



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE PUEBLA**



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**LICENCIATURA EN QUÍMICO  
FÁRMACO BIÓLOGO**

**TESIS**

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *E.*  
*COLI* EN QUESOS FRESCOS ARTESANALES DE  
SAN MARTÍN CALTENCO**

**PARA TENER EL GRADO DE LICENCIATURA  
EN QUÍMICO FÁRMACO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**P.QFB. JUDITH GISSEL FLORES NAVOR**

**DIRECTORA:**

**D.E.D. EDITH DÍAZ CABRERA**

**CODIRECTORA:**

**D.C. ALMA CUELLAR SÁNCHEZ**

**FECHA: ABRIL 2024**

# ÍNDICE

|       |                                                                          |    |
|-------|--------------------------------------------------------------------------|----|
| 1     | RESUMEN .....                                                            | 8  |
| 2     | INTRODUCCIÓN .....                                                       | 9  |
| 3     | MARCO TEÓRICO .....                                                      | 10 |
| 3.1   | Salud pública .....                                                      | 10 |
| 3.1.1 | ¿Qué es la salud pública? .....                                          | 10 |
| 3.1.2 | Organismos de la salud pública .....                                     | 10 |
| 3.2   | Salud pública en alimentos .....                                         | 12 |
| 3.2.1 | ¿Qué es la salud pública en alimentos? .....                             | 12 |
| 3.2.2 | Normas enfocadas en salud pública en alimentos .....                     | 12 |
| 3.3   | Enfermedades causadas por alimentos .....                                | 14 |
| 3.3.1 | ¿Qué son las enfermedades causadas por alimentos? .....                  | 14 |
| 3.3.2 | Principales microorganismos causales de enfermedades por alimentos ..... | 15 |
| 3.4   | Quesos frescos .....                                                     | 15 |
| 3.4.1 | ¿Qué son los quesos frescos? .....                                       | 15 |
| 3.4.2 | Microorganismos causales de las enfermedades por quesos frescos .....    | 16 |
| 3.4.3 | Normas enfocadas a las enfermedades por quesos frescos .....             | 16 |
| 3.5   | Región .....                                                             | 17 |
| 3.5.1 | Datos generales y ubicación .....                                        | 17 |
| 3.6   | Bacterias mesofílicas aerobias .....                                     | 18 |
| 3.6.1 | ¿Qué son las bacterias mesofílicas aerobias? .....                       | 18 |
| 3.6.2 | Alimentos donde se encuentran las bacterias mesofílicas aerobias .....   | 18 |
| 3.6.3 | Norma enfocada a bacterias mesofílicas aerobias .....                    | 18 |
| 3.7   | Hongos .....                                                             | 19 |
| 3.7.1 | ¿Qué son los hongos? .....                                               | 19 |
| 3.7.2 | Alimentos donde se encuentran los hongos .....                           | 19 |
| 3.7.3 | Norma enfocada a hongos .....                                            | 19 |
| 3.8   | Coliformes totales .....                                                 | 20 |
| 3.8.1 | ¿Qué son los coliformes totales? .....                                   | 20 |
| 3.8.2 | Alimentos donde se encuentran los coliformes totales .....               | 20 |
| 3.8.3 | Norma enfocada a coliformes totales .....                                | 20 |
| 3.9   | Escherichia coli .....                                                   | 21 |

|        |                                                                                                                                 |    |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.9.1  | ¿Qué es y cómo se clasifica? .....                                                                                              | 21 |
| 3.9.2  | Alimentos donde se encuentra <i>E. coli</i> .....                                                                               | 22 |
| 3.9.3  | Norma enfocada a <i>E. coli</i> .....                                                                                           | 22 |
| 3.10   | Criopreservación .....                                                                                                          | 23 |
| 3.11   | Extracción de ADN .....                                                                                                         | 23 |
| 3.12   | Electroforesis en gel de agarosa .....                                                                                          | 23 |
| 3.13   | PCR del gen 16s .....                                                                                                           | 24 |
| 3.14   | Purificación de ADN .....                                                                                                       | 25 |
| 3.15   | REP-PCR .....                                                                                                                   | 25 |
| 3.16   | Secuenciación del gen 16s .....                                                                                                 | 25 |
| 4      | MARCO DE REFERENCIA .....                                                                                                       | 26 |
| 5      | Caracterización molecular y serológica de <i>Escherichia coli</i> en quesos artesanales de seis departamentos de Honduras. .... | 27 |
| 6      | PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....                                                                                                | 28 |
| 7      | JUSTIFICACIÓN .....                                                                                                             | 29 |
| 8      | OBJETIVOS .....                                                                                                                 | 29 |
| 8.1    | Objetivo general .....                                                                                                          | 29 |
| 8.2    | Objetivos específicos .....                                                                                                     | 29 |
| 9      | HIPÓTESIS .....                                                                                                                 | 30 |
| 9.1    | Hipótesis .....                                                                                                                 | 30 |
| 9.2    | Hipótesis nula .....                                                                                                            | 30 |
| 10     | DISEÑO DE INVESTIGACIÓN .....                                                                                                   | 30 |
| 10.1   | Tipo de estudio .....                                                                                                           | 30 |
| 10.2   | Universo del estudio .....                                                                                                      | 30 |
| 10.3   | Tamaño de muestra .....                                                                                                         | 30 |
| 10.4   | Sede y lugar de estudio .....                                                                                                   | 31 |
| 10.5   | Criterios de selección .....                                                                                                    | 31 |
| 10.5.1 | Criterios de inclusión .....                                                                                                    | 31 |
| 10.5.2 | Criterios de exclusión .....                                                                                                    | 32 |
| 10.6   | Diseño estadístico .....                                                                                                        | 32 |
| 11     | METODOLOGÍA .....                                                                                                               | 32 |
| 11.1   | Materiales y metodologías .....                                                                                                 | 32 |

|        |                                      |    |
|--------|--------------------------------------|----|
| 11.1.1 | Materiales .....                     | 32 |
| 11.1.2 | Metodologías .....                   | 34 |
| 12     | RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....          | 45 |
| 12.1   | Muestreo .....                       | 45 |
| 12.2   | Aislamiento de cepas .....           | 51 |
| 12.3   | Caracterización genotípica .....     | 59 |
| 12.3.1 | Extracción de ADN.....               | 59 |
| 12.3.2 | Amplificación del Gen 16s rDNA ..... | 60 |
| 12.3.3 | Purificación de ADN.....             | 62 |
| 12.3.4 | Amplificación de REP-PCR .....       | 63 |
| 12.3.5 | Secuenciación.....                   | 65 |
| 13     | CONCLUSIONES .....                   | 66 |
| 14     | BIBLIOGRAFÍA .....                   | 67 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 1</b> Normas más relevantes en salud pública de alimentos _____                                  | 12 |
| <b>Tabla 2</b> Información documental de investigaciones similares a nuestra investigación __             | 26 |
| <b>Tabla 3</b> Semanas donde se realizaron los muestreos _____                                            | 45 |
| <b>Tabla 4</b> Conteo de hongos y levaduras, bacterias mesofílicas aerobias y coliformes totales<br>_____ | 51 |
| <b>Tabla 5</b> Placas de EMB de todas las muestras de queso fresco _____                                  | 53 |
| <b>Tabla 6</b> Muestras seleccionadas para la caracterización genotípica _____                            | 58 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> Límites máximos de contenido microbiano para leche y sus derivados (NOM-243-SSAI-2010)                                                                                                            | 17 |
| <b>Figura 2</b> Características de los grupos de E. coli causantes de diarrea (Rodríguez, M. (2002))                                                                                                              | 22 |
| <b>Figura 3</b> Primer checklist                                                                                                                                                                                  | 47 |
| <b>Figura 4</b> Segundo checklist                                                                                                                                                                                 | 49 |
| <b>Figura 5</b> Tercer checklist                                                                                                                                                                                  | 50 |
| <b>Figura 6</b> Pruebas bioquímicas                                                                                                                                                                               | 58 |
| <b>Figura 7</b> Electroforesis de la extracción de ADN de las cepas aisladas de E. coli. MM (marcador de peso molecular), 1(M2 S2), 2(M2 S2), 3(M2 S3), 4(M6 S3), 5(M6 S4), 6(M3 S5) 7(M3 S5), 8(M2 S1), 9(M6 S2) | 59 |
| <b>Figura 8</b> Protocolo PCR para el gen 16s rDNA                                                                                                                                                                | 60 |
| <b>Figura 9</b> Amplificación del gen 16s rDNA en gel de agarosa al 1%                                                                                                                                            | 61 |
| <b>Figura 10</b> Amplificación del gen 16s rDNA en gel de agarosa al 1%                                                                                                                                           | 62 |
| <b>Figura 11</b> Purificación del ADN en gel de agarosa al 1%                                                                                                                                                     | 63 |
| <b>Figura 12</b> REP-PCR en gel de agarosa al 1%                                                                                                                                                                  | 64 |
| <b>Figura 13</b> Dendrograma                                                                                                                                                                                      | 65 |
| <b>Figura 14</b> Árbol filogenético de las cepas secuenciadas                                                                                                                                                     | 66 |

## ÍNDICE DE DIAGRAMAS

|                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Diagrama 1</b> Método para la toma, manejo y transporte de muestras según la NOM-109-SSA-1-1994              | 34 |
| <b>Diagrama 2</b> Preparación y dilución de muestras de alimentos según la NOM-110-SSA1-1994                    | 35 |
| <b>Diagrama 3</b> Procedimiento para aislar bacterias mesofílicas aerobias de acuerdo con la NOM-110-SSA-1-1994 | 36 |
| <b>Diagrama 4</b> Procedimiento para aislar mohos y levaduras de acuerdo con la NOM-111-SSA-1-1994              | 37 |
| <b>Diagrama 5</b> Procedimiento para aislar coliformes totales de acuerdo con la NOM-113-SSA-1-1994             | 38 |
| <b>Diagrama 6</b> Procedimiento para aislar E. coli                                                             | 39 |
| <b>Diagrama 7</b> Criopreservación de las cepas aisladas                                                        | 40 |
| <b>Diagrama 8</b> Extracción de ADN                                                                             | 41 |
| <b>Diagrama 9</b> Electroforesis en gel de agarosa                                                              | 42 |
| <b>Diagrama 10</b> PCR                                                                                          | 43 |
| <b>Diagrama 11</b> Purificación de ADN                                                                          | 44 |
| <b>Diagrama 12</b> REP-PCR                                                                                      | 45 |

## 1 RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA'S) son de gran importancia en la actualidad, por el alcance al que han llegado en las personas y les han causado alguna infección o intoxicación por consumir algún alimento contaminado con algún tipo de microorganismo o toxina que estos producen, incluso en personas inmunocomprometidas les han causado la muerte. Los alimentos involucrados con más frecuencia en las epidemias y casos de (ETA's) son los de origen animal, los lácteos producidos artesanalmente pueden estar contaminados con microorganismos que nos pueden transmitir alguna (ETA), un alimento que ha tenido relevancia en cuanto a ellas, son los quesos frescos, en esta investigación se realizó un conteo microbiológico general de hongos, bacterias mesofílicas y coliformes totales, poniendo énfasis en el aislamiento de *E. coli*, ya que este microorganismo ha causado un número significativo de muertes por diarreas a nivel mundial. Se analizaron 30 muestras en total de 6 establecimientos diferentes de quesos frescos elaborados artesanalmente, el experimento se realizó por quintuplicado por lo que cada semana se analizó una muestra de cada establecimiento para lograr un mejor monitoreo microbiológico. En el laboratorio de microbiología de la BUAP se realizó la primer parte del trabajo la cual fue hacer el conteo general de los microorganismos mencionados anteriormente y el aislamiento de *E. coli* en placas de EMB y agar Soya Tripticaseína, se aisló *E. coli* de las muestras 2, 3 y 6, las cepas aisladas de *E. coli* se trasladaron al Laboratorio de Manipulación Genética del Tecnológico de Monterrey en donde se hizo extracción de ADN con el kit (Wizard® Genomic DNA Purification) de Promega con REF A1120, para saber la pureza y cantidad de ADN extraído se utilizó un Nanodrop One para corroborar los datos del Nanodrop One se hizo una electroforesis en gel de agarosa, después se realizó la amplificación del gen 16s, se volvió a realizar una electroforesis para observar si la amplificación se realizó de manera correcta, posteriormente se realizó la Purificación de ADN con el kit (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System) de Promega, se volvió a realizar electroforesis y finalmente se realizó una REP-PCR con su electroforesis. Para después mandar a secuenciar las cepas de interés al Instituto de Biotecnología de la UNAM y saber que género y especie se encontraba en nuestras cepas.



## 2 INTRODUCCIÓN

Poco se habla de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) pero un gran número de personas han sufrido por alguna de ellas e incluso en personas inmunocomprometidas les ha causado la muerte, las (ETA's) son enfermedades infecciosas o tóxicas provocadas por el consumo de agua o de alimentos contaminados con microorganismos o toxinas que éstos producen, con ello se ve afectada la salud del individuo de manera crónica o aguda. Cuando dicho alimento contaminado llega a un gran número de personas puede desencadenar un brote epidemiológico o una epidemia, un brote epidemiológico es en donde dos o más personas se verán afectadas por contraer alguna ETA, por consumir dicho alimento contaminado, una epidemia es la consolidación de múltiples brotes en una zona geográfica en poco tiempo, los alimentos involucrados con más frecuencia en las epidemias y casos de ETA's son los de origen animal. En la actualidad los lácteos producidos artesanalmente pueden estar contaminados con microorganismos que nos pueden transmitir alguna (ETA), un alimento que ha tenido relevancia en cuanto a ellas, son los quesos frescos, este alimento es elaborado principalmente de la leche de vaca y se comercializa en localidades, mercados o incluso en tienditas austeras, los quesos frescos se llegan a contaminar en el proceso de su producción, transporte, almacenamiento u otros simplemente no los pasteurizan y desde el principio de su elaboración ya están contaminados por algún microorganismo, las personas que los fabrican regularmente no son profesionales y por ende no tienen el cuidado microbiológico que se debería tener. En esta investigación se analizarán quesos frescos de una localidad llamada San Martín Caltenco la cual radica dentro del estado de Puebla en el municipio de Tochtepec. Se hará un monitoreo microbiológico en el cual se estará buscando principalmente *Escherichia coli*, pero sin descartar los microorganismos que comúnmente podemos encontrar como bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales y hongos, *E. coli* se encuentra dentro de las coliformes totales en el subgrupo de coliformes fecales, esta bacteria es de gran interés ya que su contaminación en los alimentos se debe estrictamente a contaminación fecal, por ende causa grandes complicaciones en la salud provocando cuadros clínicos con fiebre, vómito, dolor abdominal y diarrea moderada o intensa.

### **3 MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 Salud pública**

##### **3.1.1 ¿Qué es la salud pública?**

En la actualidad la organización mundial de la salud (OMS, 2020), define la salud pública como: “la respuesta organizada de una sociedad dirigida a promover, mantener y proteger la salud de la comunidad, y prevenir enfermedades, lesiones e incapacidad.” Para cumplir todas las partes que conlleva la salud pública según la OMS, se debe alcanzar ciertos estándares de calidad como los siguientes:

- Oportunidad: Es fundamental para tener calidad en la salud, puesto que engloba las atenciones que se le brinda al paciente, independientemente de su patología y tratamiento.
- Seguridad: Debe existir la firmeza y completa seguridad que el medicamento seleccionado para el paciente es el correcto para sus necesidades.
- Eficiencia: El paciente debe recibir la atención médica en el momento indicado sin la necesidad de pagar costos elevados.
- Equidad: La salud deberá ser impartida por igual a todos los individuos no importa religión, raza, sexo, creencias, nivel socioeconómico, etc.
- Atención centrada en el paciente: el paciente no debe ser juzgado en ningún momento por su forma de ser y deberá ser tratado con respeto.

La salud pública cada día enfrenta nuevos desafíos como la reemergencia de enfermedades infecciosas y cambios en aspectos políticos, sociales y económicos, que determinan la salud y la equidad dentro de la salud, para enfrentar estos desafíos es importante llevar a cabo los estándares de calidad mencionados anteriormente para garantizar el derecho pleno de salud a cada uno de los habitantes (Euroinnova, 2023).

##### **3.1.2 Organismos de la salud pública**

Organización mundial de la salud (OMS)

Esta organización es la autoridad directiva y coordinadora de la acción sanitaria en el sistema de las Naciones Unidas. Es responsable de liderar asuntos sanitarios mundiales,

realizar la agenda de las investigaciones en salud, establecer normas, articular opciones de política basadas en la evidencia, prestar apoyo técnico a los países y vigilar las tendencias sanitarias mundiales. Según la OMS su constitución entro en vigor el 7 de abril de 1948, su primera misión mencionada en su constitución es “La salud es un estado de completo bienestar físico, mental y social, y no solamente la ausencia de afecciones o enfermedades” (Gobierno de México, 2022), para lograr su objetivo, lleva a cabo tareas enfocadas a la técnica en materia de salud pública los estados que son miembros, vigila el comportamiento sanitario mundial y los riesgos para la salud pública, diseña normas sanitarias; y coordina la prevención y respuesta a emergencias sanitarias internacionales.

Organización Panamericana de la Salud (OPS).

La OPS ha sido la primera organización de salud internacional que plantea esfuerzos de cooperación contra la propagación de brotes de epidemias y enfermedades que atacan fuertemente al continente en el mercado mundial. Algunos de sus logros, que podemos mencionar es la erradicación de muchas enfermedades como la viruela, el sarampión y la poliomielitis. En 1949, el Programa de Erradicación de la Viruela incorporó una innovación tecnológica para el momento, como era la vacuna liofilizada y que luego se iniciaría su uso en forma mundial de dicha enfermedad en 1978 (Tobar, 2015). La acción de la OPS logró prevenir, controlar y erradicar otras enfermedades, así como estimular la investigación, formación y entrenamiento de recursos humanos en salud. Actualmente lleva más de cien años en el mercado ampliando sus funciones y la mejora de la salud de la población.

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC).

Los CDC son centros de control y prevención de enfermedades que trabajan para proteger a los individuos contra amenazas a la salud y seguridad. Independientemente de que las enfermedades se originen en los Estados Unidos o en otros países, sean crónicas o agudas, curables o prevenibles, sean el resultado de error humano o de un ataque intencional, los CDC apoyan a las comunidades y a los ciudadanos para que hagan lo mismo. Los CDC se encargan de aumentar la seguridad de la salud en nuestro país. Por ello siempre están a la

vanguardia y en constante capacitación para ayudar e informar a todo el mundo sobre las enfermedades (CDC, 2023).

Secretaría de Salud

La Secretaría de Salud es la dependencia del Poder Ejecutivo que se encarga primordialmente de la prevención de enfermedades y promoción de la salud de la población. Se considera un Sistema Nacional de Salud Universal, equitativo, integral, sustentable, efectivo y de calidad, con particular enfoque a los grupos de la población que viven en condición de vulnerabilidad, a través del fortalecimiento de la rectoría de la autoridad sanitaria y la intersectorialidad; de la consolidación de la protección y promoción de la salud y prevención de enfermedades, así como la prestación de servicios plurales y articulados basados en la atención primaria; la generación y gestión de recursos adecuados; la evaluación y la investigación científica, fomentando la participación de la sociedad con corresponsabilidad (Gobierno de México, 2023).

**3.2 Salud pública en alimentos**

**3.2.1 ¿Qué es la salud pública en alimentos?**

Ahora que sabemos a grandes rasgos que la salud pública es todo lo que hace una sociedad colectivamente, para asegurar que cada individuo tenga derecho a atención médica preventiva y curativa de manera gratuita, debemos conocer que es la salud pública en alimentos o seguridad alimentaria. Existen varias formas en las cuales la industria alimentaria puede impactar en la salud de la población, como lo es el fabricar alimentos que no cumplan con parámetros de calidad, productos que sean dañinos por sus características nutricionales y/o productos no inocuos o contaminados que atentan contra la salud. En cada uno de estos puntos, los productores de alimentos pueden ejercer acciones para prevenirlos y a través de la gestión pública se puede ejercer un control de estas acciones para tener alimentos saludables para la población (Dávila, 2022).

**3.2.2 Normas enfocadas en salud pública en alimentos**

**Tabla 1** Normas más relevantes en salud pública de alimentos

| Nombre de la norma | Objetivo de la norma |
|--------------------|----------------------|
|--------------------|----------------------|

|                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>ISO 22000:2018 Sistemas de gestión de la inocuidad de los alimentos (SGIA)</b></p>                               | <p>Los peligros relacionados con la inocuidad de los alimentos pueden ocurrir en cualquier etapa de la cadena alimentaria desde que el alimento se encuentra como materia prima hasta que es adquirido por el consumidor. Esta norma se encarga de planificar, implementar, operar, mantener y actualizar un SGIA que proporcione productos y servicios que sean inocuos para el consumidor.</p>                                                                                    |
| <p><b>NOM-093-SSA1-1994 Preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos</b></p>                      | <p>Todos los manipuladores que se encarguen de preparar alimentos deben cumplir con ciertas acciones para garantizar la inocuidad de los alimentos, con el fin de contribuir a la protección de la salud del consumidor, para que él se sienta seguro y libre de contraer (ETAs) en estos tipos de establecimientos. Esta norma se encarga de asegurar que todos los alimentos que se preparen y expendan en los establecimientos fijos lleguen al consumidor de manera inocua.</p> |
| <p><b>NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios</b></p> | <p>Cualquier manipulador que pueda contaminar al producto debe excluirse, el personal debe presentarse aseado en el área de trabajo, con ropa y calzado limpios. Se debe llevar a cabo el protocolo de lavado de manos correctamente, uso de guantes, uso de cubre boca, esta norma se encarga de establecer de los requisitos mínimos de buenas prácticas de higiene que deben</p>                                                                                                 |

|  |                                                                                                                                                            |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | observarse en el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios y sus materias primas a fin de evitar su contaminación a lo largo de su proceso. |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Información tomada de las siguientes normas: ISO 22000:2018. NOM-093-SSA1-1994. NOM-251-SSA1-2009

### **3.3 Enfermedades causadas por alimentos**

#### **3.3.1 ¿Qué son las enfermedades causadas por alimentos?**

Son enfermedades causadas después de la ingestión de un alimento debido a un agente etiológico. Existen varios tipos de ETA's y pueden clasificarse en infecciones e intoxicaciones. Por un lado, la infección es una enfermedad que resulta de la ingestión de alimentos conteniendo microorganismos patógenos vivos, por otro lado, la intoxicación ocurre cuando las toxinas producidas por bacterias o mohos están presentes en el alimento ingerido, en cantidades que representan un riesgo para la salud (OPS, 2015).

Un brote de ETA es definido como un incidente en el que dos o más personas presentan una enfermedad semejante después de la ingestión de un mismo alimento, y los análisis epidemiológicos apuntan al alimento como el origen de la enfermedad (OPS, 2015). Un individuo afectado es lo que se entiende como caso, los brotes pueden involucrar números diferenciados de casos y uno solo puede ser suficiente para desencadenar acciones relativas a un brote epidémico, debido a la gravedad de la enfermedad provocada por esos agentes. Es importante observar que pueden ocurrir casos aislados de enfermedades de origen alimentario. La probabilidad de que un brote o caso se reconozca y notifique por las autoridades de salud depende, entre otros factores, de la comunicación de los consumidores, del relato de los médicos y de las actividades de vigilancia sanitaria de las secretarías municipales, departamentales y provinciales de salud (Sánchez, 2023), por ello es importante identificar los brotes, ya que podrían desencadenar en una epidemia.

### **3.3.2 Principales microorganismos causales de enfermedades por alimentos**

Actualmente son cuatro los grupos de interés sanitario, que causan enfermedades por alimentos.

Patógenos: son aquellos que pueden causar algún daño a la salud.

Indicadores: estos microorganismos se consideran indicadores de fuentes de contaminación indeseable o de malas prácticas higiénicas durante el manejo de agua y alimentos.

Deterioradores: son aquellos que afectan las características organolépticas de los alimentos.

Útiles para el hombre: son aquellos que se han adicionado intencionalmente a los alimentos con el propósito de proporcionar alguna característica organoléptica especial.

*Escherichia coli*: se encuentra dentro del grupo de los microorganismos indicadores, es una bacteria que se encuentra en el medio ambiente, los alimentos, los intestinos de las personas y los animales. *E. coli* contiene a varias cepas algunas de ellas no son tan dañinas pero en cambio otras pueden complicar la salud de las personas. Los síntomas de la infección por *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) varían para cada persona, pero a menudo incluyen calambres estomacales intensos, diarrea (a menudo con sangre), vómitos y fiebre. La mayoría de las personas mejoran en 5 a 7 días. Algunas infecciones son muy leves, pero otras son graves o incluso potencialmente mortales (CDC, 2023).

## **3.4 Quesos frescos**

### **3.4.1 ¿Qué son los quesos frescos?**

El queso fresco es un lácteo derivado principalmente de la leche de vaca, éste se comercializa en nuestro país en grandes cantidades por sus características nutritivas, funcionales, texturales y sensoriales, es consumido por sí solo o como parte de una enorme variedad de platillos que constituyen nuestro legado gastronómico. Su producción la realizan las grandes empresas y personal que lo elabora de manera artesanal. Actualmente se han identificado factores causantes de modificaciones en las propiedades del queso, entre ellos la formulación, las condiciones de proceso, almacenamiento y las alteraciones provocadas por microorganismos. De las cuales la más importante es la alteración por microorganismos ya que afecta directamente a la salud del consumidor (Ramírez & Vélez, 2012).

### **3.4.2 Microorganismos causales de las enfermedades por quesos frescos**

*Staphylococcus aureus*: Bacteria grampositiva que se agrupa en racimos, beta hemolítico, catalasa y coagulasa positiva (Garzón, Martínez y Molina, 2019).

*Escherichia coli*: Bacterias aerobias o facultativamente anaerobias, gramnegativas, no esporuladas, que fermentan la lactosa con producción de gas dentro de las primeras 48 horas a 35 grados Celsius (Benítez et al., 2013).

*Salmonella*: Bacilos gramnegativos aerobios o facultativamente anaerobios, móviles por flagelos peritricos, no esporulados, catalasa positiva, oxidasa negativa, fermentan la glucosa, producen gas, no fermentan la lactosa ni la sacarosa, no producen indol, no hidrolizan la urea, descarboxilan la arginina, lisina y ornitina (Benítez et al., 2013).

### **3.4.3 Normas enfocadas a las enfermedades por quesos frescos**

NOM-243-SSA1-2010 Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

Esta norma establece las especificaciones sanitarias que deben cumplir la leche y sus derivados. Los productos mencionados en esta norma no deben exceder los límites de microorganismos señalados a continuación.



| Microorganismo                | Límite máximo                   | Productos                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Organismos Coliformes totales | ≤100 UFC/g o mL                 | Helados y sorbetes. Quesos de suero                                                                                                                                                                                                                                       |
|                               | ≤50 UFC/g o mL                  | Bases o mezclas para helados.                                                                                                                                                                                                                                             |
|                               | ≤20 UFC/g o mL                  | En punto de venta: Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado; pasteurizados.                                                                                                                                                                                       |
|                               | ≤10 UFC/g o mL                  | En planta: Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado; pasteurizados o deshidratados.<br>Mantequilla, cremas, leche condensada azucarada, leche fermentada o acidificada, dulces a base de leche.                                                                   |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | ≤10 UFC/ mL por siembra directa | Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado pasteurizado.                                                                                                                                                                                                           |
|                               | ≤100 UFC/g o mL                 | Mantequilla, cremas, leche condensada azucarada, leche fermentada o acidificada, dulces a base de leche.<br>Quesos madurados y quesos procesados                                                                                                                          |
|                               | 1000 UFC/g                      | Quesos frescos y quesos de suero                                                                                                                                                                                                                                          |
| <i>Salmonella spp</i>         | Ausente en 25g o mL             | Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado; pasteurizados y deshidratados.<br>Quesos frescos, madurados y procesados. Quesos de suero.<br>Cremas, leche fermentada o acidificada, dulces a base de leche*, helados, sorbetes y bases para helados.<br>Mantequillas. |
| <i>Escherichia coli</i>       | 100 UFC/g o mL                  | Quesos frescos.                                                                                                                                                                                                                                                           |
|                               | ≤ 3 NMP/g o mL                  | Leche utilizada como materia prima para la elaboración de quesos.<br>Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado; deshidratados.                                                                                                                                     |
|                               | ≤ 10 NMP/g                      | Quesos madurados y procesados.                                                                                                                                                                                                                                            |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | Ausente en 25g o mL             | Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado; pasteurizados **<br>Quesos. Quesos de suero.<br>Helados, bases para helados y sorbetes.**.                                                                                                                              |
| <i>Vibrio cholerae</i> ***    | Ausente en 25g                  | Quesos frescos.<br>Helados, sorbetes y bases para helados.                                                                                                                                                                                                                |
|                               | Ausente en 50g                  | Quesos de suero.                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Enterotoxina estafilococcica  | Negativa                        | Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado; deshidratados y la que se emplee como materia prima para elaboración de quesos.<br>Quesos frescos, madurados y procesados.<br>Helados, sorbetes y bases para helados.                                                  |
| Toxina botulínica**           | Negativa                        | Quesos frescos, madurados y procesados, envasados al alto vacío.                                                                                                                                                                                                          |
| Mohos y levaduras             | 500 UFC/g o mL                  | Quesos frescos, madurados*** y quesos de suero.                                                                                                                                                                                                                           |
|                               | 100 UFC/g o mL                  | Quesos procesados.                                                                                                                                                                                                                                                        |
|                               | 50 UFC/g o mL                   | Bases o mezclas para helados.                                                                                                                                                                                                                                             |
| Mesofílicos aerobios          | 200,000 UFC/g o mL              | Helados y sorbetes.                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                               | 100,000 UFC/g o mL              | Bases para helado.                                                                                                                                                                                                                                                        |

**Figura 1** Límites máximos de contenido microbiano para leche y sus derivados (NOM-243-SSAI-2010)

### 3.5 Región

#### 3.5.1 Datos generales y ubicación

La localidad de San Martín Caltenco está situada en el Municipio de Tochtepec, dentro del estado de Puebla. Con código postal 75617, su población asciende a 4950 personas. San Martín Caltenco está situado a 1980 metros de altitud a nivel del mar, sus coordenadas geográficas son longitud de -97.820000 y latitud de 18.891389. Su temporada de lluvia es caliente y nublada y la temporada seca es cómoda y parcialmente nublada. La mayoría de sus habitantes son comerciantes y agricultores. En la siguiente imagen se encuentra la ubicación de la localidad dentro del país y del estado de Puebla y se señalan los

establecimientos de quesos frescos de los cuales la mayoría son clandestinos, solo la pequeña empresa se encuentra registrada (MarketDataMéxico, 2022).



### 3.6 Bacterias mesofílicas aerobias

#### 3.6.1 ¿Qué son las bacterias mesofílicas aerobias?

Cada bacteria necesita un rango de temperatura para poder vivir y sobrevivir, ésta es una característica que influye mucho para saber la forma de transmisión de la bacteria, este rango de temperatura también debe tomarse en cuenta para el procesamiento y la conservación de muestras clínicas o de alimentos, para evitar su contaminación. Las bacterias mesofílicas aerobias son bacterias que crecen a temperaturas intermedias de 20-40 grados Celsius, además de esto requieren oxígeno para su crecimiento (Porres & Ruíz, 2018).

#### 3.6.2 Alimentos donde se encuentran las bacterias mesofílicas aerobias

Se pueden encontrar en cualquier alimento ya que su rango de crecimiento es muy variado por lo que si no tenemos medidas de sanidad adecuadas y la bacteria se encuentra en el ambiente puede contaminar nuestro alimento.

#### 3.6.3 Norma enfocada a bacterias mesofílicas aerobias

NOM-092-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

Cuando se requiere investigar el contenido de microorganismos viables en un alimento, la técnica comúnmente utilizada es la cuenta en placa. En esta técnica no es relevante la variedad de especies y tipos diferenciables por sus necesidades nutricionales, temperatura requerida para su crecimiento, oxígeno disponible, etc., lo que verdaderamente importa es

que el número de colonias contadas constituyan una estimación de la cifra realmente presente y la misma refleje si el manejo sanitario del producto ha sido el adecuado. Esta Norma Oficial Mexicana establece el método para estimar la cantidad de microorganismos viables presentes en un alimento, agua potable y agua purificada, por la cuenta de colonias en un medio sólido, incubado aeróbicamente.

### **3.7 Hongos**

#### **3.7.1 ¿Qué son los hongos?**

Los hongos son un grupo de organismos que podemos encontrar alrededor de toda la naturaleza, con características propias de nutrición, fisiología, reproducción y organización, estos forman el reino *fungi*. Los hongos son organismos que no tienen clorofila, sus células poseen un núcleo y su cuerpo está formado por gran cantidad de filamentos ramificados con pared celular de quitina o celulosa llamados hifas, que en conjunto forman un micelio, estos se pueden reproducir de dos formas, asexual y sexualmente por medio de esporas. Se clasifican en hongos microscópicos (como las levaduras y mohos) y hongos macroscópicos (como los champiñones y las setas) (López, 2021).

#### **3.7.2 Alimentos donde se encuentran los hongos**

Los hongos pueden contaminar un alimento sobre una superficie, las esporas aterrizan en él, y si existen las condiciones adecuadas de temperatura y humedad germinarán dando origen al hongo. Los hongos obtienen los nutrientes para su crecimiento de los componentes del alimento.

El pan, las frutas y las verduras son los alimentos más comúnmente contaminados por hongos. Los ambientes cálidos, como los generados cuando se utilizan calentadores de ambiente durante el invierno, favorecen el crecimiento de hongos en los alimentos (CIAD, 2021).

#### **3.7.3 Norma enfocada a hongos**

NOM-111-SSA-1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

Los mohos y levaduras están ampliamente distribuidos en la naturaleza, es de gran importancia cuantificar los mohos y levaduras en los alimentos, puesto que al establecer la cuenta de estos microorganismos permite su utilización como un indicador de prácticas

sanitarias inadecuadas durante la producción y el almacenamiento de los productos, así como el uso de materia prima inadecuada. Esta Norma Oficial Mexicana establece el método general para determinar el número de mohos y levaduras viables presentes en productos destinados al consumo humano por medio de la cuenta en placa a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### **3.8 Coliformes totales**

#### **3.8.1 ¿Qué son los coliformes totales?**

Son un grupo de bacterias que se encuentran en el suelo (siembra), el agua y el tracto intestinal de los animales, estas bacterias se han utilizado como indicadores de condiciones insalubres en la producción de alimentos y bebidas. Actualmente en la microbiología sanitaria se hace recuento de estas bacterias para valorar las buenas prácticas higiénicas en las industrias de alimentos y bebidas. Los coliformes son bacterias anaerobias gramnegativas que no forman esporas, tienen la capacidad de fermentar lactosa y producir ácido. Dentro de este grupo de bacterias se encuentran cuatro géneros, los cuales son: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella* (3M, 2023).

#### **3.8.2 Alimentos donde se encuentran los coliformes totales**

Los coliformes que se encuentran naturalmente en los alimentos se eliminan en la mayoría de las condiciones de procesamiento de calor (por ejemplo, la pasteurización de la leche). Por lo que, su presencia en alimentos que ya han sido procesados indica un proceso de calor inadecuado o contaminación posterior al procesamiento. Lo que indica que cualquier alimento puede contaminarse de coliformes si su procesamiento, empaque o transporte no se realizó de manera adecuada antes de llegar al consumidor (3M, 2023).

#### **3.8.3 Norma enfocada a coliformes totales**

NOM-113-SSA-1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en alimentos

El grupo de los microorganismos coliformes es el más ampliamente utilizado en la microbiología de los alimentos como indicador de prácticas higiénicas inadecuadas. El uso de los coliformes como indicador sanitario puede aplicarse para: La detección de prácticas sanitarias deficientes en el manejo y en la fabricación de los alimentos, para la evaluación

de la calidad microbiológica de un producto también podemos evaluar la eficiencia de prácticas sanitarias e higiénicas del equipo. Esta Norma establece el método microbiológico para determinar el número de microorganismos coliformes totales presentes en productos alimenticios por medio de la técnica de cuenta en placa.

### **3.9 Escherichia coli**

#### **3.9.1 ¿Qué es y cómo se clasifica?**

Según la NOM-210-SSA1-2014 *E. coli* es un microorganismo que está presente en el intestino del hombre y animales de sangre caliente, por lo que su presencia en una muestra de alimento no es deseable ya que indica la presencia de materia fecal. Este microorganismo es miembro de la familia *Enterobacteriaceae*. La mayoría de los aislamientos de *E. coli* no son considerados como patógenos, aunque pueden causar severas infecciones en personas inmunocomprometidas, en niños pequeños y ancianos. Ciertas cepas al ser ingeridas pueden causar enfermedades gastrointestinales en individuos sanos. Se considera como un microorganismo común en intestino, pero existen cepas patógenas que afectan al ser humano, como lo es el serotipo O157:H7, ocasionando graves cuadros clínicos que pudieran ocasionar la muerte. Produce ácido en agar que contenga 5-bromo-4-cloro-3-indol-b-D glucuronido y es b-glucuronidasa positivo incubado a  $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$   $^{\circ}\text{C}$  por  $22\text{h} \pm 2\text{h}$ .

En el siguiente cuadro se muestra la clasificación de los serotipos de *E. coli*.

| Cuadro IV<br>CARACTERÍSTICAS DE LOS GRUPOS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> CAUSANTES DE DIARREA                               |                                                                                    |                                                                     |                                                                                                                                             |                                                                                              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Grupo                                                                                                                    | Síntomas clínicos                                                                  | Epidemiología                                                       | Serogrupos y serotipos más comunes                                                                                                          | Factores de patogenicidad                                                                    |
| ETEC                                                                                                                     | Diarrea aguda acuosa                                                               | Niños menores de dos años y diarrea del viajero                     | O8:H9, O15:H11, O20:H-, O25:H-O27:H7,O78:H12, O148:H28, O159:H20                                                                            | ST y LT<br>CFA                                                                               |
| EHEC                                                                                                                     | SUH, CH, diarrea sin sangre, dolor abdominal, fiebre, vómito                       | Niños y adultos que la adquieren por comer carne cruda o mal cocida | O157:H7 O26:H11, O103:H2, O113:H21 O119, O128, O145                                                                                         | STX<br>A/E<br>Intimina<br>pO157                                                              |
| EIEC                                                                                                                     | Diarrea con moco y sangre o diarrea acuosa, también se presenta cuadro disentérico | Niños menores de seis meses                                         | O28:H, O112ac:H-, O144:H-, O152:H-, 164:H-O167:H-                                                                                           | Invasividad<br>Plásmido de 140MDa                                                            |
| EPEC                                                                                                                     | Diarrea aguda, dolor abdominal, vómito, fiebre baja                                | Niños menores de seis meses hasta dos años                          | O55, O86, O142, O111:H- O127,                                                                                                               | A/E, BFP<br>Plásmido EAF de 50-70MDa                                                         |
| EAEC                                                                                                                     | Diarrea líquida, verde con moco, sin sangre, diarrea persistente hasta 20 días     | Recién nacidos y niños menores de dos años                          | O44:H18                                                                                                                                     | Fimbria AAFI y II<br>EASTI<br>Proteínas Pet y Pic<br>OMP<br>Plásmido de 60 MDa<br>Citotoxina |
| DAEC                                                                                                                     | Diarrea acuosa sin sangre                                                          | Niños de 1 a 5 años                                                 | O126:H27                                                                                                                                    | Fimbria F1845<br>OMP                                                                         |
| LT= toxina termolábil<br>ST= toxina termo estable<br>CFA=factor de colonización antigénico<br>BFP= pili con forma rizada |                                                                                    |                                                                     | EAF = factor de adherencia de EPEC<br>OMP= proteína de membrana externa<br>STX= toxina shiga<br>EAST = toxina ST de cepas enteroagregativas |                                                                                              |
| Modificado de: Eslava C et al <sup>2</sup>                                                                               |                                                                                    |                                                                     |                                                                                                                                             |                                                                                              |

**Figura 2** Características de los grupos de *E. coli* causantes de diarrea (Rodríguez, M. (2002).

### 3.9.2 Alimentos donde se encuentra *E. coli*

Se puede encontrar en carne picada cruda o poco cocida, leche cruda y sus derivados, hortalizas y semillas germinadas crudas contaminadas (OMS, 2018).

### 3.9.3 Norma enfocada a *E. coli*

NOM-210-SSA1-2014. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.}

Esta norma define a *Escherichia coli* como un microorganismo que está presente en el intestino del hombre y animales de sangre caliente, por lo que su presencia en una muestra de alimento no es deseable ya que indica la presencia de materia fecal.

NOM-113-SSA-1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en alimentos

Esta Norma establece el método microbiológico para determinar el número de microorganismos coliformes totales presentes en productos alimenticios por medio de la técnica de cuenta en placa.

### **3.10 Criopreservación**

La técnica de criopreservación consiste en congelar células o tejidos a temperaturas generalmente entre -80 °C (ultra-congelación). Para reducir el metabolismo celular hasta el punto de prácticamente anularlo. Los microorganismos, antes de ser congelados, son suspendidos en un agente crioprotector, el cual ayuda a mejorar su supervivencia en comparación a si son suspendidos sólo en agua. La criopreservación presenta ventajas sobre otros métodos de preservación, por ejemplo, se puede aplicar a la mayoría de los géneros microbianos, reduce el riesgo de contaminación y permite la mantención de los microorganismos a largo plazo (Ocares & castro, 2020).

### **3.11 Extracción de ADN**

La extracción de ADN es un proceso de varias etapas, como primer paso se debe romper la membrana plasmática para tener acceso al núcleo de la célula, después se debe romper la membrana nuclear para dejar libre el ADN. La lisis de las células se consigue mediante la adición de tampones con concentraciones elevadas de iones, los cuales nos servirán para romper la estructura tridimensional de macromoléculas como las proteínas que forman parte de la estructura celular. La adición de un detergente como el SDS (Dodecil Sulfato Sódico) es necesaria para eliminar las membranas. El ADN se encuentra asociado a proteínas, por lo que se suele añadir proteasas al tampón de extracción, las cuales nos ayudaran a romper los enlaces peptídicos de las proteínas, también se utilizara el acetato (amónico o sódico) para precipitarlas. El ADN es insoluble en alcohol, por lo que se puede precipitar con etanol frío o isopropanol y recuperar mediante un proceso de centrifugación. El sedimento o pellet resultante se puede re-suspender posteriormente en agua o tampón tras ser secado completamente (Tuya, Curbelo y Montero, 2016).

### **3.12 Electroforesis en gel de agarosa**

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas por su tamaño y carga. La mayoría de los polímeros biológicos, tales como proteínas y ácidos nucleicos, tienen grupos ionizables que normalmente tienen carga negativa en disolución acuosa. En el caso específico del ADN la ionización de las moléculas es una función directa del número de

nucleótidos (pares de bases en una molécula de ADN bicatenario) de los fragmentos disueltos. Por lo que, si sometemos un conjunto de moléculas de ADN de diferentes tamaños a un campo eléctrico, se producirá una migración diferencial consecuencia de su diferente ionización y de su tamaño desigual, finalizando en una separación física de las mismas. La electroforesis se realiza en diferentes tipos de matrices o geles, que actúan a modo de red o tamiz. Estos geles permiten una mayor estabilidad y precisión en el proceso de separación. Para el caso específico de la electroforesis de fragmentos de ADN se emplean los geles de agarosa (Tuya et al., 2016).

### **3.13 PCR**

La PCR es exacta y reproducible además proporciona la ventaja de empezar con una pequeña cantidad de ADN y ser capaz de amplificarlo de forma que se tenga lo suficiente para realizar cualquier experimento que sea de nuestro interés, como secuenciaciones de ADN en proyectos de genoma, pruebas de paternidad, diagnóstico clínico, etc. En una reacción de PCR, el primer paso es la preparación de la muestra de ADN que es extraída de varias fuentes biológicas o tejidos. En la PCR, el ADN o gen a amplificar se define como “target” (diana) y los oligonucleótidos sintéticos utilizados se definen como “primers” (cebadores). Cada cebador se une a uno de los extremos de cada cadena de ADN y es el punto de inicio de la amplificación. El volumen total de reacción es de 25-50 µl. En el primer paso de la reacción de PCR, las cadenas complementarias de ADN se separan (desnaturalizan) la una de la otra a 94°C, mientras que la Taq polimerasa permanece estable. En el segundo paso, conocido como emparejamiento, la muestra es enfriada a una temperatura entre 40-65°C que permita la hibridación de los 2 cebadores, cada uno a una hebra del ADN molde. En el tercer paso, conocido como extensión, la temperatura es elevada a 72°C y la Taq polimerasa añade nucleótidos a los cebadores para completar la síntesis de una nueva cadena complementaria. Estos tres pasos, desnaturalización-emparejamiento-extensión, constituye un ciclo de PCR. Este proceso se repite durante 20-40 ciclos amplificando la secuencia de manera exponencial. La PCR se lleva a cabo en un termociclador, este es un equipo programado para un rápido calentamiento, enfriamiento y mantenimiento de las muestras durante varias veces. El producto amplificado será detectado mediante electroforesis en gel de agarosa (BIOTED, 2016).



## Gen 16S rRNA

El ADN ribosomal 16s es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 nucleótidos, codificado por el gen rrs, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica de los procariotas, su secuenciación es utilizada para la identificación de cepas bacterianas como mínimo a nivel de género y muchas veces a nivel de especie (CECT, 2022).

### **3.14 Purificación de ADN**

La purificación de fragmentos de ADN o de productos de PCR implica la separación del ADN de los componentes de la reacción in vitro o de los fragmentos del gel de agarosa. Por lo que después del proceso de purificación el ADN estará libre de cualquier nucleótido, cebador o pequeña molécula que puede interferir en el rendimiento de las aplicaciones posteriores (PROMEGA, 2023).

### **3.15 REP-PCR**

La REP-PCR (del inglés, Repetitive element palindromic PCR) utiliza cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetidas, de esta manera este tipo de PCR amplifica elementos repetitivos en los genomas bacterianos, para darnos cuenta si tenemos a la misma cepa de acuerdo con el número de múltiplos repetidos. Estos múltiplos repetidos de ADN pueden estar formados por unidades idénticas, unidades mixtas o secuencias repetidas degeneradas. En el genoma se encuentran cientos de copias de estas secuencias repetidas, los cuáles se caracterizan por mostrar hipervariabilidad entre cada cepa, por lo tanto, los perfiles de ADN son específicos para cada cepa. (Reynoso, Dieser y Molina, 2022).

### **3.16 Secuenciación del gen 16s**

La secuenciación del ADN determina el orden de las "bases nitrogenadas", que se encuentran en un segmento específico de ADN. En este caso la secuenciación del gen 16s permitirá obtener información filogenética y taxonómica, la cual será utilizada para la identificación de cepas bacterianas como mínimo a nivel de género y muchas veces a nivel de especie (CECT, 2022).

#### 4 MARCO DE REFERENCIA

**Tabla 2** Información documental de investigaciones similares a nuestra investigación

| Nombre                                                                                                            | Autor y Año                                         | Resultados                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales que se comercializan en mercados de la ciudad de Huánuco. | Vásquez J, Tasayco R, Chuquiyauri M y Cuba P. 2015. | En las muestras de quesos procesados se encontró coliformes totales, sin embargo la gran mayoría de los quesos según el criterio microbiológico están aptos para el consumo humano, mientras que el 23,9% no son aptos para el consumo humano, el 2,9% son marginalmente aceptables para el consumo humano, corriendo el riesgo de contraer la enfermedad si son consumidos. |

|   |                                                                                                                                                |                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5 | <p>Caracterización molecular y serológica de <i>Escherichia coli</i> en quesos artesanales de seis departamentos de Honduras.</p>              | <p>Fiallos J, Enríquez M, Montoya B y Navarra A. 2018</p> | <p>Un total de 48 cepas se obtuvieron del estudio del 2015 donde un 86% (n=41) fueron obtenidas de queso semiseco, y el resto de ellas de queso fresco y seco. Un 58% (n=28) amplificaron para dos patotipos principales EPEC (en un 54%) y ETEC (46%). El grupo filogenético predominante fue el B1 con un 50% (n=24). Los serogrupos predominantes en las cepas fueron O6, O8, O159.</p> |
|   | <p>Caracterización molecular de cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela</p> | <p>Guillén L, Millán B y Araque M. 2014</p>               | <p>El 73,3% de las cepas fueron susceptibles a todos los antibióticos probados y el 24,4% presentaron resistencia a la ampicilina. La mayoría de las cepas resistentes fueron aislada. El 82,2% de las cepas fueron ubicadas en el filogrupo A y el 8,9% en los grupos B1 y D, respectivamente La tipificación por Rep-PCR de las cepas demostró una estructura poblacional</p>            |

|  |  |              |
|--|--|--------------|
|  |  | heterogénea. |
|--|--|--------------|

## 6 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

San Martín Caltenco es una localidad del estado de Puebla se encuentra dentro del municipio de Tochtepec, su población asciende a 4950 personas de las cuales el 40 por ciento aproximadamente se dedica a la ganadería y cría de animales, particularmente al ganado vacuno, por lo que todos los días se entrega leche fresca a las personas que se dedican a la realización de lácteos artesanalmente, dentro de la comunidad hay una pequeña empresa que produce cantidades más grandes de lácteos que los negocios pequeños o familias que se encuentran dentro de este negocio. Todos estos productores artesanales de lácteos salen a repartir sus productos a pueblos cercanos de la comunidad e incluso se mueven a otros estados como Oaxaca para hacer entregas más grandes. El queso fresco es un lácteo que tiene mucha aceptación social por su sabor y frescura, pero este puede estar contaminado por microorganismos patógenos para el ser humano como lo es *Escherichea coli*. Esta bacteria se encuentra normalmente en el intestino del ser humano y de los animales de sangre caliente. La mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas, sin embargo, algunas de ellas, como *E. coli* productora de la toxina Shiga, puede causar graves enfermedades a través de los alimentos. Esta bacteria puede crecer a temperaturas que oscilan entre 7 °C y 50 °C, con una temperatura óptima de 37 °C. Algunas pueden proliferar en alimentos ácidos, con pH de hasta 4.4, y en alimentos con una actividad de agua ( $a_w$ ) mínima de 0,95. La mayoría de los pacientes infectados por esta bacteria se recuperan en el término de diez días, pero en un pequeño porcentaje de los casos (especialmente niños pequeños y ancianos) la infección puede conducir a una enfermedad potencialmente mortal, como el síndrome hemolítico urémico (SHU). El SHU se caracteriza por una insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica y trombocitopenia (deficiencia de plaquetas). Se estima que hasta un 10% de los pacientes con infección por *E. coli* productora de toxina Shiga pueden desarrollar síndrome hemolítico urémico, con una tasa de letalidad de 3%-5%. La mayor parte de la información disponible sobre *E. coli* productora de toxina Shiga guarda relación con el serotipo O157: H7, pues es el más fácil de distinguir bioquímicamente de otras cepas de *E. coli*. *E. coli* O157: H7 se transmite al hombre principalmente por el consumo de

alimentos contaminados, como productos de carne picada cruda o poco cocida, leche cruda y sus derivados como yogurt y queso elaborado con leche sin pasteurizar (OMS, 2018).

Cada año, 600 millones de personas enferman por comer alimentos. En 2010, 420 000 personas, un tercio de ellas niños menores de cinco años, fallecieron por enfermedades como salmonelosis y la infección por *Escherichia coli*, se estima que esta cifra aumenta cada año, pero es difícil hacerse una idea clara del impacto real de estas enfermedades en todo el mundo (OMS, 2021). Con esta información, nos surge la siguiente pregunta de investigación. ¿Cuál es la frecuencia de *E. coli* en muestras de quesos artesanales de San Martín Caltenco?

## **7 JUSTIFICACIÓN**

En esta investigación se permitirá identificar la mejor opción de queso fresco, en cuanto a salud e higiene, lo que servirá como base para que las personas conozcan, si la opción de queso fresco que eligen es la más segura, lo que podría contribuir a una baja en la incidencia de enfermedades transmitidas por *E. coli*.

También servirá con base de información para las personas que realizan el queso de manera artesanal, para que tomen en cuenta el sin fin de microorganismos que puede tener el producto que están ofreciendo a la población, y por ende pueden ser los responsables de generar un problema de salud pública que puede costar un brote epidemiológico o una epidemia.

## **8 OBJETIVOS**

### **8.1 Objetivo general**

Identificar y caracterizar *E. coli* en quesos frescos artesanales de San Martín Caltenco.

### **8.2 Objetivos específicos**

1. Determinar *E.coli* en muestras de quesos.
2. Aislar e identificar fenotípicamente las cepas aisladas de *E. coli*
3. Identificar molecularmente *E.coli* y sus serotipos aislados

## 9 HIPÓTESIS

### 9.1 Hipótesis

*Escherichia coli* estará presente en las muestras de queso fresco de San Martín Caltenco.

### 9.2 Hipótesis nula

*Escherichia coli* no estará presente en las muestras de queso fresco de San Martín Caltenco

## 10 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

### 10.1 Tipo de estudio

El estudio es de tipo descriptivo experimental, Según (Fidias G. Arias, 2012).

### 10.2 Universo del estudio

En esta investigación se tomarán en cuenta negocios de quesos frescos artesanales, que se encuentren dentro de la comunidad de San Martín Caltenco.

### 10.3 Tamaño de muestra

En este estudio se tomará una muestra finita ya que es posible contabilizar o tener el número exacto de establecimientos a los que se aplicará el experimento. Para llevarlo a cabo se utilizará la siguiente formula:

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{e^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

**Formula 1** Muestras finitas

Dónde:

**n** = Tamaño de muestra buscado

**N** = Tamaño de la Población o Universo

**z** = Parámetro estadístico que depende el Nivel de Confianza (NC)

**e** = Error de estimación máximo aceptado

**p** = Probabilidad de que ocurra el evento estudiado (éxito)

**q** = (1 - p) = Probabilidad de que no ocurra el evento estudiado

Sustituimos la fórmula para obtener el número de muestras a utilizar

Dónde:

N= 6 establecimientos de quesos frescos elaborados artesanalmente

z = 1.96 (parámetro estadístico de confianza)

e = 5%

p = 50%

q = 50%

$$n = \frac{6*(1.96)^2*(50)(50)}{(5)^2(6-1)+(1.96)^2(50)(50)} = 5.9$$

Estaremos utilizando 6 muestras de queso fresco.

Nota: para hacer un mejor monitoreo microbiológico haremos el experimento por quintuplicado, cada semana se analizará una muestra de cada establecimiento, por lo que 5 semanas consecutivas estaremos analizando una muestra de lote diferente de cada establecimiento.

#### **10.4 Sede y lugar de estudio**

Se tomarán las muestras de queso fresco de la localidad de San Martín Caltenco, Tochtepec, Puebla. De ahí se trasladarán al primer lugar de estudio que es el laboratorio de microbiología de la BUAP, en donde se aislará fenotípicamente la bacteria, ya aislada la bacteria, se llevarán las cepas al segundo lugar de estudio, que es el Tecnológico de Monterrey en donde se hará la identificación y caracterización molecular de las cepas aisladas.

#### **10.5 Criterios de selección**

##### **10.5.1 Criterios de inclusión**

Muestras de quesos frescos que son elaboradas de manera artesanal, dentro de la comunidad de San Martín Caltenco.

### **10.5.2 Criterios de exclusión**

Muestras de quesos frescos en tiendas o pequeños minisúper de donde no se sabrá con exactitud de donde provinieron esos quesos frescos.

### **10.6 Diseño estadístico**

Los instrumentos empleados para esta investigación serán tres checklist, el primero se hará al momento de tomar las muestras, en donde evaluaremos el tipo y las condiciones en las que se encuentra el establecimiento, vestimenta de la persona que realiza el queso, empaque del queso, y si usa protección personal como guantes al momento de despachar el queso. En el segundo cotejaremos a cada grupo de microorganismo encontrado y su número de colonias, en cada muestra de queso fresco. Finalmente, en el tercero cotejaremos si se encontró E. coli.

## **11 METODOLOGÍA**

### **11.1 Materiales y metodologías**

#### **11.1.1 Materiales**

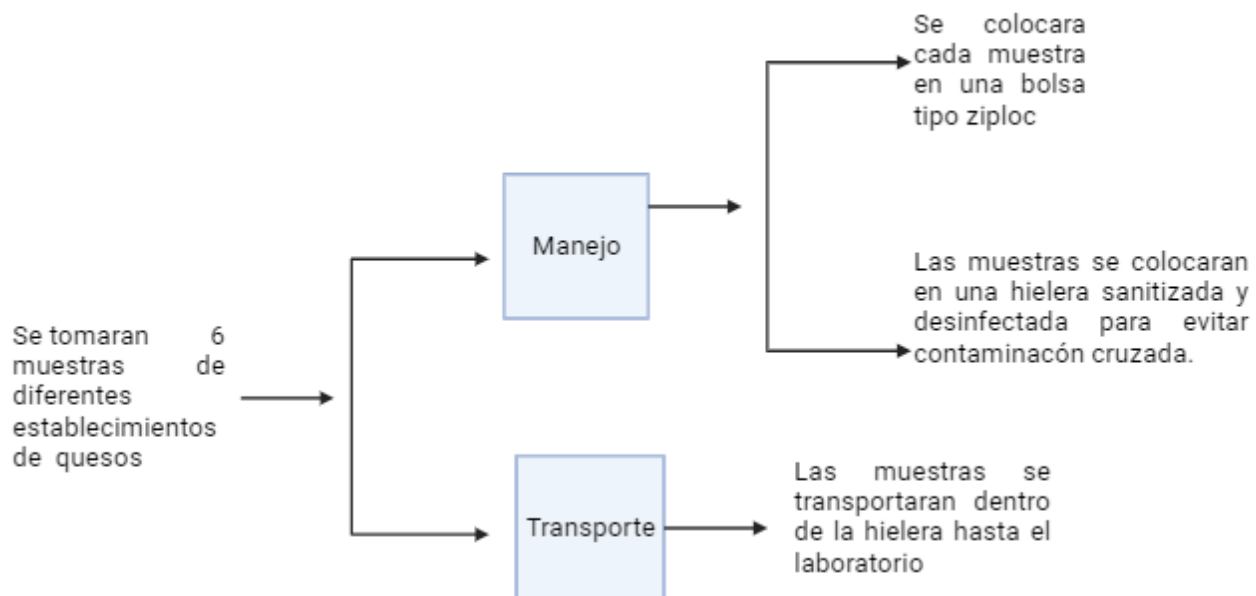
- Cajas Petri
- Asas bacteriológicas
- Pruebas bioquímicas
- Medios de cultivo
- Mechero
- Autoclave
- Balanza
- Frascos
- Pipetas
- Contador de colonias
- Bolsas estériles
- Cinta testigo
- Plumón
- Encendedor
- Refrigerador
- Refrigerador de ultracongelación



- Nanadrop
- Estufa
- Camara de electroforesis
- Fuente de poder de 220V
- Termomix
- Vortex
- Geles de agarosa
- Kit de purificación
- Kit de extracción de ADN
- Hielo
- Parafilm
- Gradillas
- Kit de PCR
- Kit de REP-PCR
- Micropipetas
- Camara de UV
- Microtubos estériles
- Termociclador

### 11.1.2 Metodologías

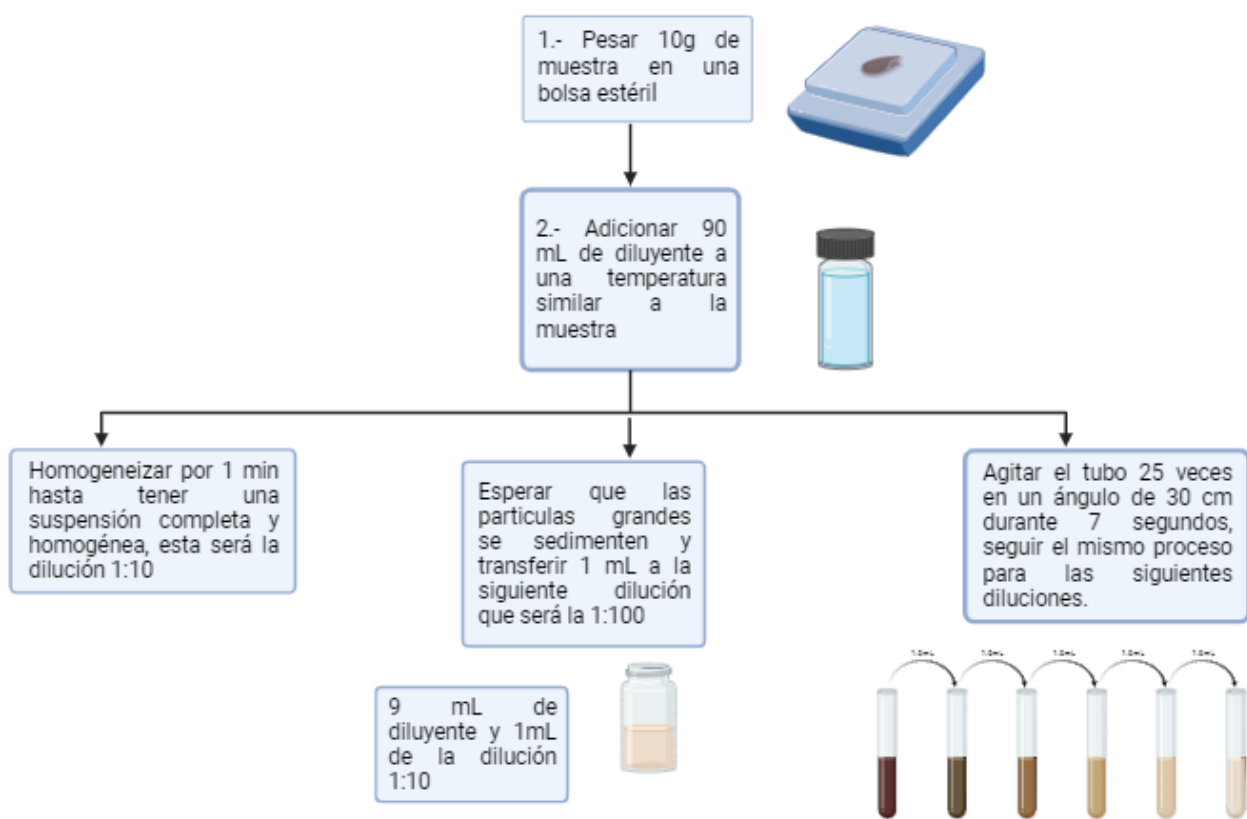
**Diagrama 1** Método para la toma, manejo y transporte de muestras según la NOM-109-SSA-1-1994



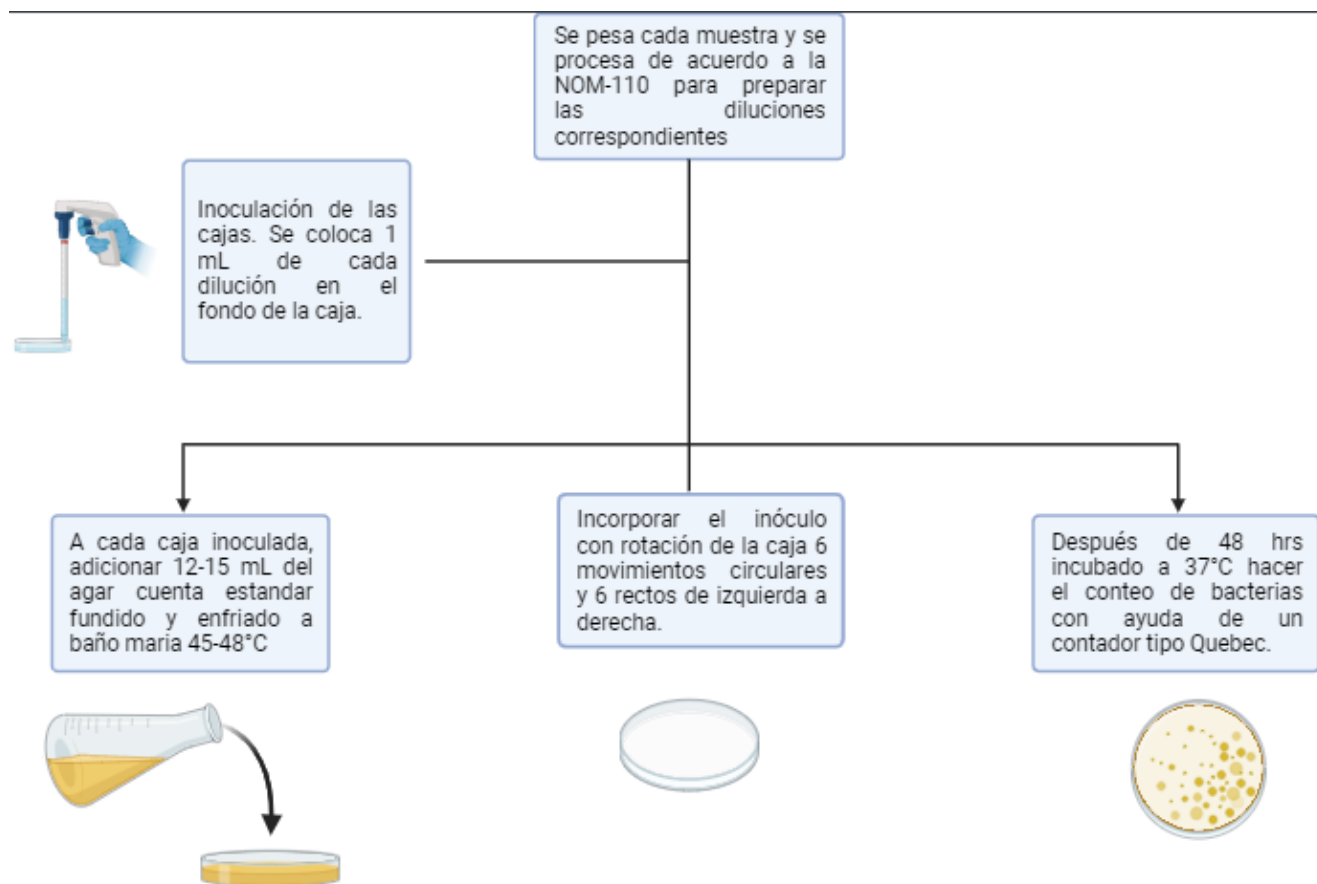
Muestras sólidas o semisólidas

Preparación de las diluciones adicionales.

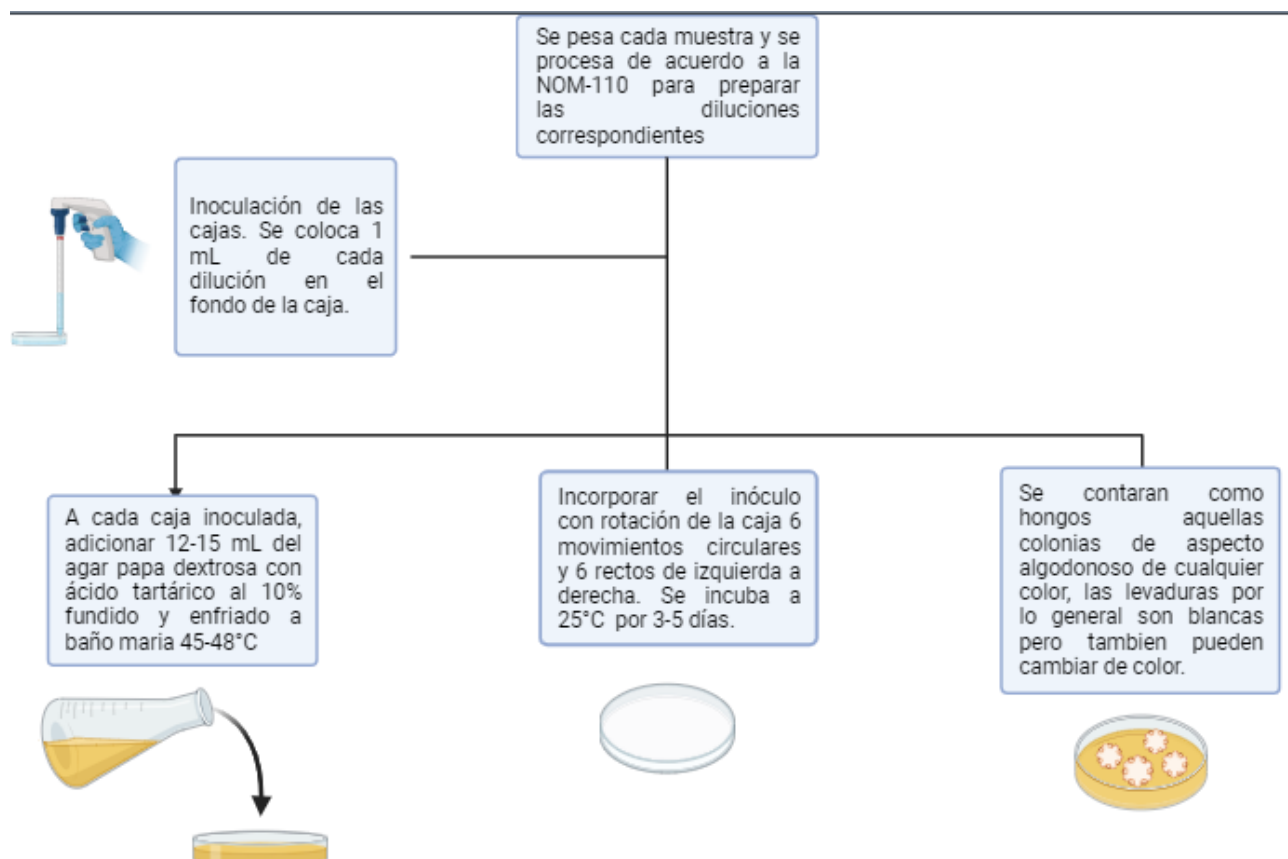
**Diagrama 2** Preparación y dilución de muestras de alimentos según la NOM-110-SSA1-1994



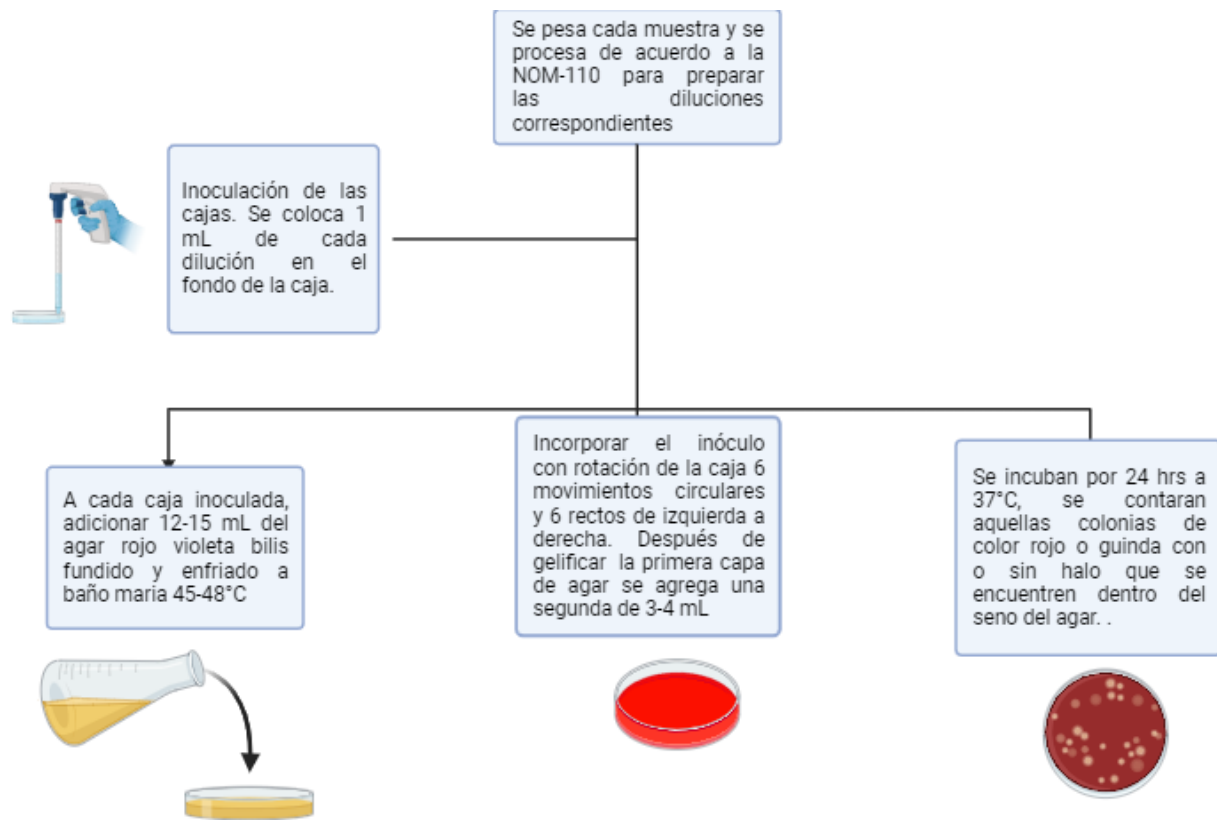
**Diagrama 3** Procedimiento para aislar bacterias mesofílicas aerobias de acuerdo con la NOM-110-SSA-1-1994



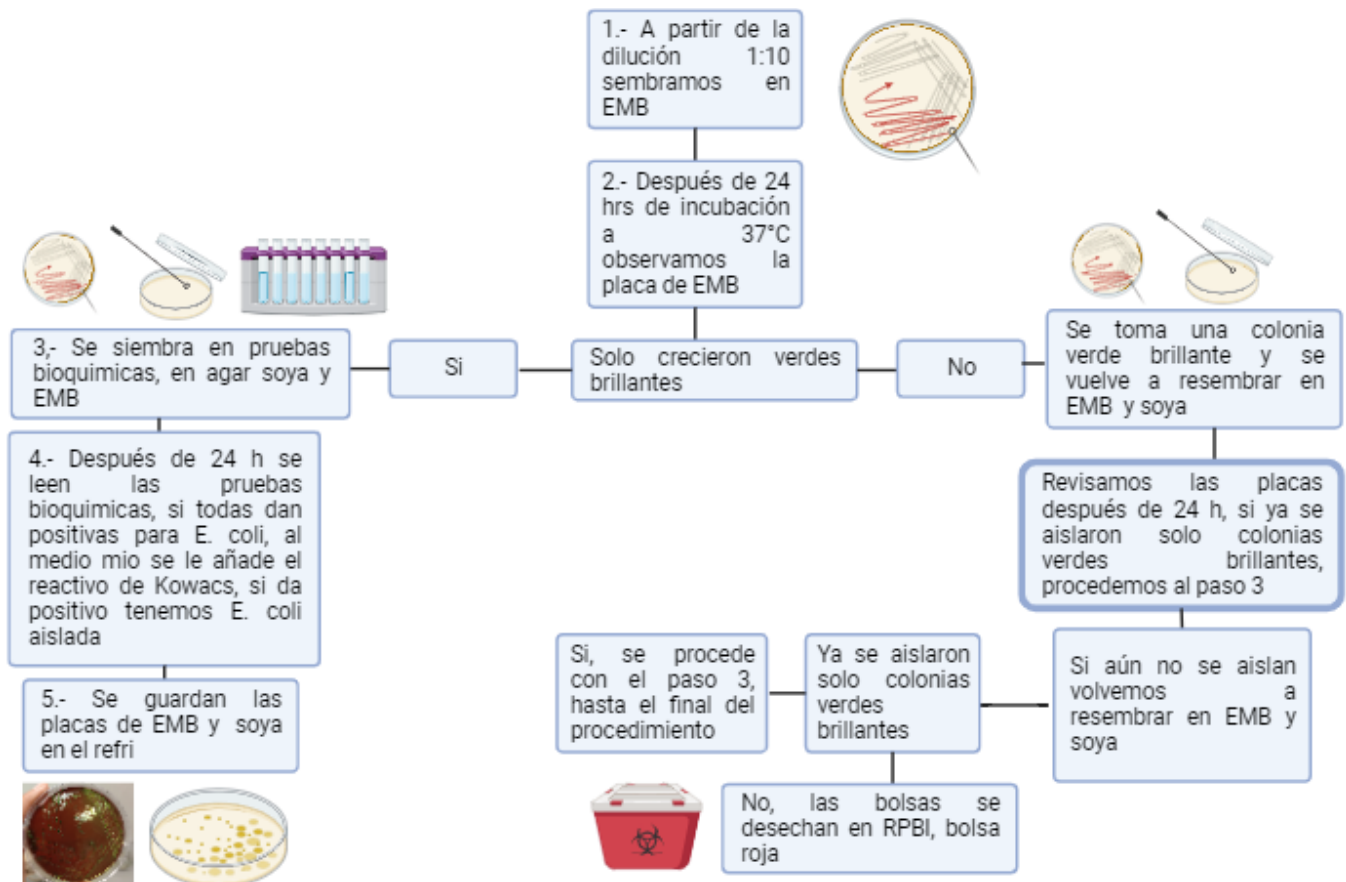
**Diagrama 4** Procedimiento para aislar mohos y levaduras de acuerdo con la NOM-111-SSA-1-1994



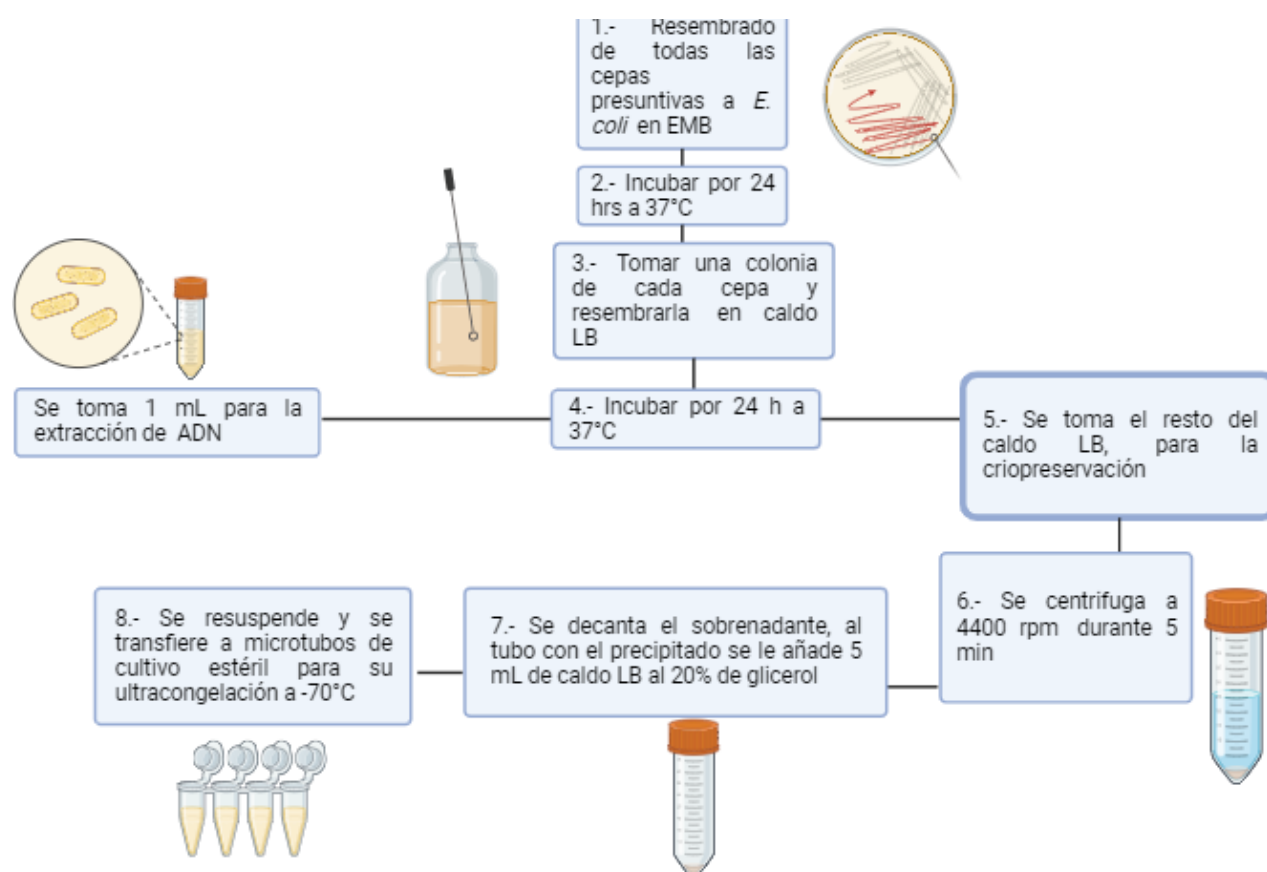
**Diagrama 5** Procedimiento para aislar coliformes totales de acuerdo con la NOM-113-SSA-1-1994



**Diagrama 6** Procedimiento para aislar *E. coli*

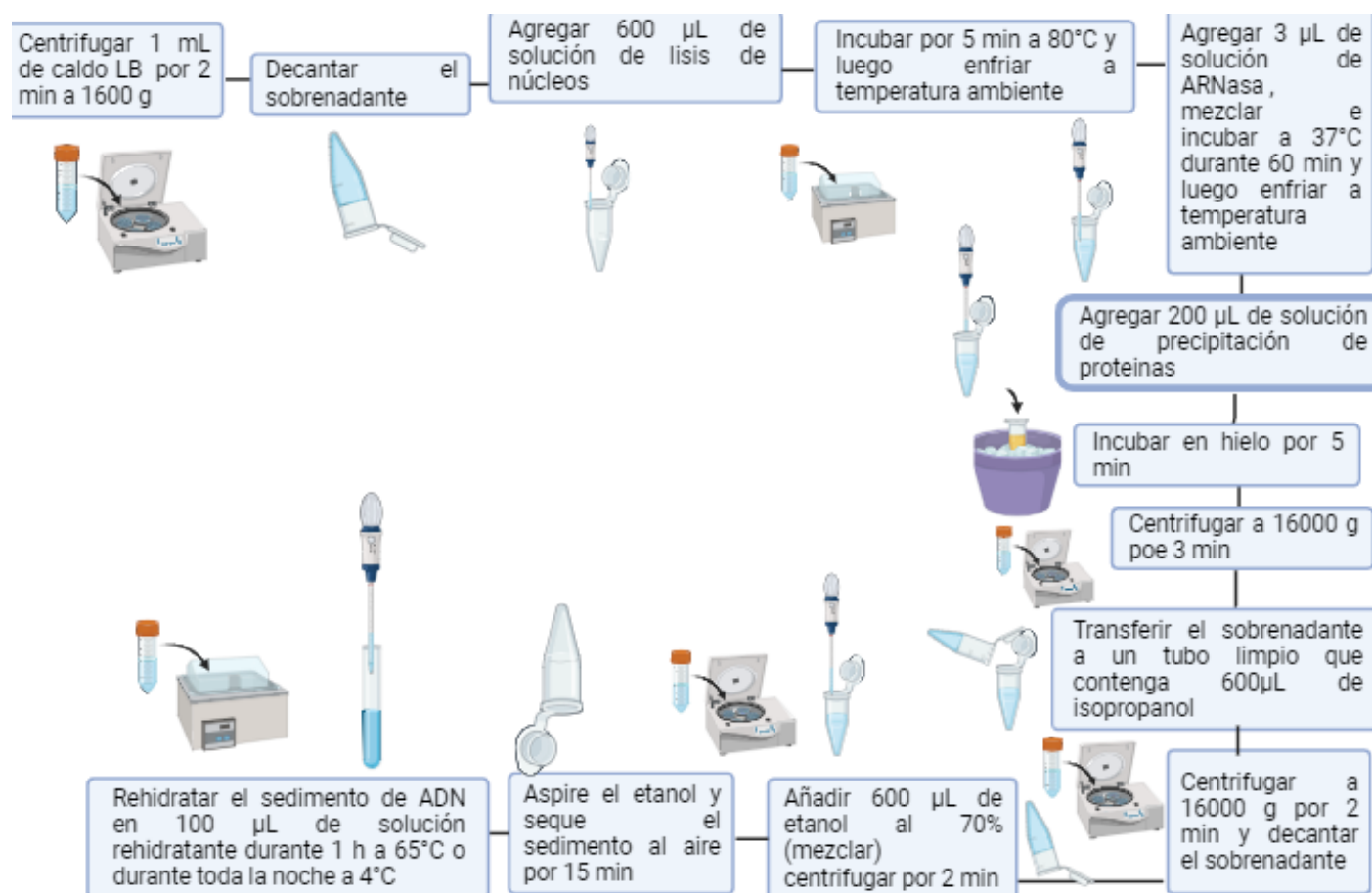


**Diagrama 7** Criopreservación de las cepas aisladas de *E. coli*

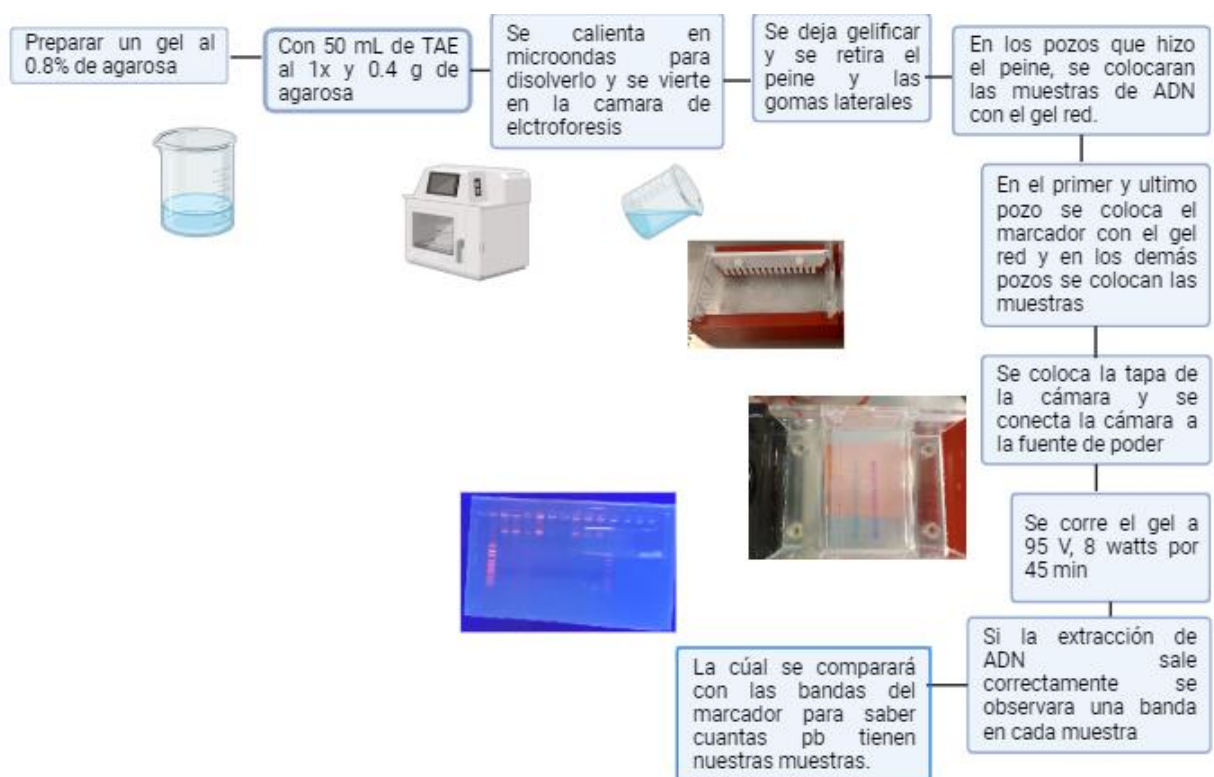




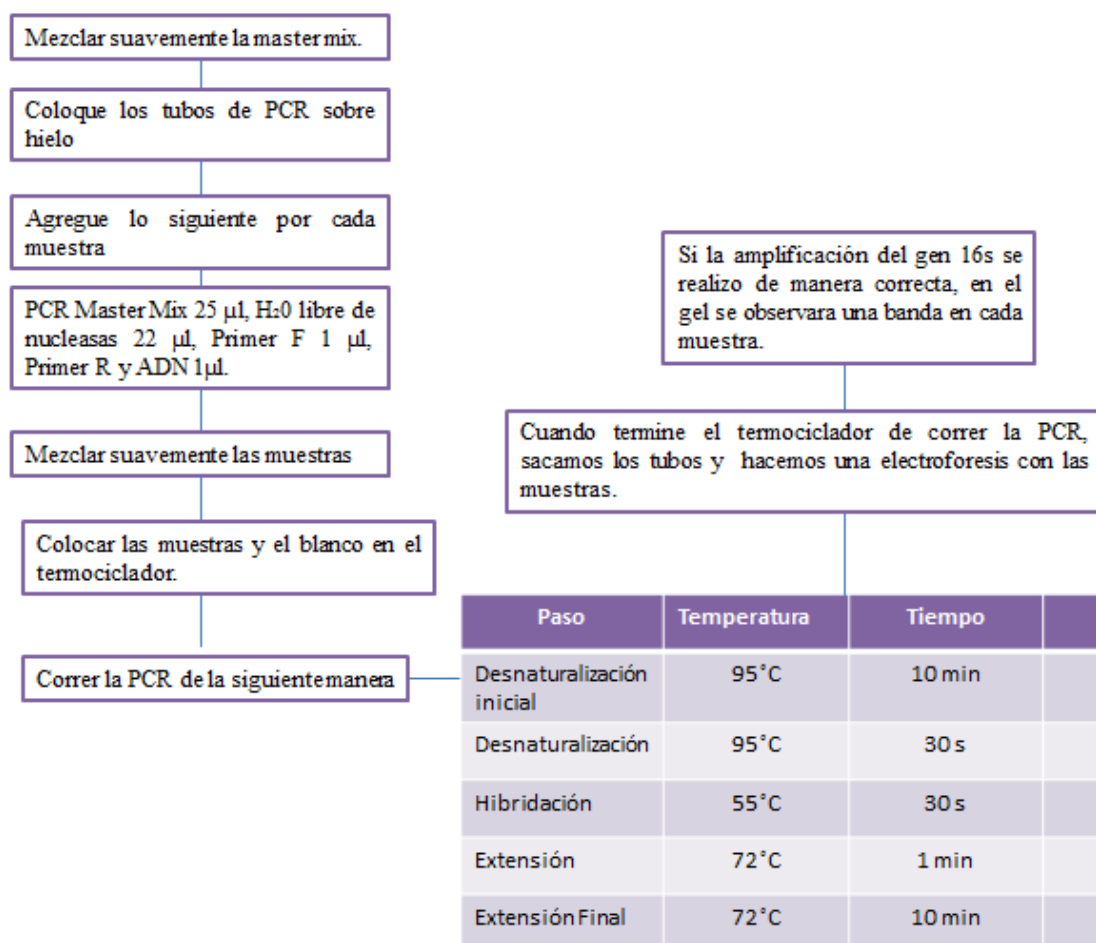
**Diagrama 8** Extracción de ADN



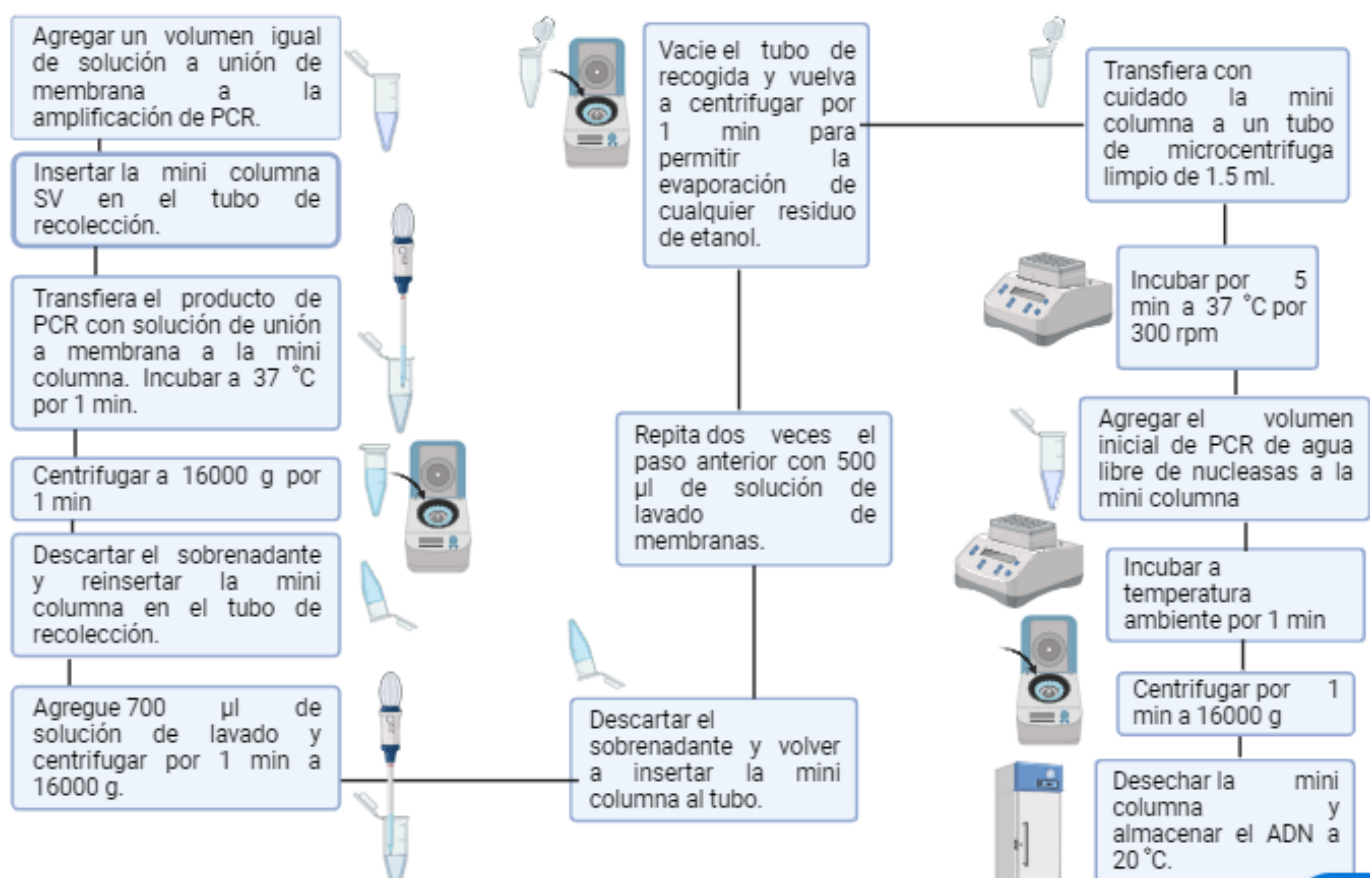
**Diagrama 9** Electroforesis en gel de agarosa



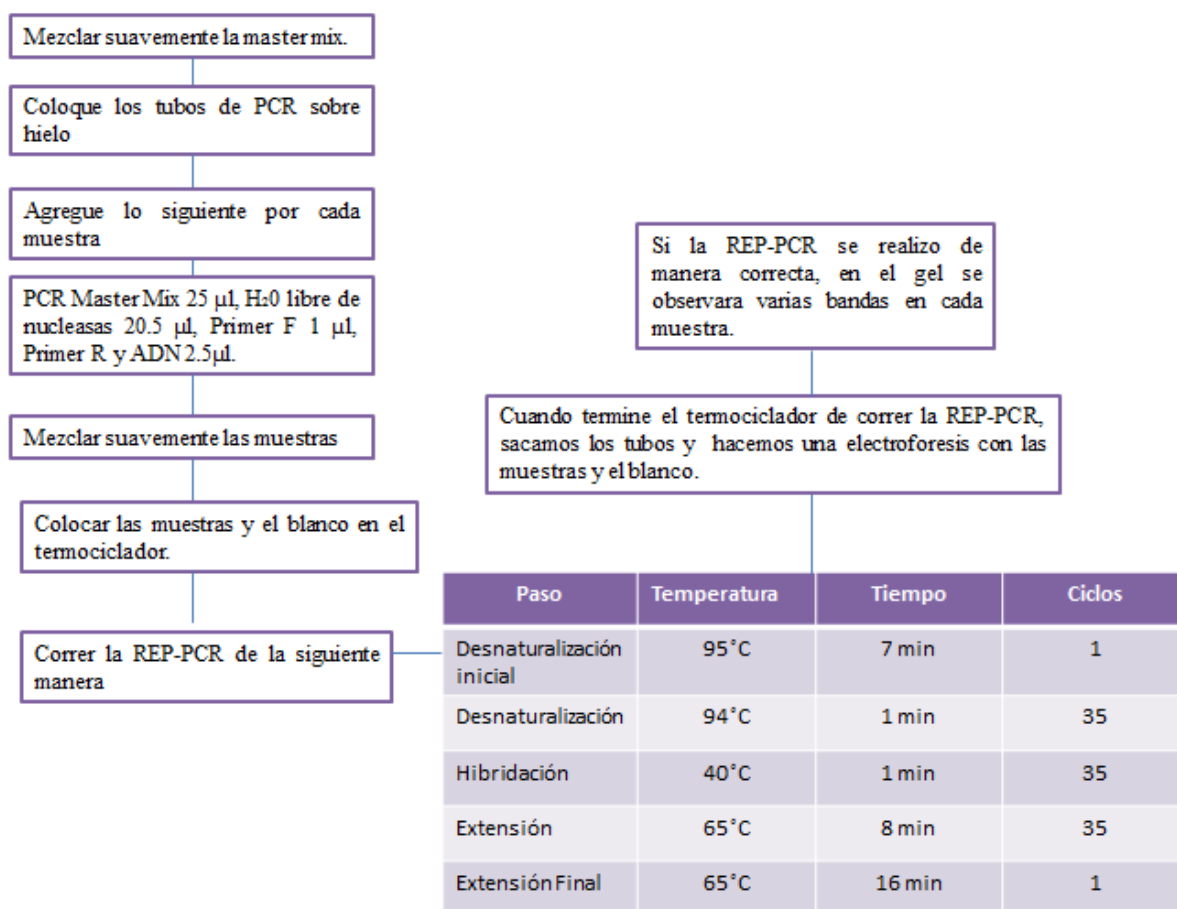
**Diagrama 10 PCR**



**Diagrama 11** Purificación de ADN



**Diagrama 12 REP-PCR**



## 12 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 12.1 Muestreo

Se llevaron a cabo seis muestreos en seis diferentes establecimientos de quesos frescos elaborados artesanalmente de la localidad de San Martín Caltenco, que se ubica dentro del estado de Puebla, los muestreos se llevaron a cabo en los meses de agosto y septiembre de 2023 (Tabla 3).

**Tabla 3** Semanas donde se realizaron los muestreos

| Muestreo                    | Muestras                                                                                            |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 (14 de agosto de 2023)    | M <sub>1</sub> y M <sub>2</sub>                                                                     |
| 2 (21 de agosto de 2023)    | M <sub>1</sub> , M <sub>2</sub> , M <sub>3</sub> , M <sub>4</sub> , M <sub>5</sub> y M <sub>6</sub> |
| 3 (28 de agosto de 2023)    | M <sub>1</sub> , M <sub>2</sub> , M <sub>3</sub> , M <sub>4</sub> , M <sub>5</sub> y M <sub>6</sub> |
| 4 (4 de septiembre de 2023) | M <sub>1</sub> , M <sub>2</sub> , M <sub>3</sub> , M <sub>4</sub> , M <sub>5</sub> y M <sub>6</sub> |

|                              |                                                                                                     |
|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5 (11 de septiembre de 2023) | M <sub>1</sub> , M <sub>2</sub> , M <sub>3</sub> , M <sub>4</sub> , M <sub>5</sub> y M <sub>6</sub> |
| 6 (18 de septiembre de 2023) | M <sub>3</sub> , M <sub>4</sub> , M <sub>5</sub> y M <sub>6</sub>                                   |

Los instrumentos empleados para esta investigación fueron tres Checklist, el primero se realizó al momento de comprar las muestras, el segundo se realizó cuando se hizo el conteo de colonias de cada grupo de microorganismo, finalmente el tercero se realizó después de secuenciar para cotejar el género y especie de las cepas aisladas.

En la figura tres se observa el primer checklist, en el cual se evalúa si la persona que vende los quesos frescos cuenta con un establecimiento (local) para venderlos, si está marcado con un puntito rojo significa que sí cuenta con un lugar o establecimiento, si no está marcado significa que utiliza su vivienda (cocina) para hacerlos, el segundo punto a evaluar es la limpieza, aquí se evalúa la vestimenta de la persona que despacha el queso, si está sucio, si se lava las manos antes de tomar el queso, si en nuestro checklist la limpieza tiene un puntito rojo significa que la persona tiene higiene, el siguiente aspecto a evaluar es si utilizan guantes al momento de desmoldar el queso y por último evaluamos si el queso viene en bolsa de plástico u otro tipo de empaque.

# PRIMER CHECKLIST



## MUESTRA 1

- ☐ Establecimiento
- ☒ Limpieza
- ☒ Equipo de protección personal
- ☒ Empaque

## MUESTRA 2

- ☐ Establecimiento
- ☐ Limpieza
- ☐ Equipo de protección personal
- ☒ Empaque

## MUESTRA 3

- ☐ Establecimiento
- ☒ Limpieza
- ☐ Equipo de protección personal
- ☒ Empaque

## MUESTRA 4

- ☐ Establecimiento
- ☒ Limpieza
- ☐ Equipo de protección personal
- ☒ Empaque

## MUESTRA 5

- ☐ Establecimiento
- ☒ Limpieza
- ☐ Equipo de protección personal
- ☒ Empaque

## MUESTRA 6

- ☐ Establecimiento
- ☒ Limpieza
- ☐ Equipo de protección personal
- ☒ Empaque

Figura 3 Primer checklist

En la figura cuatro se ilustra el segundo checklist, en donde cada puntito rojo significa las veces que el queso se paso de las UFC permitidas por la NOM-243-SSA1-2010, recordemos que el experimento se realizo por quintuplicado por lo que cada semana analizabamos 1 muestra de cada lote, de cada establecimiento, por lo que las muestras que contengan 5 puntitos en cada grupo de microorganismos significa que en los 5 lotes analizados, la muestra de queso fresco se paso del limite maximo permitido. Por ejemplo la muestra 1, se paso en tres lotes el valor maximo permitido de coliformes totales (CT), se paso en tres lotes el valor maximo permitido de bacterias mesofílicas aerobias (BMA), y se paso 1 lote del valor maximo permitido del hongos y levaduras.



# SEGUNDO CHECKLIST



## MUESTRA 1

- ☐ Excede el L.M. de CT
- ☐ Excede el L.M. de BMA
- ☐ Excede el L.M. de hongos y levaduras

## MUESTRA 4

- Excede el L.M. de CT ☐
- Excede el L.M. de BMA ☐
- Excede el L.M. de hongos y levaduras ☐

## MUESTRA 2

- ☐ Excede el L.M. de CT
- ☐ Excede el L.M. de BMA
- ☐ Excede el L.M. de hongos y levaduras

## MUESTRA 5

- Excede el L.M. de CT ☐
- Excede el L.M. de BMA ☐
- Excede el L.M. de hongos y levaduras ☐

## MUESTRA 3

- ☐ Excede el L.M. de CT
- ☐ Excede el L.M. de BMA
- ☐ Excede el L.M. de hongos y levadura

## MUESTRA 6

- ☐ Excede el L.M. de CT
- ☐ Excede el L.M. de BMA
- ☐ Excede el L.M. de hongos y levaduras

Figura 4 Segundo checklist

En la figura 5 tenemos al tercer checklist en donde evaluamos si se aislo E. coli o indicamos si se aislo otro microorganismo molecularmente.

# TERCER CHECKLIST



MUESTRA 1

¿Se aisló E. coli?

SI NO ☒

¿Se aisló otro microorganismo?

SI NO ☒

MUESTRA 4

¿Se aisló E. coli?

SI NO ☒

¿Se aisló otro microorganismo?

SI NO ☒

MUESTRA 2

¿Se aisló E. coli?

SI NO ☒

¿Se aisló otro microorganismo?

SI ☒ NO

MUESTRA 5

¿Se aisló E. coli?

SI NO ☒

¿Se aisló otro microorganismo?

SI NO ☒

MUESTRA 3

¿Se aisló E. coli?

SI NO ☒

¿Se aisló otro microorganismo?

SI ☒ NO

MUESTRA 6

¿Se aisló E. coli?

SI NO ☒

¿Se aisló otro microorganismo?

SI ☒ NO

**Figura 5** Tercer checklist

## 12.2 Aislamiento de cepas

Las muestras de quesos frescos llegaron al laboratorio de microbiología de la BUAP en bolsas tipo ziploc nuevas, dentro de una hielera. Para iniciar el proceso se empezó por desgelificar los medios; rojo violeta bilis, agar cuenta estándar y agar papa dextrosa, seguido por sacar del refrigerador los diluyentes y el ácido tartárico para atemperar, después de desgelificar los medios, se colocaron a baño María a 45°C para evitar su gelificación nuevamente. Se pesó 10g de cada muestra en zona de esterilidad en una bolsa nueva y estéril, a cada muestra se le añadió 90mL de diluyente, se homogenizó cada muestra con su diluyente y a partir de esta dilución 1:10 se prepararon las demás diluciones hasta llegar a la dilución  $10^6$ . A partir de la dilución 1:10 se sembró una placa en agar EMB, para el aislamiento de *E. coli* y a partir de las diluciones  $10^5$  y  $10^6$  se inoculaba una caja de agar rojo violeta bilis, una caja de agar cuenta estándar y una caja de agar papa dextrosa (al 10% de ácido tartárico) para cada muestra y cada dilución ( $10^5$  y  $10^6$ ).

**Tabla 4** Conteo de hongos y levaduras, bacterias mesofílicas aerobias y coliformes totales

| Semana | Muestra        | Dilución | Coliformes totales | Bacterias mesofílicas | Hongos y levaduras |
|--------|----------------|----------|--------------------|-----------------------|--------------------|
| 1      | M <sub>1</sub> | $10^5$   | 0 UFC              | 5 UFC                 | 0 UFC              |
|        |                | $10^6$   | 0 UFC              | 10<UFC                | 0 UFC              |
| 1      | M <sub>2</sub> | $10^5$   | 84 UFC             | 26 UFC                | 700 aprox. UFC     |
|        |                | $10^6$   | 7 UFC              | 5 UFC                 | 34 UFC             |
| 2      | M <sub>1</sub> | $10^5$   | 2 UFC              | 97 UFC                | 0 UFC              |
|        |                | $10^6$   | 0 UFC              | 7 UFC                 | 0 UFC              |
| 2      | M <sub>2</sub> | $10^5$   | 0 UFC              | 122 UFC               | 155 UFC            |
|        |                | $10^6$   | 0 UFC              | 4 UFC                 | 14 UFC             |
| 2      | M <sub>3</sub> | $10^5$   | 450 UFC            | 5200 aprox. UFC       | 1 UFC              |
|        |                | $10^6$   | 22 UFC             | 490 UFC               | 0 UFC              |
| 2      | M <sub>4</sub> | $10^5$   | 155 UFC            | 345 UFC               | 1500 aprox. UFC    |
|        |                | $10^6$   | 17 UFC             | 70 UFC                | 30 UFC             |
| 2      | M <sub>5</sub> | $10^5$   | 10 UFC             | 350 UFC               | 100 UFC            |

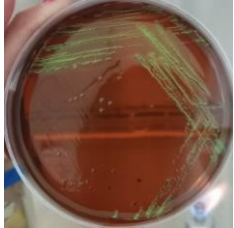
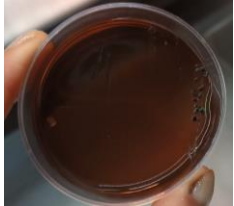
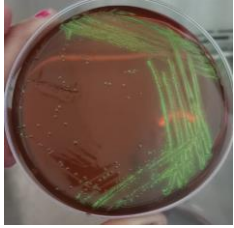
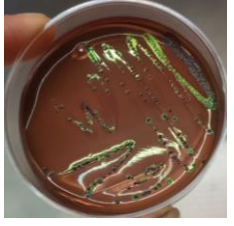
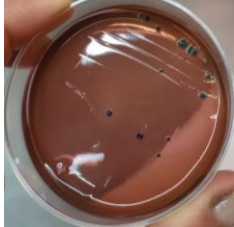
|   |       |        |         |                 |                 |
|---|-------|--------|---------|-----------------|-----------------|
|   |       | $10^6$ | 8 UFC   | 81 UFC          | 4 UFC           |
| 2 | $M_6$ | $10^5$ | 32 UFC  | 368 UFC         | 1 UFC           |
|   |       | $10^6$ | 15 UFC  | 174 UFC         | 0 UFC           |
| 3 | $M_1$ | $10^5$ | 430 UFC | 936 aprox. UFC  | 520 UFC         |
|   |       | $10^6$ | 59 UFC  | 156 UFC         | 200 UFC         |
| 3 | $M_2$ | $10^5$ | 74 UFC  | 370 UFC         | 215 UFC         |
|   |       | $10^6$ | 13 UFC  | 130 UFC         | 8 UFC           |
| 3 | $M_3$ | $10^5$ | 364 UFC | 200 UFC         | 800 UFC         |
|   |       | $10^6$ | 0 UFC   | 10<UFC          | 200 UFC         |
| 3 | $M_4$ | $10^5$ | 230 UFC | 4 UFC           | 1000 aprox. UFC |
|   |       | $10^6$ | 15 UFC  | 1 UFC           | 200 UFC         |
| 3 | $M_5$ | $10^5$ | 10 UFC  | 1300 aprox. UFC | 70 UFC          |
|   |       | $10^6$ | 3 UFC   | 170 UFC         | 20 UFC          |
| 3 | $M_6$ | $10^5$ | 215 UFC | 1400 aprox. UFC | 130 UFC         |
|   |       | $10^6$ | 42 UFC  | 364 UFC         | 27 UFC          |
| 4 | $M_1$ | $10^5$ | 0 UFC   | 14 UFC          | 0 UFC           |
|   |       | $10^6$ | 0 UFC   | 10<UFC          | 0 UFC           |
| 4 | $M_2$ | $10^5$ | 9 UFC   | 120 UFC         | 500 UFC         |
|   |       | $10^6$ | 0 UFC   | 20 UFC          | 34 UFC          |
| 4 | $M_3$ | $10^5$ | 500 UFC | 95 UFC          | 3 UFC           |
|   |       | $10^6$ | 40 UFC  | 69 UFC          | 0 UFC           |
| 4 | $M_4$ | $10^5$ | 260 UFC | 4 UFC           | 950 aprox. UFC  |
|   |       | $10^6$ | 23 UFC  | 1 UFC           | 30 UFC          |
| 4 | $M_5$ | $10^5$ | 13 UFC  | 312 UFC         | 87 UFC          |
|   |       | $10^6$ | 1 UFC   | 120 UFC         | 4 UFC           |
| 4 | $M_6$ | $10^5$ | 0 UFC   | 450 UFC         | 77 UFC          |
|   |       | $10^6$ | 0 UFC   | 23 UFC          | 8 UFC           |
| 5 | $M_1$ | $10^5$ | 41 UFC  | 190 UFC         | 0 UFC           |

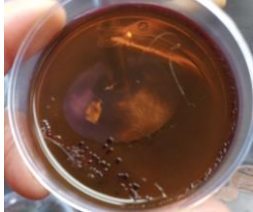
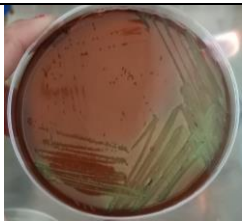
|   |       |        |         |                 |                 |
|---|-------|--------|---------|-----------------|-----------------|
|   |       | $10^6$ | 5 UFC   | 35 UFC          | 0 UFC           |
| 5 | $M_2$ | $10^5$ | 35 UFC  | 122 UFC         | 3 UFC           |
|   |       | $10^6$ | 13 UFC  | 37 UFC          | 0 UFC           |
| 5 | $M_3$ | $10^5$ | 364 UFC | 28 UFC          | 700 UFC         |
|   |       | $10^6$ | 76 UFC  | 9 UFC           | 200 UFC         |
| 5 | $M_4$ | $10^5$ | 930 UFC | 2000 aprox. UFC | 1500 aprox. UFC |
|   |       | $10^6$ | 416 UFC | 1500 aprox. UFC | 200 UFC         |
| 5 | $M_5$ | $10^5$ | 212 UFC | 260 UFC         | 90 UFC          |
|   |       | $10^6$ | 102 UFC | 75 UFC          | 17 UFC          |
| 5 | $M_6$ | $10^5$ | 45 UFC  | 30 UFC          | 27 UFC          |
|   |       | $10^6$ | 9 UFC   | 5 UFC           | 0 UFC           |
| 6 | $M_3$ | $10^5$ | 69 UFC  | 1200 aprox. UFC | 200 UFC         |
|   |       | $10^6$ | 18 UFC  | 208 UFC         | 0 UFC           |
| 6 | $M_4$ | $10^5$ | 850 UFC | 1700 aprox. UFC | 1000 aprox. UFC |
|   |       | $10^6$ | 360 UFC | 1200 aprox. UFC | 200 UFC         |
| 6 | $M_5$ | $10^5$ | 6 UFC   | 364 UFC         | 11 UFC          |
|   |       | $10^6$ | 0 UFC   | 35 UFC          | 3 UFC           |
| 6 | $M_6$ | $10^5$ | 25 UFC  | 39 UFC          | 190 UFC         |
|   |       | $10^6$ | 3 UFC   | 8 UFC           | 40 UFC          |

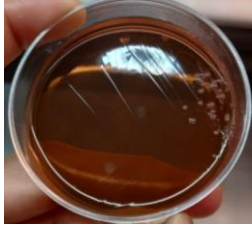
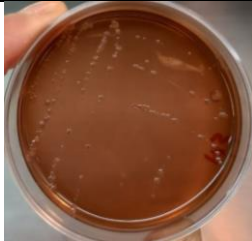
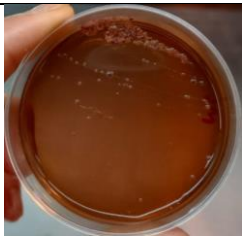
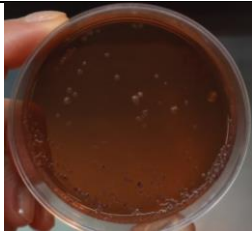
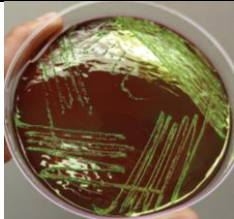
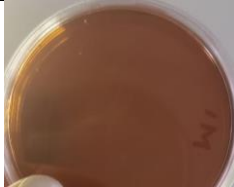
En la siguiente tabla se observan las placas de EMB sembradas a partir de cada muestra de queso fresco elaborado artesanalmente.

**Tabla 5** Placas de EMB de todas las muestras de queso fresco

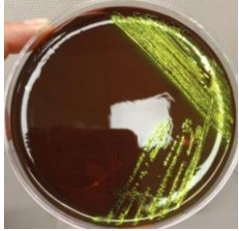
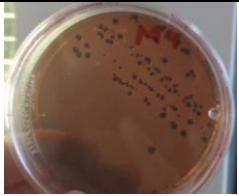
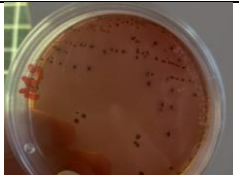
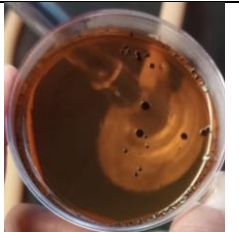
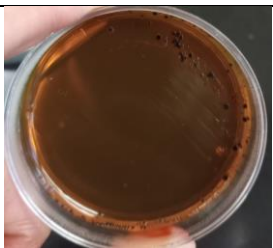
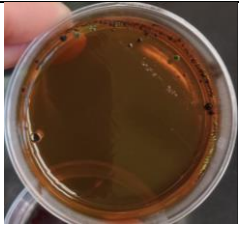
| Semana | Muestra | Placa                                                                                 |
|--------|---------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | $M_1$   |  |

|   |                |                                                                                       |  |
|---|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--|
| 1 | M <sub>2</sub> |    |  |
| 2 | M <sub>1</sub> |    |  |
| 2 | M <sub>2</sub> |    |  |
| 2 | M <sub>3</sub> |   |  |
| 2 | M <sub>4</sub> |  |  |
| 2 | M <sub>5</sub> |  |  |
| 2 | M <sub>6</sub> |  |  |

|   |                |                                                                                       |  |
|---|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--|
| 3 | M <sub>1</sub> |    |  |
| 3 | M <sub>2</sub> |    |  |
| 3 | M <sub>3</sub> |    |  |
| 3 | M <sub>4</sub> |   |  |
| 3 | M <sub>5</sub> |  |  |
| 3 | M <sub>6</sub> |  |  |
| 4 | M <sub>1</sub> |  |  |

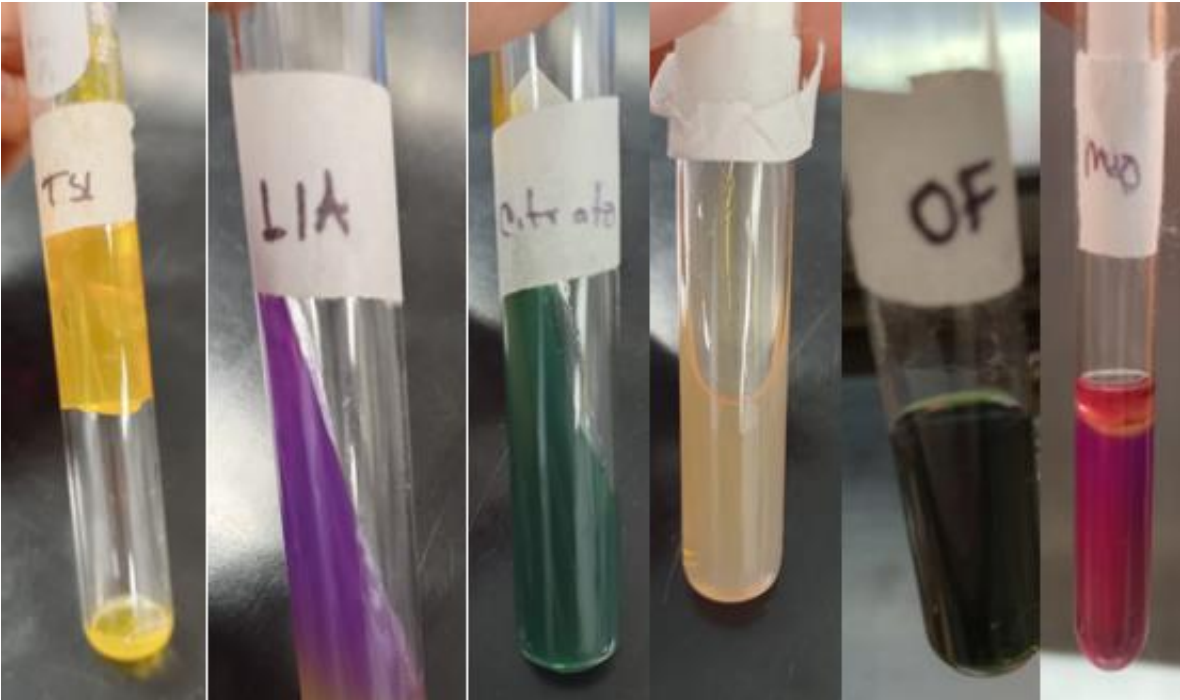
|   |                |                                                                                       |  |
|---|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--|
| 4 | M <sub>2</sub> |    |  |
| 4 | M <sub>3</sub> |    |  |
| 4 | M <sub>4</sub> |    |  |
| 4 | M <sub>5</sub> |   |  |
| 4 | M <sub>6</sub> |  |  |
| 5 | M <sub>1</sub> |  |  |
| 5 | M <sub>2</sub> |  |  |



|   |                |                                                                                       |  |
|---|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--|
| 5 | M <sub>3</sub> |    |  |
| 5 | M <sub>4</sub> |    |  |
| 5 | M <sub>5</sub> |    |  |
| 5 | M <sub>6</sub> |   |  |
| 6 | M <sub>3</sub> |  |  |
| 6 | M <sub>4</sub> |  |  |
| 6 | M <sub>5</sub> |  |  |

|   |                |                                                                                     |
|---|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 6 | M <sub>6</sub> |  |
|---|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------|

A las cepas anteriores se les realizó pruebas bioquímicas, de las cuales solo 7 cepas dieron positivas a indol y a las características de *E. coli*. (Figura 6). Esas 7 cepas fueron trasladadas al tecnológico de Monterrey para la caracterización genotípica.



**Figura 6** Pruebas bioquímicas

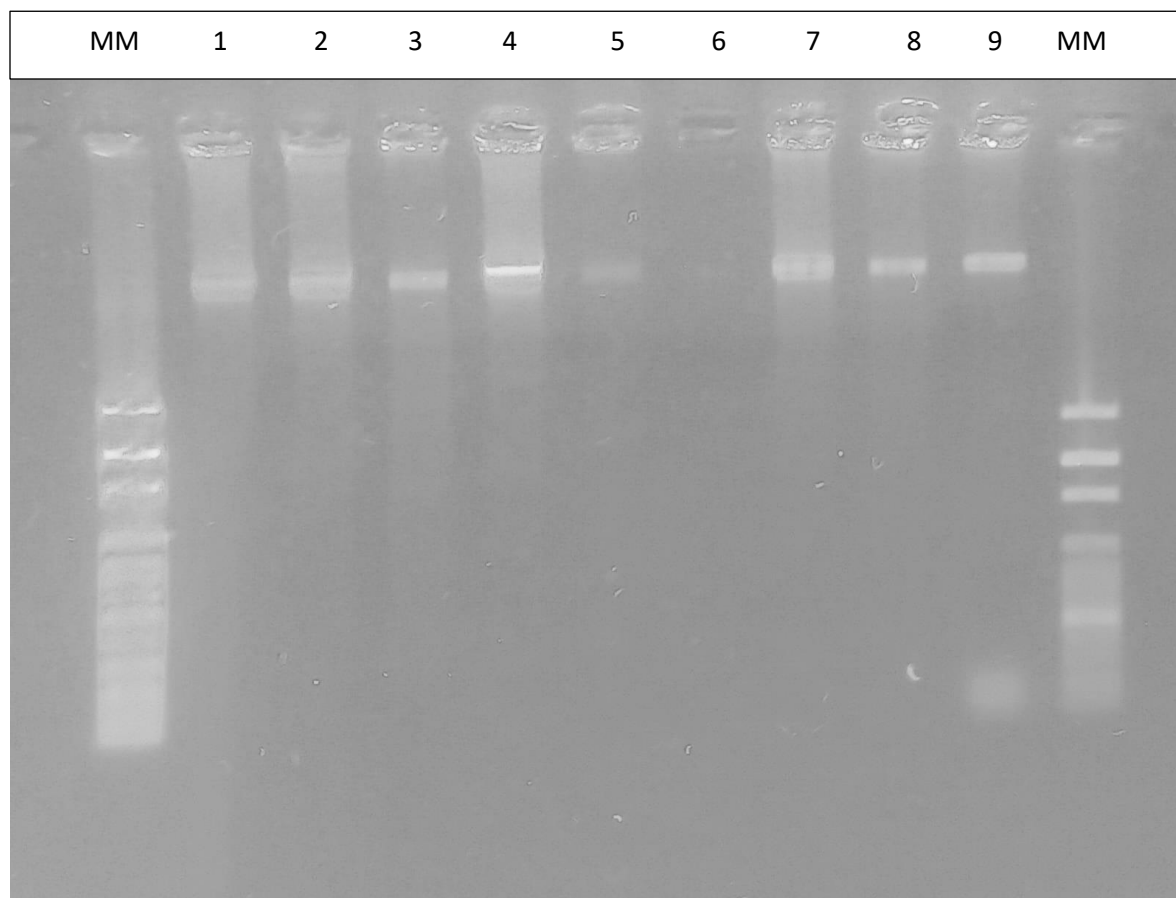
**Tabla 6** Muestras seleccionadas para la caracterización genotípica

| Semana | Muestra        |
|--------|----------------|
| 1      | Muestra 2      |
| 2      | Muestras 2 y 6 |
| 3      | Muestras 2 y 6 |
| 4      | Muestra 6      |
| 5      | Muestra 3      |

## 12.3 Caracterización genotípica

### 12.3.1 Extracción de ADN

Para llevar a cabo la identificación de las cepas, se extrajo el ADN de las 7 cepas positivas a *E. coli*, la cepa M<sub>2</sub> de la segunda semana y la M<sub>3</sub> de la quinta semana se sembraron en caldo LB por duplicado, ya que se observaba ligeramente dos tipos de colonias de cada cepa y para estar seguros de que no se tratara de la misma cepa se sembró por duplicado. La concentración de ADN obtenida según el Nanodrop fue de 13-240 ng/μL. Para corroborar la calidad del ADN se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. (Figura 7.)



**Figura 7** Electroforesis de la extracción de ADN de las cepas aisladas de *E. coli*. MM (marcador de peso molecular), 1(M2 S2), 2(M2 S2), 3(M2 S3), 4(M6 S3), 5(M6 S4), 6(M3 S5) 7(M3 S5), 8(M2 S1), 9(M6 S2).

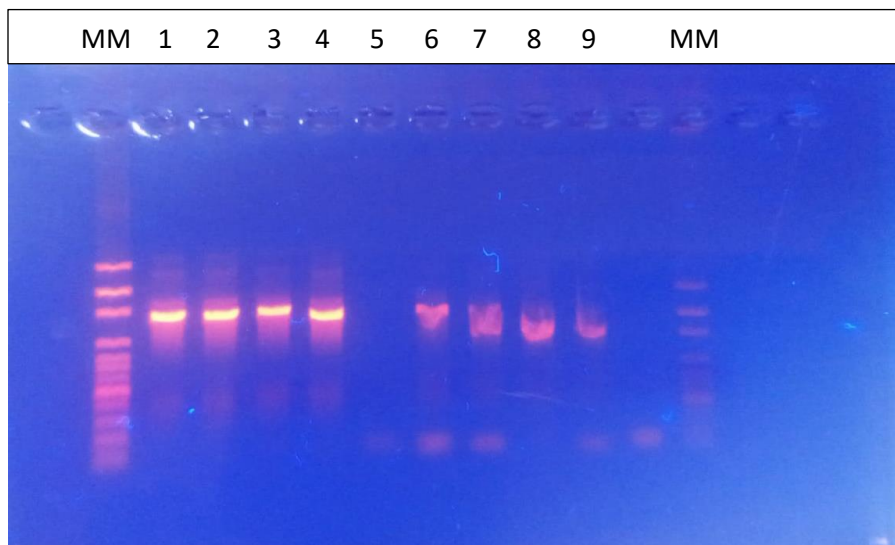
### 12.3.2 Amplificación del Gen 16s rDNA

Se realizó la amplificación del gen 16s rDNA utilizando el kit PCR Máster Mix REF K0171, los primers utilizados fueron los siguientes; Primer sentido 63F (5'CAGGCCTAACACATGCAAGTC) Primer antisentido 1389R (5'ACGGGCGCTGTGTACAAG). En cuanto a las condiciones de la reacción, se utilizó 1µL de ADN (13-240 ng), las reacciones de PCR se llevaron a cabo con las indicaciones de nuestro kit, en donde el volumen final fue de 50 µL, de los cuales 25 µL de Máster Mix, 22 µL de agua libre de nucleasas, 1 µL da 10 µM de cada uno de los primers y 1 µL de ADN, el protocolo para la PCR fue el siguiente (Figura 8).

| Paso                      | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|---------------------------|-------------|--------|--------|
| Desnaturalización inicial | 95°C        | 10 min | 1      |
| Desnaturalización         | 95°C        | 30 s   | 35     |
| Hibridación               | 55°C        | 30 s   | 35     |
| Extensión                 | 72°C        | 1 min  | 35     |
| Extensión Final           | 72°C        | 10 min | 1      |

**Figura 8** Protocolo PCR para el gen 16s rDNA.

Al término de la PCR, 3µL de los productos fueron separados en gel de agarosa al 1%, teñidos con el gel red, el marcador utilizado fue Axygen 100b. (Figura 9).



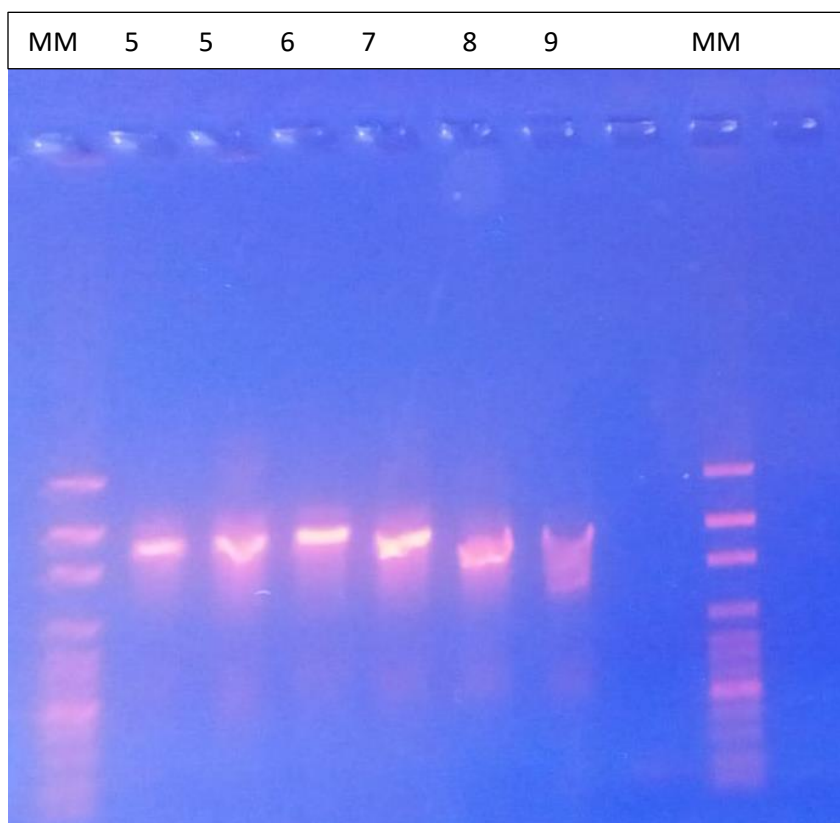
**Figura 9** Amplificación del gen 16s rDNA en gel de agarosa al 1%.

Como se puede observar en la figura 9, la cepa 5 no amplificó, por lo que se repitió la PCR para esa cepa, se modificó la temperatura de plegamiento y se aumentó el tiempo de extensión. Tabla 6.

*Tabla 7 Modificación del protocolo de PCR para la cepa 5.*

| Paso                      | Temperatura | Tiempo   | Ciclos |
|---------------------------|-------------|----------|--------|
| Desnaturalización inicial | 95 °C       | 10 min   | 1      |
| Desnaturalización         | 95 °C       | 1 min    | 30     |
| Hibridación               | 54 °C       | 30 s     | 30     |
| Extensión                 | 72 °C       | 1:45 min | 30     |
| Extensión Final           | 72 °C       | 10 min   | 1      |

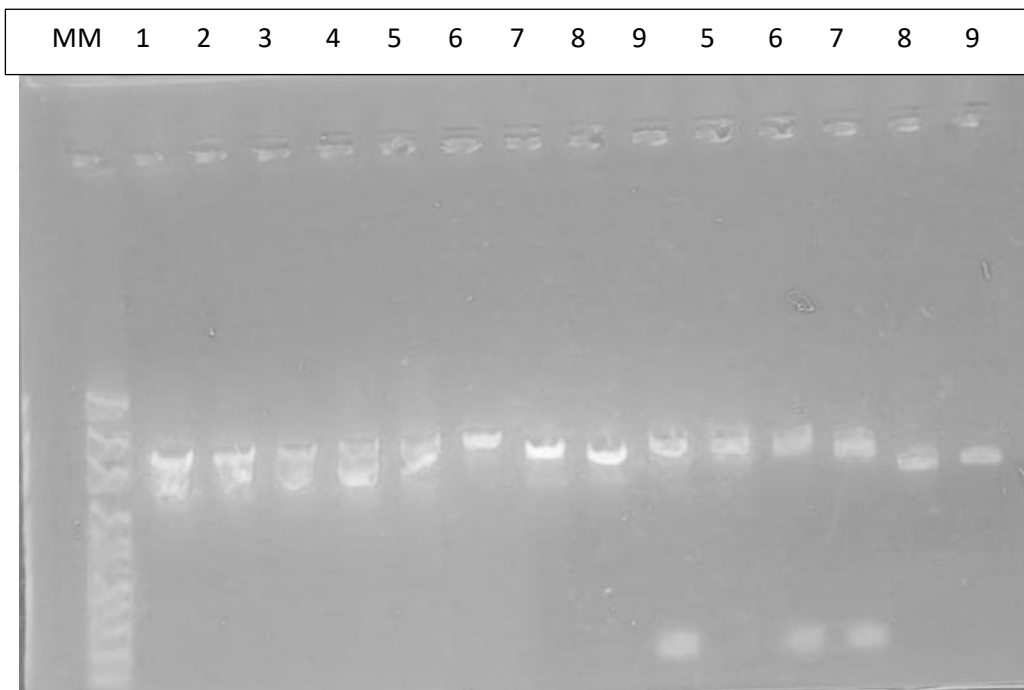
Al término de la PCR, 3µL de los productos fueron separados en gel de agarosa al 1%, teñidos con el gel red, el marcador utilizado fue Axygen 100b. (Figura 10).



**Figura 10** Amplificación del gen 16s rDNA en gel de agarosa al 1%.

### 12.3.3 Purificación de ADN

Los productos de la amplificación fueron purificados con el kit (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System) de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante, después de la purificación, se checó pureza en el Nanodrop One® y para corroborar los datos que nos brinda el Nanodrop One® se volvió a realizar una electroforesis en gel de agarosa al 1%. (Figura 11).

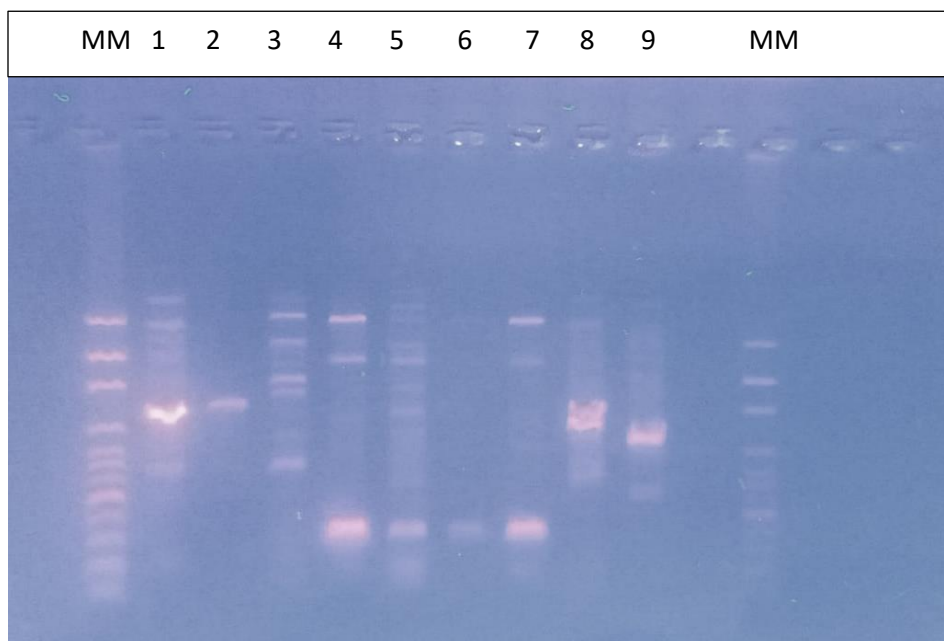


**Figura 11** Purificación del ADN en gel de agarosa al 1%.

Los productos purificados de la amplificación se enviaron a secuenciar (al IBT de la UNAM). Utilizando el primer 63F (5'CAGGCCTAACACATGCAAGTC) y las instrucciones de aceptación de muestras del IBT.

#### 12.3.4 Amplificación de REP-PCR

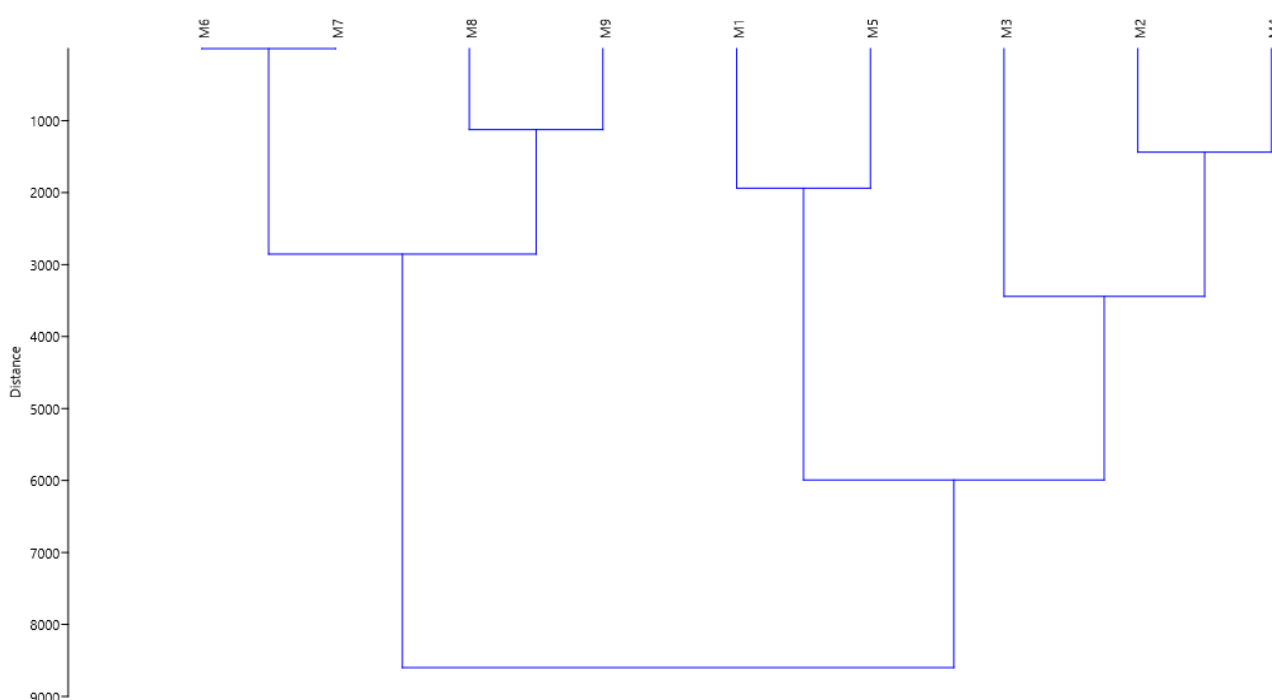
Esta PCR amplificó elementos repetitivos en los genomas bacterianos de nuestras cepas, para darnos cuenta si tenemos a la misma cepa de acuerdo con el número de multímetros repetidos. Estos multímetros repetidos de ADN pueden estar formados por unidades idénticas, unidades mixtas o secuencias repetidas degeneradas. En el genoma se encuentran cientos de copias de estas secuencias repetidas, los cuáles se caracterizan por mostrar hipervariabilidad entre cada cepa, por lo tanto, los perfiles de ADN son específicos para cada cepa. (Reynoso, Dieser y Molina, 2022). Los productos de la REP-PCR nos mostraron 8 modelos diferentes de cepas entre las 9 aisladas lo que nos indicó que una de nuestras cepas se repite, la cual es la cepa M3 que se sembró por duplicado, en la figura 12 se puede observar con la numerología 6 y 7, las bandas del pozo 7 se observan mejor que las del pozo 6 debido a la concentración de ADN.



**Figura 12** REP-PCR en gel de agarosa al 1%.



En la figura 13 podemos observar el dendrograma de nuestras cepas a partir de los datos de la REP-PCR. Podemos darnos cuenta de que las muestras se agrupan en clúster's, dependiendo de las similitudes que tienen por ejemplo las muestras 2 y 5 son similares y se encuentran en el mismo clúster, lo mismo pasa con las muestras 1 y 5 y las muestras 2 y 4, las muestras 6 y 7 son las mismas por lo que no las separa una distancia (que es lo alto del clúster), solo las une una línea recta. La muestra 3 no es muy compatible con todas las muestras, pero tiene algunas similitudes con el clúster de las muestras 2 Y 4 por lo que su distancia es menor a ellas que a las demás muestras.

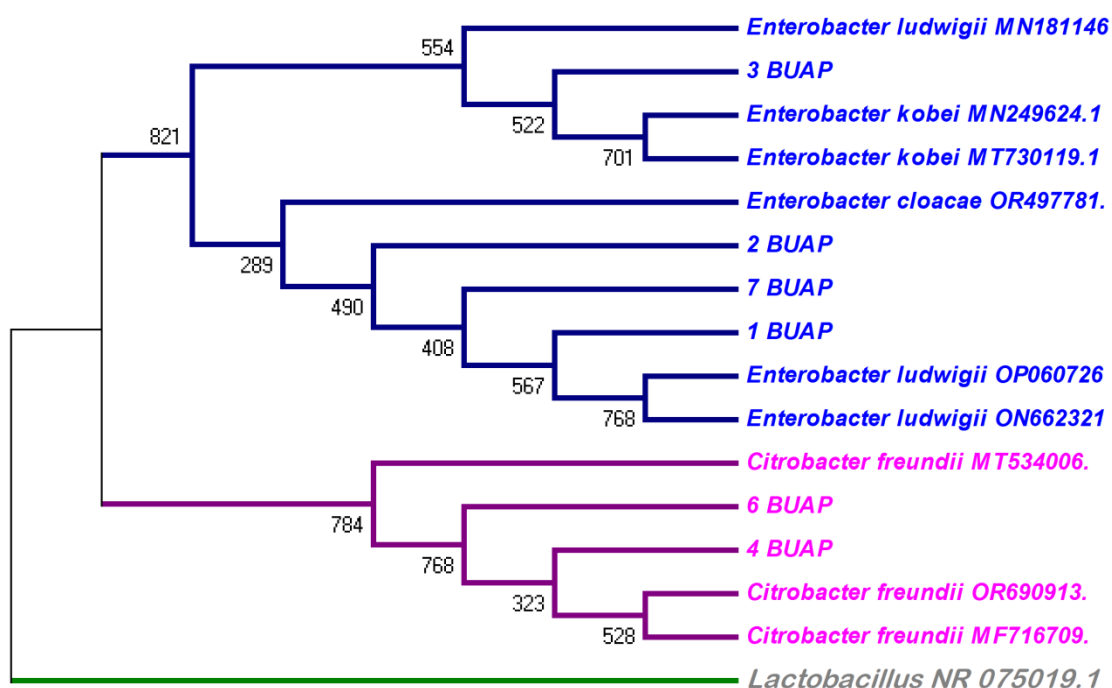


**Figura 13** Dendrograma

### 12.3.5 Secuenciación

En la figura 14. se observa el árbol filogenético del gen 16s (1500pb aproximadamente) de las cepas secuenciadas, podemos observar que las cepas aisladas corresponden a los géneros *Citrobacter* y *Enterobacter*. Del género *Citrobacter* se aisló *Citrobacter freundii* y del género *Enterobacter* se aisló *Enterobacter ludwigii*, *Enterobacter cloacae*, y *Enterobacter kobei*. Se perdieron 2 cepas en la secuenciación, la cepa 5, en la que se tuvo que modificar la temperatura de plegamientos y los tiempos de elongación para lograr amplificarla sin

embrago no se logró secuenciar. La cepa 9 tampoco se logró secuenciar lo que se atribuye a posible contaminación en el vial de esta muestra.



**Figura 14** Árbol filogenético de las cepas secuenciadas.

La identificación fenotípica comprende la comparación de características físicas, bioquímicas y de comportamiento de las bacterias. En ningún caso los métodos de identificación fenotípica pueden proporcionar una certeza absoluta, únicamente indican cual es el género y/o especie a la que la bacteria identificada tiene mayor probabilidad de pertenecer. Dado los problemas que pueden presentar los sistemas de identificación fenotípicos, los métodos moleculares han tomado gran relevancia e incluso se han tomado como procedimientos de referencia a los fenotípicos (Fernández, García, Saéz & Valdezate, 2010).

### 13 CONCLUSIONES

Se muestrearon quesos frescos de la localidad de San Martín Caltenco, que radica en el municipio de Tochtepec dentro del estado de Puebla. Los cuales, en al menos un lote, se

encuentran fuera del límite máximo de UFC permitido de hongos y levaduras, coliformes totales y bacterias mesofílicas aerobias, de acuerdo con la NOM-243-SSA1-2010

A partir de las placas de EMB se aislaron las colonias representativas, de las cuales se aisló y purificó el gen 16s mediante herramientas de biología molecular, los resultados muestran que se aislaron los géneros *Citrobacter* y *Enterobacter*.

El aislamiento de los géneros *Citrobacter* y *Enterobacter* demuestra una contaminación microbiológica en los quesos frescos elaborados artesanalmente.

Se analizó la diversidad genética mediante la REP-PCR la cual nos indicó que dos colonias eran iguales y las demás diferentes.

No se aisló *Escherichia coli* en las muestras de quesos frescos elaborados artesanalmente de la comunidad de San Martín Caltenco. Para trabajos a futuro se recomienda utilizar un medio selectivo de identificación como lo es CHROMagar STEC que es un medio selectivo destinado a la detección cualitativa directa, de las cepas de *Escherichia coli*.

## 14 BIBLIOGRAFÍA

Benítez, J., Cabrera, C., Lobo, A., Luzuriaga, J., Tejeda, F. Y Villagrán, C. (2013). Manual de laboratorio. Inocuidad microbiana de los alimentos. <file:///C:/Users/HP/Downloads/8.%20Manual%20de%20Inocuidad%20Microbiana%20de%20los%20Alimentos.pdf>

BIOTED. (2016). PCR gen 16s ARNr bacteriano. <https://www.bioted.es/protocolos/PCR-GEN-16S-ARNr-BACTERIANO.pdf>

CDC. (2023). Microbios y enfermedades transmitidas por alimentos. <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/foodborne-germs-es.html>

CDC. (2023). Organización de los CDC. <https://www.cdc.gov/spanish/acercacdc/organizacion.html>

CECT. (2022). Secuenciación del gen 16s rRNA. <https://www.uv.es/uvweb/coleccion-espanola-cultivos-tipo/es/servicios/identificacion-caracterizacion/identificacion-procariotas/secuenciacion-del-gen-16s-rna-1285978908165.html>

CIAD. (2021). Alimentos con hongos, ¿los puedo consumir? <https://www.ciad.mx/alimentos-con-hongos-los-puedo-consumir/#:~:text=El%20pan%2C%20las%20frutas%20y,de%20hongos%20en%20los%20alimentos>

Dávila, K. (2022). Salud pública, seguridad alimentaria y la industria de alimentos. TSI Life Science. <https://tecnosolucionescr.net/blog/582-salud-publica-seguridad-alimentaria-y-la-industria-de-alimentos>

Euroinnova. Qué es la salud pública según la OMS. <https://www.euroinnova.mx/blog/que-es-salud-publica-segun-la-oms#:~:text=Por%20otra%20parte%20entes%20como,que%20aunque%20este%20es%20un>

Fernández A, García C, Saéz J y Valdezate S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. <seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>

Fiallos J, Enríquez M, Montoya B y Navarra A. (2018). Caracterización molecular y serológica de *Escherichia coli* en quesos artesanales de seis departamentos de Honduras. <https://doi.org/10.5377/pc.v0i14.6636>

Fidias, G. (2012). Introducción a la metodología científica. Editorial Episteme. <https://abacoenred.com/wp-content/uploads/2019/02/El-proyecto-de-investigaci%C3%B3n-F.G.-Arias-2012-pdf-1.pdf>

Garzón, J., Martínez, S. & Molina, L. (2019). *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. Bogotá. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-24702019000200025](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702019000200025)

Gobierno de México. (2023). ¿Qué hacemos? <https://www.gob.mx/salud/que-hacemos>

Guillén, L., Millán, B. & Araque, M. (2014). Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela. Vol. 18.3 Bogotá. <http://dx.doi.org/10.1016/j.infect.2014.04.004>

ISO. (2018). ISO 22000:2018. *Sistemas de gestión de la inocuidad de los alimentos*.  
<https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:22000:ed-2:v2:es>

López, P. (2021). El de los hongos, un mundo aparte. GACETA.  
<https://www.gaceta.unam.mx/el-de-los-hongos-un-mundo-aparte/>

3M. (2023). Coliformes. [https://www.3m.com.mx/3M/es\\_MX/food-safety-la/biblioteca-de-documentos/microorganismos/coliformes/](https://www.3m.com.mx/3M/es_MX/food-safety-la/biblioteca-de-documentos/microorganismos/coliformes/)

MarketDataMéxico. (2022). Colonia San Martín Caltenco, Tochtepec, en Puebla.  
<https://www.marketdatamexico.com/es/article/Colonia-San-Martin-Caltenco-Tochtepec-Puebla>

Ocares, Y. & Castro, J. (2020). Preservación de microorganismos por congelación. Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA / MINISTERIO DE AGRICULTURA.  
<https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/6945/NR42413.pdf?sequence=12&isAllowed=y>

OMS. (2021). La OMS intensifica sus esfuerzos para mejorar la salubridad de los alimentos y proteger a la población de las enfermedades. <https://www.who.int/es/news/item/07-06-2021-who-steps-up-action-to-improve-food-safety-and-protect-people-from-disease>

OMS. (2018). *E. coli*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>

Organización Panamericana de la Salud [OPS]. (2015). Enfermedades transmitidas por alimentos. <https://www.paho.org/es/temas/enfermedades-transmitidas->

Porres, N. & Ruíz, E. (2018). *Microbiología Clínica*. COPYRIGHT.

PROMEGA. (2023). Purificación y concentración de ADN/ARN. <https://worldwide.promega.com/es-es/products/nucleic-acid-extraction/clean-up-and-concentration/#:~:text=La%20purificaci%C3%B3n%20o%20concentraci%C3%B3n%20de,fragmentos%20de%20gel%20de%20agarosa>

Sánchez, J. (2023). OPS/OMS Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). [https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=10836:2015-enfermedades-transmitidas-por-alimentos-eta&Itemid=0&lang=es#gsc.tab=0](https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10836:2015-enfermedades-transmitidas-por-alimentos-eta&Itemid=0&lang=es#gsc.tab=0)

Ramírez & Vélez. (2012). Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. Universidad de las Américas Puebla. México. [https://www.researchgate.net/profile/Carolina-Ramirez-Lopez/publication/303959697\\_Quesos\\_frescos\\_propiedades\\_metodos\\_de\\_determinacion\\_y\\_factores\\_que\\_afectan\\_su\\_calidad/links/57601b6208ae227f4a3ee94e/Quesos-frescos-propiedades-metodos-de-determinacion-y-factores-que-afectan-su-calidad.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Carolina-Ramirez-Lopez/publication/303959697_Quesos_frescos_propiedades_metodos_de_determinacion_y_factores_que_afectan_su_calidad/links/57601b6208ae227f4a3ee94e/Quesos-frescos-propiedades-metodos-de-determinacion-y-factores-que-afectan-su-calidad.pdf)

Reynoso E, Dieser S, & Molina, M. (2022). Manual de herramientas moleculares. Conceptos básicos y técnicas empleadas en el estudio de la genética microbiana. Universidad Nacional de Río Cuarto. Argentina. <file:///C:/Users/HP/Downloads/Manual-de-herramientas-moleculares-UniR%C3%ADo-editora.pdf>

Rodríguez, M. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia Coli. Salud pública. 44.5 [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-36342002000500011#cuadro3](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342002000500011#cuadro3)

Secretaría de salud. (2014). NOM-210-SSA1-2014. Métodos de prueba microbiológicos, determinación de microorganismos indicadores, determinación de microorganismos patógenos. [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015#gsc.tab=0](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015#gsc.tab=0)

Secretaria de salud. (1994). NOM-109-SSA1-1994. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/ssa1/ssa1109p.pdf>

Secretaria de salud. (1994). NOM-092-SSA1-1994. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4886029&fecha=12/12/1995#gsc.tab=0](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4886029&fecha=12/12/1995#gsc.tab=0)

Secretaria de salud. (1994). NOM-093-SSA1-1994. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4882432&fecha=04/10/1995#gsc.tab=0](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4882432&fecha=04/10/1995#gsc.tab=0)

Secretaria de salud. (1994). NOM-111-SSA1-1994. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4728921&fecha=15/08/1994&print=true](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4728921&fecha=15/08/1994&print=true)

Secretaria de salud. (1994). NOM-113-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69536.pdf>

Secretaria de salud. (2010). NOM-243-SSA1-2010. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. <https://dof.gob.mx/normasOficiales/4156/salud2a/salud2a.htm>

Secretaria de salud. (2009). NOM-251-SSA1-2009. Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios. <https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/3980/salud/salud.htm>

Tobar, S. (2015). Funciones esenciales de la salud pública. OPS <https://www.paho.org/es/temas/funciones-esenciales-salud-publica>

Tuya F, Curbelo L, y Montero, D. (2016). BIOLOGÍA GENERAL (Evolución y Genética). Curso académico 2015-2016. <file:///C:/Users/HP/Downloads/Pr%C3%A1cticas-gen%C3%A9ticas.-Extracci%C3%B3n-ADN.-Abril-2016.-Alumnos..pdf>

United Nations. OMS: Organización Mundial de la salud. <https://www.un.org/youthenvoy/es/2013/09/oms-organizacion-mundial-de-la-salud/>

Vásquez J, Tasayco R, Chuquiyauri M y Cuba P. (2015). EVALUACIÓN BACTERIOLÓGICA DE QUESOS FRESCOS ARTESANALES QUE SE COMERCIALIZAN EN MERCADOS DE LA CIUDAD DE HUÁNUCO. Vol. 9.1. Perú. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=586061449004>