
| Tubos positivos | | | NMP/g | Límite de confianza | | Tubos positivos | | | NMP/g | Límite de confianza | |
| 0.10 | 0.01 | 0.001 | | Inferior | Superior | 0.10 | 0.01 | 0.001 | | Inferior | Superior |
| 0 | 0 | 0 | <3.0 | â | 9.5 | 2 | 2 | 0 | 21 | 4.5 | 42 |
| 0 | 0 | 1 | 3.0 | 0.15 | 9.6 | 2 | 2 | 1 | 28 | 8.7 | 94 |
| 0 | 1 | 0 | 3.0 | 0.15 | 11 | 2 | 2 | 2 | 35 | 8.7 | 94 |
| 0 | 1 | 1 | 6.1 | 1.2 | 18 | 2 | 3 | 0 | 29 | 8.7 | 94 |
| 0 | 2 | 0 | 6.2 | 1.2 | 18 | 2 | 3 | 1 | 36 | 8.7 | 94 |
| 0 | 3 | 0 | 9.4 | 3.6 | 38 | 3 | 0 | 0 | 23 | 4.6 | 94 |
| 1 | 0 | 0 | 3.6 | 0.17 | 18 | 3 | 0 | 1 | 38 | 8.7 | 110 |
| 1 | 0 | 1 | 7.2 | 1.3 | 18 | 3 | 0 | 2 | 64 | 17 | 180 |
| 1 | 0 | 2 | 11 | 3.6 | 38 | 3 | 1 | 0 | 43 | 9 | 180 |
| 1 | 1 | 0 | 7.4 | 1.3 | 20 | 3 | 1 | 1 | 75 | 17 | 200 |
| 1 | 1 | 1 | 11 | 3.6 | 38 | 3 | 1 | 2 | 120 | 37 | 420 |
| 1 | 2 | 0 | 11 | 3.6 | 42 | 3 | 1 | 3 | 160 | 40 | 420 |
| 1 | 2 | 1 | 15 | 4.5 | 42 | 3 | 2 | 0 | 93 | 18 | 420 |
| 1 | 3 | 0 | 16 | 4.5 | 42 | 3 | 2 | 1 | 150 | 37 | 420 |
| 2 | 0 | 0 | 9.2 | 1.4 | 38 | 3 | 2 | 2 | 210 | 40 | 430 |
| 2 | 0 | 1 | 14 | 3.6 | 42 | 3 | 2 | 3 | 290 | 90 | 1,000 |
| 2 | 0 | 2 | 20 | 4.5 | 42 | 3 | 3 | 0 | 240 | 42 | 1,000 |
| 2 | 1 | 0 | 15 | 3.7 | 42 | 3 | 3 | 1 | 460 | 90 | 2,000 |
| 2 | 1 | 1 | 20 | 4.5 | 42 | 3 | 3 | 2 | 1100 | 180 | 4,100 |
| 2 | 1 | 2 | 27 | 8.7 | 94 | 3 | 3 | 3 | >1100 | 420 | â |

**Referencia: Bacteriological Analytical Manual. FDA, 8th Edición, Revisión A, 1998
Actualización Diciembre 2003.**

ANEXO 4

Interpretación de resultados para pruebas bioquímicas para *E. coli*

Todos los cultivos que fermenten la lactosa con producción de gas dentro de las 48h a 35 °C, sean bacilos o bacilos cortos Gram negativos no esporulados y se obtengan las siguientes combinaciones para el IMViC:

| Pruebas | Biotipo 1* | Biotipo 2* |
|---------|------------|------------|
| Indol | + | - |
| RM | + | + |
| VP | - | - |
| Citrato | - | - |

* Son consideradas como *E. coli*.

Calcular el NMP de *E. coli* basada en la proporción de los tubos positivos de caldo EC confirmados

ANEXO 5

Interpretación de resultados para pruebas de termonucleasa y coagulasa para *S. aureus*

Características de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *Micrococcus*.

| Características | <i>S. aureus</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>Micrococcus</i> |
|-------------------------------------------|------------------|-----------------------|--------------------|
| Actividad de catalasa | + | + | + |
| Producción de coagulasa | + | - | - |
| Producción de termonucleasa | + | - | - |
| Utilización anaeróbica de: Glucosa | + | + | - |
| Utilización anaeróbica de: Manitol | + | - | - |

+, La mayoría de las cepas son positivas (más del 90%).

-, La mayoría de las cepas son negativas (más del 90%).

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

1. Las pruebas de termonucleasa o coagulasa positiva son consideradas como resultados confirmatorios de *S. aureus*.
2. Si al menos el 80% de las colonias típicas seleccionadas fueron coagulasa positiva y/o termonucleasa positiva tomar el número total de las colonias contadas como presuntivas de *S. aureus*.
3. En otros casos, calcular el número de colonias presuntivas de *S. aureus* a partir del porcentaje obtenido de colonias coagulasa y/o termonucleasa positivas confirmadas.
4. Promediar los resultados de los duplicados.
5. Cuando en dos diluciones consecutivas se obtienen cuentas entre 15 y 150 colonias (típicas o atípicas) calcular el número de *S. aureus* para cada dilución como se especifica en los puntos anteriores, calcular la cuenta de *S. aureus* considerando el factor de dilución, calcular el logaritmo en base diez de cada dilución y realizar la resta de éstos, si la diferencia entre los logaritmos de las dos diluciones es menor a 0.3, reportar el promedio de las dos diluciones. Si por el contrario la diferencia entre los logaritmos es mayor a 0.3; reportar el valor más bajo.