



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DETECCIÓN DE SALMONELLA SPP. EN QUESO COTIJA  
ARTESANAL MADURADO POR PCR EN TIEMPO REAL**

***TESIS***

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**IRMA ANGÉLICA HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: AURORA IRMA ORTEGÓN ÁVILA

**VOCAL:** Profesor: GLORIA DÍAZ RUÍZ

**SECRETARIO:** Profesor: MARICARMEN QUIRASCO BARUCH

**1er. SUPLENTE:** Profesor: MARTHA GILES GÓMEZ

**2° SUPLENTE:** Profesor: NORMA ANGÉLICA CAMACHO DE LA ROSA

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM. EDIFICIO E, LABORATORIO 312. DEPTO. ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA. ESTA TESIS FUE FINANCIADA POR EL PROYECTO SAGARPA-2010-147499, “DETERMINACIÓN DE LA INOCUIDAD MICROBIANA DEL QUESO COTIJA ARTESANAL MADURADO QUE SE PRODUCE EN LA ZONA GEOGRÁFICA DE ORIGEN”.**

## **ASESOR DEL TEMA:**

**DRA. MARICARMEN QUIRASCO BARUCH**

## **SUPERVISOR TÉCNICO:**

**DRA. CAROLINA PEÑA MONTES**

## **SUSTENTANTE:**

**IRMA ANGÉLICA HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ**

## AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, POR HABERME PERMITIDO FORMAR PARTE DE SU COMUNIDAD. POR LLENARME DE ORGULLO Y DE INVALUABLES EXPERIENCIAS AL SER ESTUDIANTE DE LA FACULTAD DE QUÍMICA QUE ME HA FORMADO ACADÉMICA Y SOCIALMENTE. SIN DUDA, LA MÁXIMA CASA DE ESTUDIOS HA FORMADO RAÍCES SÓLIDAS EN MI FORMACIÓN PROFESIONAL.

EL CORAZÓN DE UNIVERSITARIA ME ACOMPAÑARÁ POR SIEMPRE.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

A LA DRA. MARICARMEN QUIRASCO BARUCH, POR SER LA ASESORA DE ESTE GRAN PROYECTO Y BRINDARME SU APOYO Y CONOCIMIENTOS PARA LA REALIZACIÓN DE LA PRESENTE TESIS.

A LA DRA. CAROLINA PEÑA MONTES, POR SU SUPERVISIÓN TÉCNICA, APOYO Y ENSEÑANZAS ACERCA DE LA METODOLOGÍA DEL PCR EN TIEMPO REAL.

AL PROF. QFB ALEJANDRO CAMACHO, RESPONSABLE DEL CEPARIO DE LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNAM, POR HABER PROPORCIONADO LAS CEPAS CONTROL, LA ASESORÍA Y APOYO PARA SU CULTIVO.

A LA Q.A. CINDY ESTRADA POR SU APOYO EN LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO.

AL SUBPROGRAMA 127 “FORMACIÓN BÁSICA EN INVESTIGACIÓN”, POR LA BECA RECIBIDA PARA EL DESARROLLO DE ESTA TESIS.

*Le futur a beaucoup de noms: Pour ceux qui sont faibles, il est l'inaccessible. Pour ceux qui sont craintifs il est l'inconnu. Pour ceux qui sont courageux il est l'occasion.*

*El futuro tiene muchos nombres: Para los débiles es lo inalcanzable. Para los temerosos, lo desconocido. Para los valientes es la oportunidad.*

*(V́ctor Hugo)*

*El camino sin miedo hay que recorrer,  
día a día senderos nuevos explorar,  
con la alegría de siempre y con los sueños cada vez menos finitos  
para la cima más alta alcanzar.*

*I.A.H.V*

*A mi abuelita, Emma Carrillo Sandoval q.e.p.d*  
*Porque has sido la guía de nuestras vidas,*  
*y lo seguirás siendo*  
*hasta el final de nuestros caminos.*

## Dedicatorias

*A Dios, por darme la fortaleza y compañía diaria. A la vida por permitirme elegir este camino. Una meta cumplida es el inicio de un nuevo sueño.*

*A mis padres, por ser el pilar fundamental de lo que soy, por su incondicional apoyo, esfuerzo y gran cariño. Sin duda, este objetivo logrado también es de ustedes.*

*Mamá, cada día de mi vida ha sido de aprendizaje por que los he pasado junto a ti. Tus sabios consejos, valores y cuidados han forjado mi ser. Gracias por escucharme y acompañarme en cada sueño que decido emprender.*

*Papá, gracias por enseñarme el valor de la perseverancia y superación con acciones y no sólo con palabras. Por ser parte de mi motivación diaria y por preocuparte por mi bienestar.*

*La vida es un laberinto, que sin una gran familia es difícil afrontar y llegar a las metas. Poseedora de una gran suerte de tenerlos y poder disfrutar de la compañía de las 3 personas que más engrandecen y dan brillo a mi camino. Saben que los quiero demasiado.*

*A mi hermana Ivonne, tus consejos y cariño han estado conmigo en todo momento y forman parte fundamental de este proceso. Gracias por tu madurez, astucia y habilidad para moldear una gran sonrisa en mi, eres pieza clave del gran rompecabezas de mi felicidad.*

*A Nieves Velázquez Trejo, a mi tía Emma y a mi tía Hilda, gracias por acompañarme desde mi infancia, sin duda han formado parte importante en mi desarrollo. Y a las familias Jiménez Velázquez por su incondicional apoyo.*

*A Geovani Laurabaquio, gracias por compartir gratos y felices momentos.*

*A mis compañeros y amigos del laboratorio 312: Berenice, Belén y Erick. El trabajo nos unía, pero ahora el lazo es más fuerte gracias a su amistad, a la compañía de grandes pláticas y momentos que hicieron más ligero el pasaje de la tesis.*

*A las grandes personas que he tenido la fortuna de encontrar durante esta importante etapa universitaria: Alberto García, Yesenia Hernández, Pedro Lira.*

*A mis colegas y amigos QA's con los que trabajé en equipo durante los laboratorios, por compartir momentos de convivencia durante mi formación profesional.*

## ÍNDICE

<b>1.RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2.INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>3.MARCO TEÓRICO</b>	
3.1. Queso Cotija.....	4
3.1.1. Queso Cotija región de origen.....	4
3.1.2. Características del queso Cotija .....	5
3.1.3. Proceso de elaboración .....	6
<b>3.2. BACTERIAS PATÓGENAS EN EL QUESO .....</b>	<b>10</b>
<b>3.3. <i>Salmonella</i> spp. ....</b>	<b>13</b>
<b>3.4. PCR.....</b>	<b>16</b>
<b>3.5. PCR TIEMPO REAL (qPCR) .....</b>	<b>18</b>
3.5.1. Química taqman.....	19
3.5.2. Curva de amplificación de PCR tiempo real .....	22
3.5.3. PCR en tiempo real en la detección de microorganismos patógenos en alimentos.....	25
<b>4. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>27</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>28</b>
5.1. Objetivos particulares .....	28
<b>6. METODOLOGÍA .....</b>	<b>29</b>
6.1. Diagrama de Bloques.....	29
6.2. Procesamiento de muestras de Queso Cotija .....	30
6.3. Determinación de $a_w$ .....	30
6.4. Recuperación del paquete celular a partir del queso .....	31
6.5. Cepas de <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis y <i>S. Typhimurium</i> utilizadas.....	31
6.5.1. Reactivación y conservación de las cepas .....	32
6.5.2. Preparación del medio crecido con las cepas puras .....	32



6.6. Evaluación del kit de extracción y purificación de ADN .....	32
6.7. Extracción de ADN .....	33
6.8. Análisis del ADN extraído .....	33
6.9. Inoculación del queso con inóculo de concentración conocida y recuperación del paquete celular.....	34
6.10. PCR Tiempo real.....	35
6.10.1. Programación de PCR tiempo real.....	35
6.10.2. Condiciones de reacción .....	35
6.11. PCR Punto final .....	36
6.11.1. Programación de PCR tiempo real.....	37
6.11.2. Análisis de los amplicones .....	38
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>39</b>
7.1. Búsqueda de secuencias de cebadores y sondas en la bibliografía .....	39
7.1.1. <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis.....	39
7.1.2. <i>Salmonella</i> spp. ....	40
7.1.3. <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium.....	42
7.3. Especificidad de los juegos de sondas y cebadores .....	43
7.3.1. Especificidad de los cebadores y sonda para gen específico para <i>Salmonella</i> spp. ....	43
7.3.2 Especificidad de los cebadores y sonda para gen específico para <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis y <i>S. Typhimurium</i> .....	46
7.4. Especificidad de los cebadores y sonda con cepas puras de diferentes géneros al de estudio .....	50
7.5. Detección de un inóculo de concentración conocida.....	52
7.6. Análisis de muestras de queso Cotija .....	59
7.7. PCR Punto final .....	66
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>69</b>

**Anexo ..... 70**

    Anexo 1 ..... 70

    Anexo 2 ..... 71

    Anexo 3 ..... 72

    Anexo 4 ..... 73

    Anexo 5 ..... 73

    Anexo 6 ..... 74

    Anexo 7 ..... 76

    Anexo 8 ..... 79

    Anexo 9 ..... 81

**BIBLIOGRAFÍA ..... 83**

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ARPQC	Asociación de Productores de Queso Cotija
ATR	Respuesta de tolerancia al ácido
$a_w$	Actividad del agua
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C	Concentración
$C_T$	Ciclo umbral
CV	Coefficiente de variación
EtBr	Bromuro de etidio
IMPI	Instituto de la Propiedad Industrial
MC	Marca Colectiva
NA	No hubo amplificación
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Q.C	Queso Cotija
qPCR	PCR en tiempo real
RT-PCR	PCR transcriptasa reversa
Valor E	Expectancia



## 1. RESUMEN

El objetivo general del proyecto de tesis es la detección de *Salmonella enterica* Enteritidis y *enterica* Typhimurium en muestras de queso Cotija artesanal madurado. En primer lugar se realizó una búsqueda bibliográfica con la finalidad de elegir los juegos de cebadores y sondas para la identificación de estas cepas en la matriz alimenticia por medio de la técnica de PCR tiempo real.

La estrategia de detección del patógeno consistió en utilizar un gen común al género *Salmonella*, como ADN blanco de amplificación en una primera etapa de tamizaje. Posteriormente se detectaron genes específicos para *S. enterica* Typhimurium y Enteritidis en reacción dúplex, de tal forma que se pudiera confirmar la presencia del género y se identificara la especie presente en la muestra.

Con todos los juegos de cebadores y sonda se realizaron pruebas de especificidad con muestras de ADN de cepas tipo y de queso Cotija: (control de matriz, control de matriz con bacteria inactiva) y con ADN de bacterias de diferentes géneros como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis*, *Listeria monocytogenes* y *E. coli* DH 5 $\alpha$ . Se encontró alta especificidad de los cebadores y sonda elegidos. El control de matriz y bacterias de género diferente a las de estudio arrojaron resultados negativos.

Posteriormente se realizaron reacciones de PCR con los tres genes blanco con muestras de queso Cotija inoculadas con una concentración de inóculo conocido y etapa de enriquecimiento. Estos mostraron valores de Ct cercanos a los obtenidos por la cepa pura, encontrando así que es posible



su detección a pesar de encontrarse en bajas concentraciones, debido al efecto del enriquecimiento no selectivo realizado en agua peptonada tamponada.

Se analizaron 95 muestras de queso Cotija procedentes de la región de origen Sierra de Jalmich. Las muestras fueron analizadas visualmente al momento de la recepción y al momento del procesamiento en zona aséptica y material estéril, con la finalidad de identificar la presencia de materia extraña en la matriz alimenticia.

Una de las etapas más importante en el análisis es el enriquecimiento, posteriormente se realizó la extracción de ADN mediante un sistema comercial.

El 9.5 % de las muestras analizadas resultaron probables positivos para *Salmonella* spp., negativos para la serovariedad Enteritidis y probable positivo para la serovariedad Typhimurium.

Los valores de Ct obtenidos en las 10 muestras indican la presencia de ADN de *Salmonella enterica*, en baja concentración; que podría explicarse por la presencia de *Salmonella* spp. no viable, pues no fue capaz de aumentar en número durante la etapa de enriquecimiento.



## 2. INTRODUCCIÓN

Este proyecto forma parte de otro, con mayores alcances, denominado "Determinación de la inocuidad microbiana del queso Cotija artesanal madurado que se produce en la zona geográfica de origen" con clave SAGARPA-2010-147449. Los objetivos de éste contemplan la detección de varios microorganismos patógenos, entre ellos *Salmonella enterica* serovar Enteritidis y serovar Typhimurium, en producto con al menos tres meses de maduración. El muestreo del producto será representativo y contempla a los ranchos de la zona geográfica de origen, esto es, la sierra limítrofe entre Jalisco y Michoacán. En vista del número de muestras a analizar (95 muestras) y la especificidad que requiere el análisis se ha decidido utilizar la metodología de PCR en tiempo real, utilizando la química de Taqman. El proyecto global es relevante, pues tiene como finalidad hacer un diagnóstico de la calidad sanitaria de un producto que busca la denominación de origen, que si bien se elabora bajo normas de higiene y de calidad de materia prima, no contempla algún tratamiento térmico en su proceso.



### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1. QUESO COTIJA**

##### **3.1.1 QUESO COTIJA REGIÓN DE ORIGEN**

El queso Cotija es un producto lácteo artesanal elaborado en México desde hace más de 400 años, específicamente en comunidades de los estados de Jalisco, Michoacán (Sierra de Jalmich). La delimitación territorial abarca aproximadamente 2400 km<sup>2</sup>, de los 19° 15' a los 20° 40' latitud norte y de los 102° 30' a los 103° 05' de longitud oeste (Estrada, 2007).

La región se ubica en las inmediaciones serranas de los estados de Jalisco y Michoacán (Figura 1), en jurisdicción de los municipios de Santa María del Oro, Jalisco, sur de Tocumbo y de Cotija, Michoacán principalmente. Además en municipios vecinos como: norte de Jilotlán de los Dolores, oriente de Tamazula, sur de Valle de Juárez y de Quitupan, Jalisco; suroeste de los Reyes, Peribán y Tancítaro, y norte de Buena Vista Tomatlán, Michoacán (Alvárez, et al., 2005).

Los factores climatológicos de las zonas de elaboración son temperatura ambiental de 20°C - 25°C, precipitación anual (900-1200 mm), con una humedad relativa > 80% (Alvárez, et al., 2005).

Con la finalidad de estimular la tradición del producto, en 1998 los productores de la región crearon la *Asociación de Productores de Queso Cotija* (ARPQC), compuesta por 92 productores que producen aproximadamente 200 toneladas de queso. La asociación obtuvo el 7 de marzo del 2005 la Marca Colectiva (MC) del queso Cotija Región de Origen por parte del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI).



Éste es el primer paso para reconocer la autenticidad del producto por sus características, así como especificidades geográficas, condiciones de producción y culturales incorporadas; dándole así una ventaja competitiva en el mercado además de una protección oficial para los productores (Alvárez, et al., 2005).



Figura 1. Sierra de Jalmich (Alvárez, et al., 2005)

### 3.1.2 CARACTERÍSTICAS DEL QUESO COTIJA

El Queso Cotija es un producto elaborado a partir de leche cruda de vaca, entera, de ganado criollo.

Tiene como características principales ser un queso madurado (mínimo 3 meses de maduración dentro del área geográfica), de pasta dura, prensada y no cocida. Posee un olor penetrante, color blanco-amarillento y gusto ácido y fuerte (Hernández, 2007). Obtiene sus peculiares





características debido a la materia prima, al proceso de elaboración y a los factores ambientales y climatológicos de las zonas de elaboración. En la Tabla 1 se muestran las características físico-químicas del producto.

Tabla 1. Características físico-químicas del queso Cotija.  
(Hernández, 2007 y 2010)

<b>Característica</b>	<b>Porcentaje (Base Húmeda)</b>
Humedad	23.5-32
Proteína	26.3-32
Grasa	23.5-32
Cenizas	5.7-7.2
NaCl	2.5-3.8
Carbohidratos	0.08-0.15
pH	4.8-5.2
Acidez (ácido láctico)	0.2-0.51%
$a_w$	0.84-0.90

Debido a sus características sensoriales particulares, en noviembre de 2006, el Queso Cotija fue reconocido entre 500 participantes como el mejor Queso Extranjero del Año en el campeonato mundial en Cremona, Italia, por ser un producto único, destacándose sobre algunos quesos provenientes de países con una amplia tradición en la producción de este producto lácteo como Francia, Austria, España e Italia (Hernández, 2007).

### **3.1.3 PROCESO DE ELABORACIÓN**

El período de elaboración de este producto se delimita a la época de lluvia debido a que el ganado se alimenta mediante el sistema de libre pastoreo, la abundancia de pastizales en esta época conlleva a un aumento de la producción de leche. El promedio de producción anual, estacional (de julio a octubre) es de 1 tonelada de queso por familia (con variaciones de 0.5 a 2.0 toneladas) (Hernández, 2007). Se requieren aproximadamente 90L de leche para obtener una pieza cilíndrica de 20 kg.



En la Figura 2 se muestra el proceso general de elaboración del Queso Cotija. Durante el proceso deben emplearse todos los cuidados higiénicos-sanitarios.

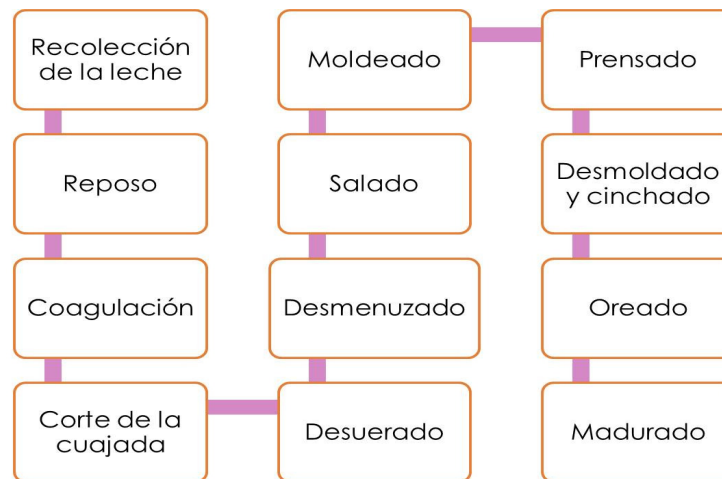


Figura 2. Diagrama del proceso general de elaboración del Queso Cotija

- a) **ORDEÑA:** La leche empleada es recién ordeñada del día, de manera manual a partir de ganado criollo o híbrido sano. La leche recién ordeñada presentará un pH = 7 y una temperatura de 37°-38°C.
- b) **REPOSO:** La leche se mezcla y se deja reposar durante 3 a 4 h, a temperatura ambiente (Temperatura aprox. de la leche 34°C).
- c) **CUAJADO:** Se añade un agente coagulante de origen animal a la leche, sin aplicar algún tratamiento térmico. Éste es incorporado y mezclado rápidamente, en una cantidad aproximada de 10 mL cuajo/100 L leche, su dosificación no está estandarizada. Se deja que actúe por un período de 30 a 60 minutos a temperatura ambiente para que se lleve a cabo la coagulación enzimática.
- d) **CORTADO:** El corte de la cuajada no es un proceso estandarizado, debido a que cada productor decide el momento adecuado para realizarlo mediante la verificación de la consistencia de la cuajada,



- aparición del coágulo y las condiciones ambientales. Una vez alcanzado el punto deseado, se corta en cuadros o cubos homogéneos con ayuda de un cuchillo o cuchara con la finalidad de dar lugar al desuerado.
- e) DESUERADO: Se emplean acciones mecánicas para permitir la salida de este componente acuoso, el suero se separa de la cuajada por medio de drenado o escurrido sobre la mesa (de madera o acero inoxidable), con un colador o cedazo interpuesto (lienzo limpio) y ejerciendo una presión descendente con una cuchara o un recipiente limpio.
  - f) DESMENUZADO O AMASADO: Se realiza manualmente y consiste en romper la cuajada obtenida, para favorecer un poco más el desuerado por exudación.
  - g) SALADO: Se utiliza sal de grano proveniente del estado de Colima, ésta se incorpora directa y uniformemente en toda la cuajada y se amasa manualmente para homogenizarla. La dosis de sal no se encuentra estandarizada, por lo que depende de cada productor. La cantidad aproximada es de 138-140 g por cada 20 L de leche.
  - h) MOLDEADO: Se coloca la cuajada, envuelta en 2 piezas de yute o ixtle (fibra de maguey), dentro de un molde cilíndrico de madera o acero inoxidable para darle forma al producto (40x20 cm, con un peso entre 20-30 kg/pieza).
  - i) PRENSADO: Esta etapa del proceso dura entre 18 y 24 horas. Se realiza generalmente empleando piedras, de entre 50 y 90 kg (en algunas ocasiones se emplea prensas rústicas de tomillo). Durante esta operación el queso se voltea continuamente.
  - j) OREADO: La pasta ya prensada se desmolda y se eliminan los rebordes. Se fajan con cinchos de fibra de vidrio, lámina o tela para mantener su forma y se mantiene así por varios días (8 -15 días)



hasta que adquiriera la firmeza necesaria para que cada pieza pueda ser manipulada, a temperatura ambiente (20-30°C). Diariamente, las piezas se decinchan o desfajan, se limpia la superficie con un trapo limpio, se voltean y se vuelven a fajar. En esta etapa, la cuajada presenta volumen y forma determinada.

- k) **MADURACIÓN:** La pieza de queso se desfaja cuando se obtiene una textura adecuada. Se continúa con el proceso de volteado y se limpia la superficie del queso con un lienzo limpio y suave cada tercer día, esta operación se realiza como mínimo durante 3 meses.

La costra formada (no consumible) toma un color amarillo parduzco mientras que el interior se torna blanco-amarillento. Al queso Cotija madurado de 3 a 6 meses se le denomina añejo y al que tiene más de 6 meses de maduración se le llama rendido.

- l) **VENTA Y DISTRIBUCIÓN:** El producto sale a la venta cuando ha cumplido como mínimo 3 meses de maduración. Actualmente, la ARPQC organiza una feria regional en el mes de diciembre, en la ciudad de Cotija, con el fin de dar a conocer su producto y poder venderlo, ya que aún se cuenta con pocos canales de distribución (Alvárez, et al., 2005).



### 3.2. BACTERIAS PATÓGENAS EN EL QUESO

La leche es un medio altamente nutritivo, de pH casi neutro, por lo que gran cantidad de bacterias pueden crecer. Se han presentado numerosos brotes por leche contaminada con microorganismos patógenos.

Los microorganismos comúnmente relacionados con brotes procedentes de queso son, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*.

Los brotes reportados en el 2012 fueron: 22 casos en Estados Unidos por *Listeria* spp. presente en queso Ricotta (Center for Disease Control, 2012), 48 casos en Europa por *Salmonella* spp. (ECDC, 2012).

Las principales causas de contaminación en quesos son, pobre actividad del microorganismo iniciador (en caso de utilizarse para la elaboración), falta de higiene en la planta de elaboración, fuerte contaminación ambiental, y la falta de pasteurización de la leche (Fox, et al, 2000).

Sin duda, el factor más importante en el control del crecimiento de patógenos en queso es la pasteurización de la leche, una de las razones para el uso de leche cruda es que ésta produce quesos con mayor sabor y olor.

La presencia y sobrevivencia de microorganismos patógenos en el queso está influenciada por diversos factores como:

- El género y especie
- Cantidad inicial de microorganismo
- Su condición fisiológica



- Producción de ácido por los cultivos iniciadores o microorganismos presentes y en consecuencia el descenso del pH en la pasta
- Tolerancia del microorganismo al ácido y a la concentración de sal presente
- Contaminación post-manufactura
- Cambios bioquímicos durante la maduración del queso
- Temperatura de almacenamiento y etapa maduración del queso
- Composición del queso

Los cambios sucedidos durante la maduración de los quesos dependen de la variedad, cada queso es un ecosistema microbiano único. Por ejemplo, en el queso Cheddar el descenso de microorganismos (*S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, y *Salmonella* spp.) durante el tiempo de maduración a 12°C se muestra en la Figura 3. Se observa una disminución más rápida en la cuenta de organismos Gram-negativos en comparación de los Gram-positivos (Fox, et al, 2000).

En la Figura 4 se muestra el efecto del pH en la sobrevivencia de *Salmonella* en queso Cheddar durante la maduración, en ésta se puede observar que al mayor pH (5.70) no se presentó disminución en la cuenta de la bacteria. A diferencia del resto de los valores de pH sí hubo disminución de la cantidad de UFC de *Salmonella*, incluso se logró su eliminación a pH 5.03 después de 80 días de maduración. Esto muestra que el pH del medio es crítico para la disminución o eliminación de la bacteria durante la maduración (Fox, et al, 2000).

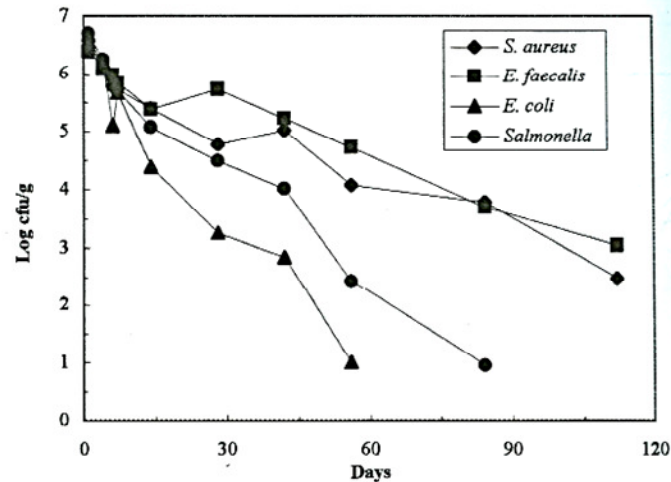


Figura 3. Descenso en la cantidad de *S.aureus*, *E. faecalis*, *E.coli* y *Salmonella* spp en queso Cheddar durante el proceso de maduración a 12°C (Fox, et al, 2000).

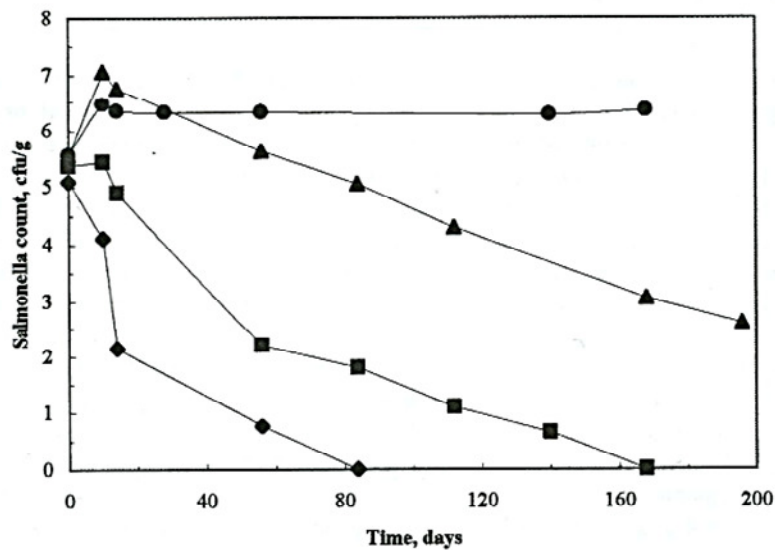


Figura 4. Efecto del pH en la sobrevivencia de *Salmonella* spp. en queso Cheddar durante la maduración (Fox, et al, 2000).

Dentro de la microbiota del queso se encuentra *Enterococcus* spp., éste es importante en el desarrollo del sabor y olor de los quesos, forman parte de una porción significativa de la microbiota de la leche cruda y sirven como iniciadores, su habilidad para metabolizar lactosa y su tolerancia a la



sal y al calor le brindan características importantes para ser microorganismos iniciadores (Giraffa, 2003).

### 3.3. *Salmonella* spp.

El género *Salmonella* lo constituyen bacilos cortos Gram negativos, no esporulados, pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, son aerobios o anaerobios facultativos, móviles y con flagelos peritricos (excepto *S. Pullorum* y *S. Gallinarum*) (James, 2005).

Son quimiorganótrofos, poseen la habilidad de metabolizar nutrientes por vía respiratoria y vía fermentativa. Cataboliza D- glucosa y otros carbohidratos produciendo ácido y gas, pero no fermentan lactosa ni sacarosa.

Este género posee una capacidad de adaptación a condiciones ambientales extremas. En la Tabla 2 se muestran las condiciones generales de crecimiento y rango de sobrevivencia de *Salmonella* spp.

Tabla 2. Condiciones de crecimiento de *Salmonella* spp (Doyle, 2001).

	Óptimo	Rango de sobrevivencia
<b>Temperatura</b>	37°C	5°C- 47°C
<b>pH</b>	6.5-7.5	4.5- 9.5
<b>a<sub>w</sub></b>	0.99	Límite 0.93

Se inhibe con un % NaCl de 3% a 4%.

Éste sobrevive a periodos largos de congelación, resiste al calor y tiene una respuesta de tolerancia al ácido (ATR), esta última brinda al microorganismo mayor resistencia a estrés osmótico y temperatura. Debido a esta adaptabilidad se ha cuestionado la presencia de *Salmonella* spp. en alimentos fermentados, como en salchichas curadas y, especialmente, en productos que utilizan como materia prima leche cruda.





Al ser la acidez y pH factores dependientes del cultivo iniciador, es posible que se cree un ambiente favorable para la activación de la ATR, teniendo así como resultado contaminación en el producto alimenticio listo para su consumo. Se ha demostrado la adaptabilidad y sobrevivencia al incremento de pH de *Salmonella* spp. en leche fermentada, queso cheddar, Suizo y mozzarella durante su almacenamiento (5°C) (Doyle, 2001).

El principal reservorio de *Salmonella* spp. es el tracto intestinal de animales y humanos. Esta bacteria es excretada en las heces y puede permanecer viable en el material fecal por varios años fuera del hospedero, además puede sobrevivir incluso si el material fecal ya se encuentra seco, este microorganismo es diseminado por insectos y animales, por lo tanto *Salmonella* spp. se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza.

De acuerdo a la NOM-114-SSA1-1994, que describe sobre el método para la determinación de *Salmonella* en alimentos, se debe determinar la presencia o ausencia de estos microorganismos.

La principal causa de infección con *Salmonella* spp. es la ingesta de comida o agua contaminada, es importante el uso de las Buenas Prácticas de Manufactura durante la elaboración de los productos alimenticios para evitar la diseminación de la bacteria.

Otra causa de infección es debida a contacto persona-persona infectada. Debido a la existencia de portadores asintomáticos, y el hecho de que después de haberse recuperado de la infección el portador continúa siendo portador y excretando la bacteria durante semanas o meses. La falta de prácticas sanitarias por parte de los portadores ayuda a la diseminación de la enfermedad (Cliver, 1990).



La salmonelosis es uno de los mayores problemas causados por bacterias entéricas en alimentos en la mayoría de los países, al menos 1300 millones de casos de salmonelosis en humanos son reportados anualmente alrededor del mundo, y aproximadamente 3 millones murieron por la enfermedad (Hwa, et al, 2009).

*Salmonella enterica* es el principal patógeno causante de salmonelosis en humanos y animales en el mundo, clasificada en más de 2000 serotipos; los que tienen mayor presencia a nivel mundial son *Salmonella enterica* Enteritidis y Typhimurium. Se estima que aproximadamente el 75% de la salmonelosis en humanos es ocasionada por el consumo de huevo, carne de puerco, res y de aves contaminadas (Hwa, et al, 2009).

La serovariedad Enteritidis es la líder mundial, provocando alrededor del 60% de salmonelosis humana en Europa (Malorny, et al, 2007).

En los países industrializados se han establecido sistemas de vigilancia, que les permite conocer con relativa certeza la incidencia de las infecciones por *Salmonella* spp. En los Estados Unidos de América y el Reino Unido, se calcula que al año ocurren 1,412,498 y 73,193 infecciones por *Salmonella* no Typhi respectivamente, en México no se cuenta con estadísticas nacionales de infecciones por *S. enterica* no Typhi, debido a que con frecuencia, el médico hace un diagnóstico basándose en el cuadro clínico del paciente, pero sin contar con los estudios microbiológicos necesarios para establecer un diagnóstico certero (Zaidi, et al, 2006).

La gastroenteritis por alimentos es causada por varios serotipos de *Salmonella* spp., siendo los más comunes *S. enterica* Typhimurium y *S.*



*enterica* Enteritidis (Moussa *et all*, 2010). La enfermedad se caracteriza por diarrea, dolor abdominal, dolor de cabeza, vómito y náuseas. El período de incubación es de 5-72 h, y la duración aproximada de la enfermedad es de 1-4 días (Doyle, 200; Cliver 1990).

*Salmonella enterica* serotipo Typhi y *Salmonella enterica* serotipo *Paratyphi* causan enfermedades severas en humanos, como el síndrome séptico y las fiebres tifoidea y paratifoidea.

### 3.4. PCR

La reacción en cadena de la polimerasa, descrita por Kary Mullis en 1983, aplica la bioquímica básica de la replicación del DNA con el objetivo de amplificar una porción particular de DNA (Koneman, 2008).

La reacción consiste en tres fases:

1. Desnaturalización del DNA
2. Hibridación del cebador
3. Extensión del cebador

La desnaturalización de la molécula de DNA molde o separación de las dos hebras individuales que componen la molécula de DNA bicatenaria madre es la primera etapa de la PCR. Esto se acompaña por la elevación de la temperatura de la mezcla de reacción hasta aproximadamente 95°C.

La hibridación del cebador, comienza cuando la mezcla de reacción se enfría y los cebadores oligonucleótidos, que se encuentran a los lados de la zona por amplificar, se hibridan con las hebras simples de la molécula de DNA molde. Los oligonucleótidos cebadores son fragmentos cortos de DNA, necesarios para iniciar la reacción de síntesis. Un cebador tiene el mismo sentido que la hebra superior de DNA y se denomina cebador



directo, mientras que el otro es del mismo sentido que la hebra opuesta de DNA y se llama cebador inverso (Koneman, 2008).

La síntesis de una hebra nueva de DNA complementaria a la hebra madre, se lleva a cabo por la acción de la DNA polimerasa después de que se completa la hibridación de cebador, la polimerasa sintetiza la hebra complementaria nueva a una tasa aproximada de 25 pb/s. Una vez transcurrido el tiempo necesario para la extensión completa del amplicón, la mezcla se vuelve a ciclar a 95°C.

Así, la porción diana de DNA se amplifica exponencialmente para formar millones de amplicones.

La presencia de los productos de la amplificación por PCR suele determinarse por el examen de los productos obtenidos por electroforesis en gel y teñidos con bromuro de etidio (BrEt) (Koneman, 2008). En la Figura 5 se muestra la representación de la reacción de PCR.

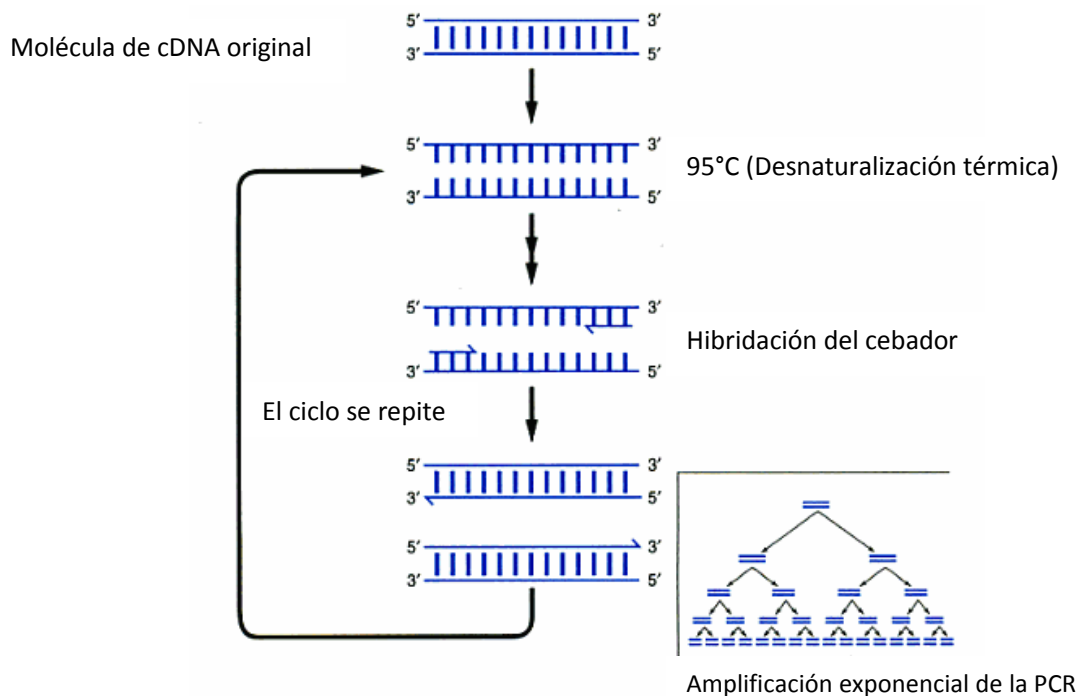


Figura 5. Representación de la reacción de PCR (Koneman, 2008)



### 3.5. PCR EN TIEMPO REAL (qPCR)

Permite detectar durante la síntesis la aparición de los amplicones, mediante la recolección continua de señales de fluorescencia emitidas durante la reacción de PCR a través de un rango de ciclos (Dorak, 2006). En la PCR tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea, sin necesidad de realizar ninguna acción adicional, como elaboración y visualización en gel de electroforesis. Además, mediante la detección por fluorescencia se puede medir, durante la amplificación, la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida es proporcional a la cantidad de ADN formado, por lo que es posible cuantificar el gen de interés (Applied Biosystems, 2005).

qPCR ofrece varias ventajas respecto del PCR tradicional, entre ellas (Logan, et al, 2009):

- Amplificación y detección en un sistema integrado, no es necesario realizar metodologías después de realizar la reacción de PCR como visualización del amplicón en geles de agarosa y tinción del gel con EtBr o SybrGreen
- El uso de sondas permite el constante monitoreo de la reacción
- Rapidez: menor tiempo requerido por corrida de reacción de PCR (aproximadamente 1:30 hora por 40 ciclos)
- Menor riesgo de contaminación, debido al sellado de las reacciones
- Mayor sensibilidad
- Detección de un rango de  $10^{-10}$  copias
- Mayor reproducibilidad, con un  $CV < 2\%$
- Puede realizarse un análisis cualitativo o cuantitativo



Dentro de las componentes importantes de los termocicladores para PCR tiempo real destacan los siguientes (Dorak, 2006) :

1. La fuente de luz, la cual determina el rango de fluorocromos reporteros que es capaz de ser utilizados por el equipo. Las fuentes disponibles en equipos de PCR tiempo real son: láser de ión argón, LED láser (Diodo Emisor de Luz), lámparas de tungsteno-halógeno y lámparas de xenón.
2. El sistema de detección, este determina el rango del espectro y sensibilidad de los ensayos. Este es un lector de fluorescencia y está diseñado para medir en cada ciclo la fluorescencia emitida en cada una de las muestras.
3. El mecanismo de termociclado, éste establece la velocidad en la que un ensayo puede correr, la uniformidad de los cambios de temperatura entre muestras, y el número de muestras que se pueden analizar simultáneamente.

### **3.5.1. QUÍMICA TAQMAN**

Esta técnica de detección para PCR tiempo real utiliza una sonda fluorogénica para detectar un producto de PCR específico a medida que se acumula durante la PCR. Su funcionamiento es de la manera siguiente, la Figura 6 ilustra el proceso (Applied Biosystems, 2005):

1. Se emplea una sonda de oligonucleótidos con un fluorocromo reportero (donador) unido al extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un apagador (receptor) en el extremo 3'. Mientras la sonda está intacta, la proximidad del apagador reduce enormemente la fluorescencia que emite el fluorocromo reportero ya que absorbe la fluorescencia liberada, esto debido a la transferencia



de energía de resonancia de fluorescencia (FRET; resonancia de Förster, Förster, V. T. 1948) a través del espacio.

2. La sonda hibrida con la secuencia de interés (situada entre los cebadores específicos) y la Taq polimerasa separa al fluorocromo reportero presente en la sonda, por su acción de 5' nucleasa permitiendo así la emisión de la señal fluorescente.
3. Esta hidrólisis de la sonda:
  - Separa el fluorocromo reportero del apagador, lo que aumenta la señal del fluorocromo reportero al ser excitado.
  - Separa la sonda de la cadena de ADN molde, lo que permite que la extensión de los cebadores continúe hasta el final de la cadena molde. De tal forma que la ausencia de la sonda hibridada permite la amplificación.
4. En cada ciclo, se separan más moléculas de fluorocromo reportero de sus respectivas sondas, lo que produce un aumento de la intensidad de la fluorescencia que es proporcional a la cantidad de amplicón producido. Cuanto más alto sea el número inicial de copias del gen blanco, se observará un aumento significativo de la fluorescencia en ciclos más tempranos.

Las ventajas del uso de esta técnica son (Applied Biosystems, 2005):

- Aumento de especificidad, debido al uso adicional de una sonda
- Capacidad para realizar un análisis multiplex, esto permite la detección de dos o más secuencias en una misma reacción mediante el marcaje de cada sonda con un fluorocromo diferente
- Fácil de optimizar las condiciones de reacción



- Se puede utilizar para la RT-PCR (PCR-transcriptasa reversa) de 1 o 2 pasos

Se utilizan 3 tipos de fluorocromos en el PCR tiempo real: el reportero o donador, el apagador o receptor y el de referencia (ROX). Éste último, es común en todas las reacciones realizadas, no interactúa con los componentes del ensayo y es utilizado para normalizar la señal en el software del equipo.

En teoría, cualquier molécula fluorescente puede actuar como reportero en un ensayo de PCR tiempo real. El más utilizado es el 6-FAM (6-carbo fluoresceína), esta molécula es excitada eficientemente a 488 nm y máxima excitación cerca de los 500 nm, además se ha utilizado comúnmente debido a que es fácilmente conjugada a los oligonucleótidos y emite una señal fuerte. Otro de los fluorocromos utilizados como reportero es VIC<sup>TM</sup> que es excitada eficientemente cerca de los 538 nm.

Los apagadores, pueden ser una molécula fluorescente o cualquier molécula que pueda absorber energía luminosa dentro del rango apropiado de longitud de onda. El apagador utilizado originalmente con el reportero 6-FAM es TAMRA (6-carboxi-tetrametil-rodamina). La molécula de referencia más utilizada es ROX (6-carboxy-X-rodamina) (Dorak, 2006).



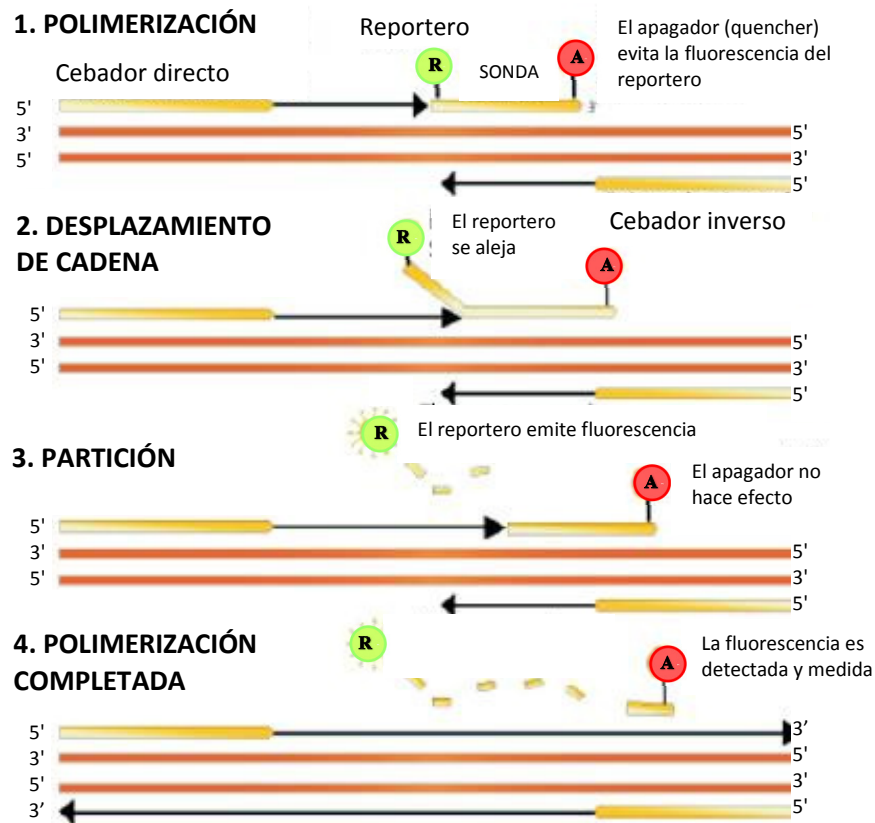


Figura 6. Representación de la química de Taqman (Applied Biosystems, 2005)

### 3.5.2 CURVA DE AMPLIFICACIÓN DE PCR EN TIEMPO REAL

El resultado de una PCR en tiempo real se visualiza en un gráfico de amplificación (Figura 7). En éste se expresa la fluorescencia en escala logarítmica ( $R_n$ ), donde  $R_n$  es detectada por el termociclador en el eje de las ordenadas y el número de ciclos de la PCR en el eje de las abscisas. El gráfico de amplificación puede visualizarse con los dos ejes en escala lineal o con el eje de las ordenadas en escala logarítmica. Ambas presentaciones son válidas para interpretar los resultados.



La curva de amplificación de PCR puede dividirse en 4 fases: la de crecimiento linear, la exponencial temprana, la exponencial y la de finalización (plateau).

La fase de crecimiento linear es la fase inicial donde la producción de fluorescencia (ADN producto) está por debajo del nivel de detección del termociclador. La exponencial es la fase en la que se da un incremento de la fluorescencia de forma logarítmica, y por último la fase plateau donde finaliza la reacción y se estabiliza la fluorescencia (Figura 6). En este gráfico es posible establecer un valor de fluorescencia umbral que señala la zona de aumento exponencial. Este valor se representa en el gráfico con una recta horizontal (línea Umbral) (Applied Biosystems, 2005).

El umbral, se define como el nivel de fluorescencia por encima de la línea basal y dentro de la región de crecimiento exponencial de la gráfica de amplificación. El umbral se puede determinar automáticamente con ayuda del software o se puede ajustar manualmente, debe situarse en la parte superior de la línea base y marcar el inicio de las curvas de amplificación.

Para determinar la línea basal se consideran los ciclos iniciales de PCR, donde no hay cambios significativos en la señal de fluorescencia o hay presencia de líneas no típicas de amplificación o ruido en la detección, estos determinan la fluorescencia basal. El software de análisis da la opción de análisis en la que se introducen los valores de inicio y fin de la línea basal para la gráfica de amplificación. El software utiliza la línea basal y el umbral para calcular valores  $C_T$  (ciclo umbral) (Dorak, 2006).



El punto de intersección de una curva de amplificación con el umbral se denomina  $C_T$  (ciclo umbral). Este punto indica el ciclo en el que la fluorescencia alcanza el valor umbral.

Este valor está relacionado con el número de copias blanco que posee la muestra, lo cual permite que a través de esta se realice una cuantificación o detección con alta sensibilidad y especificidad.

Cuanto mayor sea el número de copias blanco en la muestra se alcanzará la cantidad de fluorescencia en el valor umbral más rápidamente, el valor de  $C_T$  obtenido será menor. Si la eficiencia de la reacción es óptima, cada vez que se diluye una muestra 10 veces el valor de  $C_t$  aumenta aproximadamente 3.3 ciclos (Dorak, 2006).

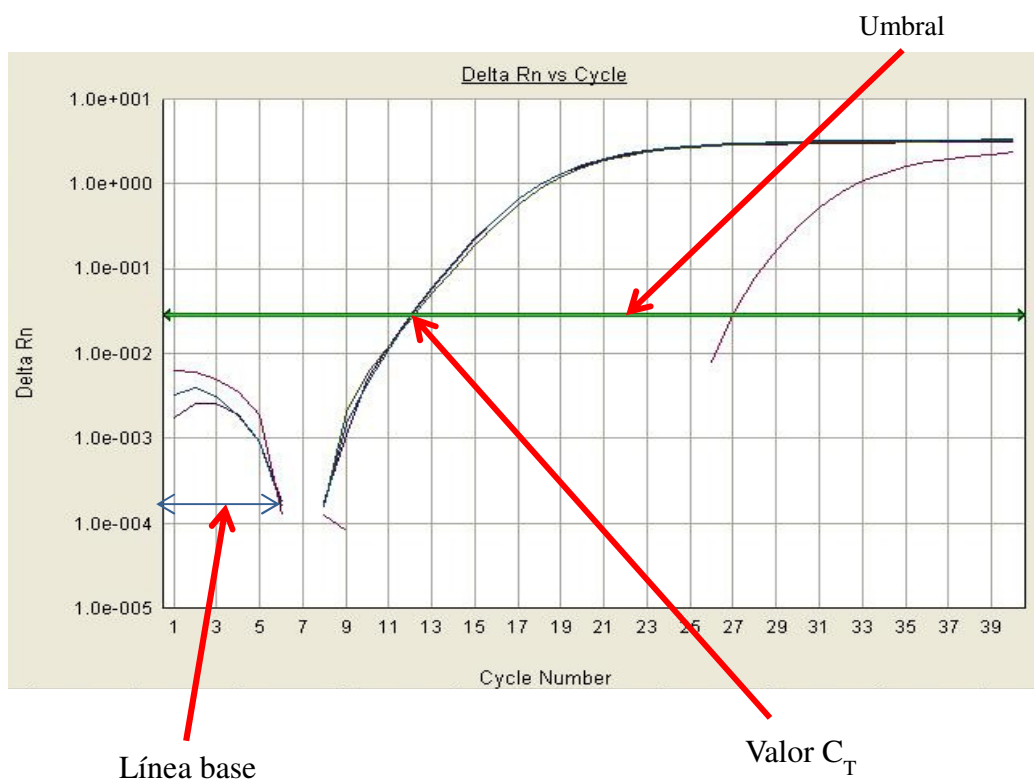


Figura 7. Curva de amplificación de PCR tiempo real



### **3.5.3. PCR EN TIEMPO REAL EN LA DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN ALIMENTOS**

En países industrializados, se ha reportado que el porcentaje de la población que presenta alguna enfermedad transmitida por alimentos es mayor al 30%. En los Estados Unidos de América, se presentan anualmente 76 millones de casos de enfermedades transmitidas por alimentos, de las cuales 325,000 hospitalizaciones y 5,000 muertes, teniendo un costo médico y de pérdidas de productividad aproximado de 35 billones de dólares anuales (WHO, 2012).

Este tipo de enfermedades implican un gran problema social y económico en las comunidades así como en sus sistemas de salud (WHO, 2012). Por lo que hay gran interés en las mejoras en la detección de alimentos infectados, con la finalidad de asegurar su calidad y rastreo de los alimentos en caso de brote de enfermedad.

Tradicionalmente el análisis de alimentos para la detección de microorganismos patógenos consiste en una etapa de pre-enriquecimiento y aislamiento de colonias en medios de cultivo específicos. Posteriormente se realiza una identificación bioquímica o serológica. Los métodos tradicionales requieren de varios días o semanas para obtener resultados, además de que algunas características fenotípicas con las cuales la bacteria es comúnmente identificada no siempre se encuentran expresadas, por lo que se puede dificultar su identificación y clasificación (Rodríguez, 2012).

La amplificación in vitro de ácidos nucleicos usando la técnica de PCR, ha sido desde sus orígenes, una poderosa herramienta para el análisis microbiológico, así como del análisis en matrices alimenticias.



La introducción del PCR en tiempo real brinda la oportunidad de una rápida detección de patógenos en alimentos, además de permitir el ahorro en tiempo de obtención de resultados, ofrece mayor sensibilidad, reproducibilidad y la disminución de riesgos de contaminación entre las muestras durante la técnica (Fricker, et al, 2007).

Varios artículos han sido publicados acerca de la detección de diferentes microorganismos patógenos en alimentos mediante PCR en tiempo real, entre ellos:

- Detección de *Salmonella* en: alfalfa cilantro, melón (Hu, 2004). Ensalada mixta, brócoli, coliflor (Bhagwat, 2003). Filetes de pescado, leche cruda, pollo, huevo, carne de res, carne picada (Malorny, 2004). Hamburguesas, carne de pavo, salmón, lechuga, ensalada de zanahoria, maíz, harina, leche cruda, queso Roquefort, lasagna, nuez moscada, huevo y chocolate (Ruíz-Rueda,2010)
- Detección de *Staphylococcus aureus* en: leche cruda (Fusco, et al, 2011). Salchicha, crema dulce, queso Bryndza, carne de puerco, pollo, tocino, huevo, queso Cottage, productos lácteos (Trnčíková, 2009).
- Detección de *Mycobacterium bovis* en: leche cruda (Lermo, et al, 2010).
- Detección de *Mycobacterium* spp. en: Espinaca, brócoli, sidra, puerro, lechuga romana, champiñones Portabella, albahaca y acelgas (Yoder,1999).
- Detección de *Listeria monocytogenes*: queso Roquefort, queso fresco, leche cruda, leche pasteurizada, lechuga, carne, salchichas de carne de puerco (Ruíz-Rueda,2010).



#### 4. JUSTIFICACIÓN

En toda matriz alimentaria es importante la detección de microorganismos patógenos como *Salmonella spp*; sin embargo, debido a que la materia prima utilizada en el queso Cotija es leche cruda y, a pesar de que el queso, es sometido a un proceso de maduración de tres meses como mínimo, surge la necesidad de buscar microorganismos que puedan poner en riesgo la salud de quien lo consume.

El proyecto es relevante, pues tiene como finalidad hacer un diagnóstico de la calidad sanitaria de un producto que, si bien se elabora con ciertas normas de higiene y de calidad de materia prima, no contempla algún tratamiento térmico en su proceso.

Debido a la capacidad de diseminación de *Salmonella spp.*, durante el proceso de elaboración los puntos críticos de control son los procedimientos de ordeña, reposo, corte de cuajada y moldeado. Ya que durante estas etapas puede haber contaminación debido a malas prácticas de manufactura como falta de limpieza y desinfección de manos, superficies y recipientes (reposo) y cuchillos (corte de cuajada). Además de posible contaminación de la leche (recolección y reposo) con heces o pelaje de la vaca que haya estado en contacto con heces contaminadas con *Salmonella spp.*

Debido a las 95 muestras a analizar, a la especificidad y a la sensibilidad necesaria en el análisis, se utilizó la técnica de Taqman.



## 5. OBJETIVO GENERAL

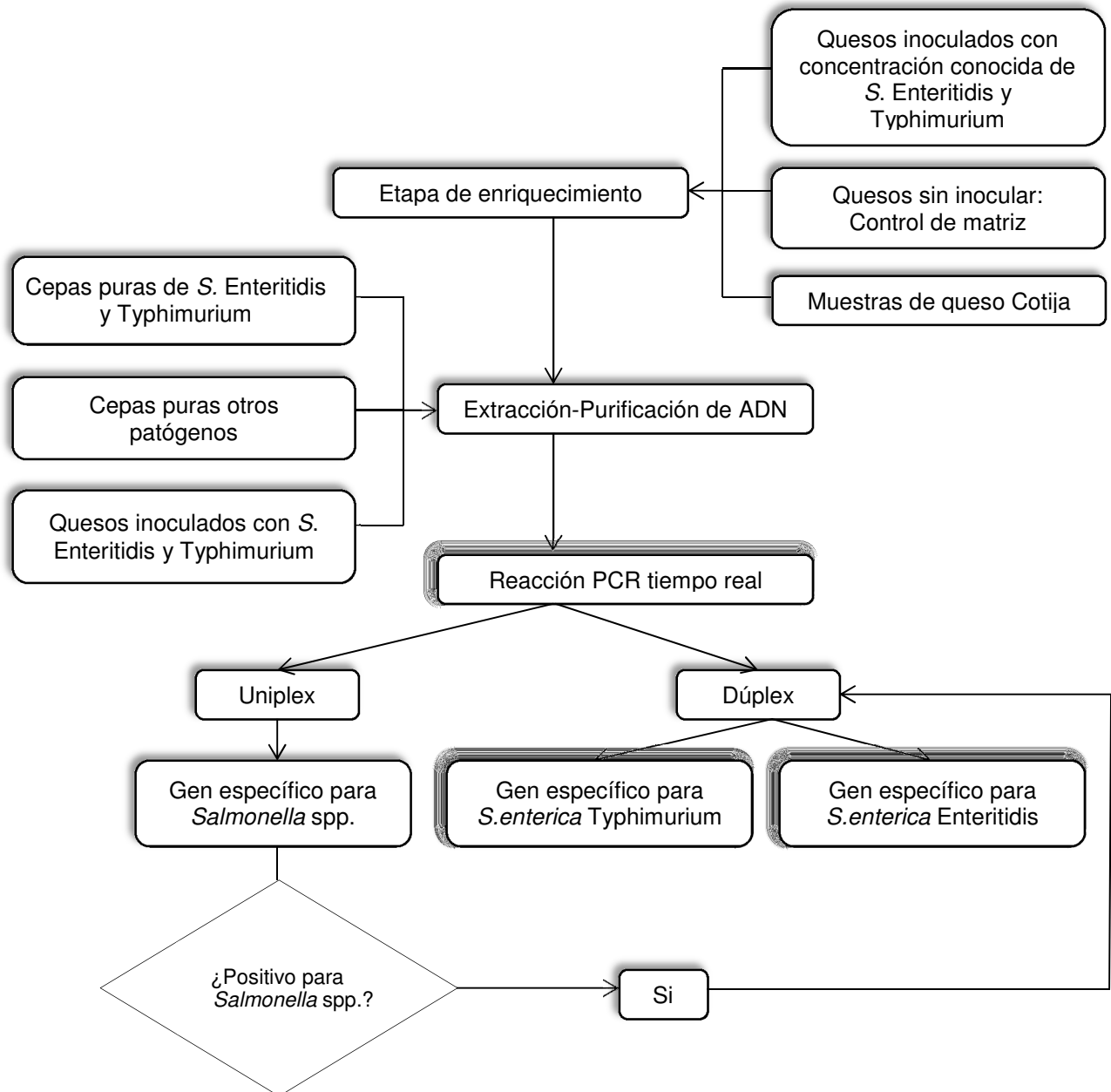
Detectar la presencia de *Salmonella enterica* Enteritidis y/o Typhimurium en 95 muestras de Queso Cotija procedentes de la zona de Jalmich.

### 5.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Seleccionar los juegos de cebadores y sonda que sean específicos para *Salmonella enterica* Enteritidis y *Salmonella enterica* Typhimurium.
- Verificar el efecto que pudiera tener la matriz del alimento sobre la capacidad de amplificación de ADN de *Salmonella enterica*.
- Verificar la especificidad de cebadores y sonda con cepas puras de otras bacterias de diferente género al de estudio.
- Verificar el efecto del paso de enriquecimiento en muestras de queso Cotija.
- Estandarizar las condiciones de la reacción para llevarla a cabo en dúplex.
- Análisis de 95 muestras de queso Cotija procedentes de Jalmich.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. Diagrama de Bloques







## **6.2. Procesamiento de muestras de Queso Cotija**

Las muestras se recibieron en pedazos dentro de bolsas ziploc etiquetadas. Se realizó un análisis visual de cada muestra al momento de la recepción, así como al momento del procesamiento, realizándose un registro de las muestras con características inusuales y materia extraña presente.

El procesamiento se realizó en zona aséptica (Campana de flujo laminar). La muestra se cortó, se le retiró la corteza con un cuchillo específico y se separó de la zona interna del queso, la corteza se desechó. Posteriormente se cortó con un cuchillo diferente la parte interna en fragmentos y se disminuyó el tamaño de partícula en un procesador de alimentos (Oster), con lo que se homogenizó la muestra. Finalmente la muestra ya procesada se guardó en bolsas de 25 g y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  ( Revco).

Nota: El material utilizado para el proceso se lavó con agua y jabón, hipoclorito de sodio y se esterilizó con UV.

La metodología se detalla en el Anexo 1.

## **6.3. Determinación de $a_w$**

Se determinó mediante el equipo Rotronic Instrument Corp. AwQuick, el cual monitorea los datos proporcionados por una sonda ( $a_w\text{VC}$ ), y calcula el valor de actividad acuosa basado en un modelo matemático del proceso de equilibrio.

Se colocaron aprox. 10 g de la muestra en caja petri, después se colocó el sensor y se tomó la medición de  $a_w$  de acuerdo al procedimiento descrito en el manual del equipo.



## **6.4 Recuperación del paquete celular a partir del queso**

La muestra, se descongeló 24h previas a su análisis. Se homogenizó en Stomacher (Seward) con la adición de neutrasa (Novo Nordisk) con el fin de romper la red proteínica del queso, de homogenizar la muestra y lograr una diseminación de los microorganismos presentes en el medio utilizado. El homogenizado, se centrifugó con la finalidad de separar la fase grasa presente en el queso. Se tomaron 2.5 mL de la fase libre de grasa y residuos sólidos, se transfirieron a 25 mL de agua peptonada tamponada (medio de enriquecimiento NOM 114-SSA1-1994, MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE SALMONELLA EN ALIMENTOS). Se incubó a 37°C, 24 h. Posteriormente se inactivó por calor, se obtuvo el pellet por medio de centrifugación y se lavó con solución salina. El paquete celular se conservó para su posterior extracción de ADN mediante el kit Fast ID. La metodología se detalla en el Anexo 2.

## **6.5 Cepas de *Salmonella enterica* Enteritidis y *Salmonella enterica* Typhimurium utilizadas.**

### **6.5.1 Reactivación y conservación de las cepas**

Realizado en el Cepario de la Facultad de Química, UNAM.

Se reactivaron las cepas (Tabla 3) usando caldo lauril e incubando durante 24 h, después se sembró en agar gar Mac Conkey y en Agar lauril, de este último se realizaron pruebas bioquímicas para corroborar su identidad. Posteriormente se sembró en medio CTA (cistina triptona agar) en donde permanecen hasta dos semestres a temperatura ambiente, a partir de este tubo se obtienen cada 15 días inóculos para hacer resiembras en agar Lauril.



Tabla 3. Cepas de referencia utilizadas

<b>Cepas</b>	<b>Origen</b>	<b>Conservación</b>
<i>Salmonella enterica</i> Enteritidis	Cepario de la Facultad de Química, UNAM.	Ultracongelación (-70°C) en medio BHI con glicerol al 50%
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium	Cepario de la Facultad de Química, UNAM.	Ultracongelación (-70°C) en medio BHI con glicerol al 50%

### 6.5.2 Preparación del medio crecido con las cepas puras

Realizado en el Cepario de la Facultad de Química, UNAM.

Se tomaron 2 colonias aisladas del medio agar Lauril (preparado en el punto 6.5.1) y se inocularon en 225 mL de agua peptonada tamponada. Se incubo durante 24 h.

### 6.6. Evaluación del kit de extracción y purificación de ADN

Se inactivo el cultivo obtenido en el punto anterior (6.5.2), calentando el medio a 80°C, 20min. Se transfirieron 25 mL del cultivo desactivado a un tubo Falcon estéril. Posteriormente se obtuvo el pellet por centrifugación y se realizaron lavados con solución salina; el pellet obtenido se conservó para la posterior extracción de ADN mediante el kit Fast ID. Obteniendo de esta manera el ADN de las cepas puras.

Con la finalidad de obtener pellet celular de los microorganismos puros (*Salmonella enterica* Enteritidis y Thypimurium) que se inocularan en queso Cotija y servirán como control de matriz; se inactivo el cultivo de cepas puras con agua peptonada tamponada (punto 6.5.2) y se obtuvo el pellet celular mediante el procedimiento ya descrito, se resuspendió en 5



mL de solución salina y se añadieron a una muestra de queso pesada dentro de una bolsa para stomacher (Seward). Esta muestra se trató de la misma manera que se realizó la recuperación del paquete celular a partir del queso.

Con esto, se somete a las células al mismo tratamiento que a las muestras a analizar. Se realizó la extracción de ADN mediante el kit Fast ID.

La metodología se detalla en el Anexo 3 y 4.

### **6.7. Extracción de ADN con el sistema comercial**

Se empleó un kit comercial de extracción y purificación de ADN (Fast ID<sup>®</sup>), basado en la ruptura celular con detergentes iónicos y con enzimas (proteínasa K y lisozima). La purificación se da por unión específica del ADN a una membrana de sílica, además se realizan lavados para eliminar sustancias que puedan inhibir la reacción de PCR. Finalmente, el ADN se eluye con buffer TE y se conserva a -20°C hasta su uso.

La metodología se detalla en el Anexo 5.

### **6.8. Análisis del ADN extraído**

La pureza del ADN extraído se obtuvo en base a las lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm en el espectro Biomate 3 (Thermo Scientific). La lectura a 260 nm se utilizó para realizar la cuantificación de ADN.



## **6.9. Inoculación del queso con inóculo de concentración conocida y recuperación del paquete celular.**

Se realizó por separado para cada cepa (*Salmonella* Enteritidis y Typhimurium).

\*Las colonias utilizadas para las diluciones se tomaron de un cultivo de agar en BHI, obtenido a partir de inóculo tomado de cajas de Agar Lauril.

Para la inoculación de los quesos, se eligió una muestra de queso presuntamente negativa y se descongeló 24h previas a su utilización. Se homogenizó con la adición de neutrasa (Novo Nordisk) con el fin de romper la red proteínica del queso, de homogenizar la muestra y lograr una diseminación de los microorganismos presentes en el medio utilizado. El homogenizado, se centrifugó con la finalidad de separar la fase grasa presente en el queso. Se tomaron 2.5 mL de la fase libre de grasa y residuos sólidos, se transfirieron a agua peptonada tamponada, a éste se le agregó 1 mL de inóculo de la bacteria en estudio como se describe en el Anexo 6. Los tubos con el medio inoculado se incubaron y posteriormente se inactivó por calor, se obtuvo el pellet por medio de centrifugación y se lavó con solución salina. El paquete celular se conservó para su posterior extracción de ADN mediante el kit Fast ID.

La metodología se detalla en el Anexo 6.

Con la finalidad de conocer la concentración con la que se inoculó una muestra presuntamente negativa para *Salmonella* spp., se realizó el conteo en placa de BHI de 1 mL del inóculo de la bacteria en estudio. Se realizó el conteo de las UFC en la placa petri después de la incubación.

## 6.9. PCR EN TIEMPO REAL

### 6.9.1. Programación de PCR tiempo real (Applied Biosystem)

Volumen de reacción 20  $\mu$ L

Tabla 4. Condiciones de amplificación para PCR tiempo real (Termociclador Applied Biosystems 7500).

Condiciones	Tiempo
50°C	2 min
95°C	10 min
40 ciclos: 95°C	15 s
60 °C	1 min
4°C	

### 6.9.2. Condiciones de reacción

Tabla 5. Mezcla de reacción para gen específico para *Salmonella* spp. en PCR tiempo real.

Reactivo	C inicial	C final	Volumen a adicionar
1. Agua DDFE*	--	--	4.5 $\mu$ L
2. Master mix	2X	1X	10 $\mu$ L
3. Stock 1 de cebadores y sonda específicos para <i>Salmonella</i> spp.	20X	10X	0.5 $\mu$ L
4. ADN	10 ng/ $\mu$ L	50 ng	5 $\mu$ L
<b>Volumen final</b>			<b>20 <math>\mu</math>L</b>

\* Desionizada, filtrada y estéril.

Tabla 6. Mezcla de reacción para detección de genes específicos para *Salmonella enterica* Enteritidis y *S. Typhimurium*.

Reactivo	C inicial	C final	Volumen a adicionar
1. Agua DDFE*	--	--	3.32 $\mu\text{L}$
2. Master mix	2X	1X	10 $\mu\text{L}$
3. Cebador F para <i>S. enterica</i> Typhimurium.	10 $\mu\text{M}$	130 nM	0.26 $\mu\text{L}$
4. Cebador R <i>S. enterica</i> Typhimurium.	10 $\mu\text{M}$	130 nM	0.26 $\mu\text{L}$
5. Cebador F para <i>S. enterica</i> Enteritidis	10 $\mu\text{M}$	130 nM	0.26 $\mu\text{L}$
6. Cebador R para <i>S. enterica</i> Enteritidis	10 $\mu\text{M}$	130 nM	0.26 $\mu\text{L}$
7. Sonda para <i>S. enterica</i> Typhimurium.	5 $\mu\text{M}$	80 nM	0.32 $\mu\text{L}$
8. Sonda para <i>S. enterica</i> Enteritidis	5 $\mu\text{M}$	80 nM	0.32 $\mu\text{L}$
9. ADN	10 ng/ $\mu\text{L}$	50 ng	5 $\mu\text{L}$
<b>Volumen final</b>			<b>20 <math>\mu\text{L}</math></b>

\*Destilada, desionizada, filtrada y estéril.

### 6.10. PCR PUNTO FINAL de la región V<sub>3</sub> del gen 16s

Se realizó PCR punto final usando los cebadores 338 y 518r, esto con la finalidad de poder detectar la región V<sub>3</sub> del gen 16s, que se encuentra en todo ADN microbiano. De esta manera corroborar que contamos con muestras de ADN amplificable de microorganismos presentes en los quesos Cotija analizados. En la Tabla 7 se muestran las secuencias de los cebadores utilizados.

Tabla 7. Secuencia de los cebadores utilizados para detectar región V<sub>3</sub>.

	<b>Secuencia (5'-3')</b>	<b>Posición</b>	<b>Región blanco</b>
338 F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	338-357	16S V <sub>3</sub> <sup>a</sup>
518R	ATTACCGCGGCTGCTGG	518-534	

<sup>a</sup>: Ercolini. (2004)

### 6.10.1. Programación de PCR punto final (Termociclador Axygen de Maxygen)

Tabla 8. Ciclo de amplificación de PCR punto final

<b>Ciclo</b>	<b>Condiciones</b>
Inicio	94°C, 2 min
Nº ciclos	35
Desnaturalización	92°C, 45 s
Hibridación	62°C, 45 s
Elongación	72°C, 1.5 min
Elongación final	72°C, 5 min

Tabla 9. Mezcla de reacción de PCR punto final.

<b>Reactivo</b>	<b>C inicial</b>	<b>C final</b>	<b>Volumen a adicionar</b>
1. Buffer	10 X	1 X	5 µL
2. dNTPS's	10 Mm	0.2 mM	1 µL
3. Cebador 518 R	10 µM	0.5 µM	2.5 µL
4. Cebador 338 F	10 µM	0.5 µM	2.5 µL
6. DNA	10 ng/ µL	100 ng	10 µL
7. PFU Polimerasa	2.5 U/ µL	0.25 U	0.5 µL
5. Agua DDFE*	---	---	28.5 µL
<b>Volumen final</b>			<b>50 µL</b>

\* Desionizada, filtrada y estéril





### **6.10.2. ANÁLISIS DE LOS AMPLICONES OBTENIDOS DEL PCR PUNTO FINAL**

Se verificó la amplificación del gen blanco en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (1  $\mu$ L/10 mL de agarosa) (Invitrogen), la electroforesis se llevó a cabo a 85 V por 45 min, utilizando como marcador MassRuler™ DNA Ladder, Low Range (Invitrogen), se visualizó en el transiluminador de UV ColePalmer. El tamaño de amplicón esperado es de 180 pb.



## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Búsqueda de secuencias de cebadores y sondas en la bibliografía

De acuerdo a la especie y serovariedades que se requieren identificar, se realizó una búsqueda bibliográfica de cebadores y sondas para su posterior síntesis y utilización en la metodología de PCR tiempo real.

Se realizó este análisis, utilizando el algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI), el cual contiene una extensa base de datos genómicos.

Mediante la introducción de la secuencia a analizar (región de ADN a amplificar) el programa muestra como resultados una lista de los genes relacionados a la secuencia, el porcentaje de identidad y el valor de E (expectancia).

El valor de E, indica la posibilidad de que el alineamiento de cebadores se deba únicamente al azar. Mientras mayor sea el porcentaje de identidad, mayor será la especificidad del cebador, y mientras menor sea el valor E, mayor será la certidumbre de alineamiento del cebador (Korf, 2003).

Se seleccionaron los cebadores y sondas que, por análisis *in silico*, presentaron el valor más bajo de expectancia.

#### 7.1.1 *Salmonella enterica* Enteritidis

La Figura 8 muestra el análisis en BLAST de la región a amplificar del gen específico para *S. Enteritidis*, mostrando un valor de expectancia bajo y porcentaje de identidad alto para *Salmonella enterica* Enteritidis.



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">CP003047.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Gallinarum/pullorum str. RK55078, complete genome	180	180	100%	2e-42	100%
<a href="#">QQ503251.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain SEA2	180	180	100%	2e-42	100%
<a href="#">AM933172.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. P125109 complete genome	180	180	100%	2e-42	100%
<a href="#">EF530066.1</a>	Salmonella enterica isolate S058 fimbrial protein	180	180	100%	2e-42	100%
<a href="#">EF530064.1</a>	Salmonella enterica isolate S068 fimbrial protein	180	180	100%	2e-42	100%
<a href="#">EF530062.1</a>	Salmonella enterica isolate S063 fimbrial protein	180	180	100%	2e-42	100%
<a href="#">EF530061.1</a>	Salmonella enterica isolate S062 fimbrial protein	180	180	100%	2e-42	100%
<a href="#">EF530060.1</a>	Salmonella enterica isolate S061 fimbrial protein	180	180	100%	2e-42	100%
<a href="#">EF530059.1</a>	Salmonella enterica isolate S060 fimbrial protein	180	180	100%	2e-42	100%
<a href="#">EF530058.1</a>	Salmonella enterica isolate S059 fimbrial protein	180	180	100%	2e-42	100%
<a href="#">EF530057.1</a>	Salmonella enterica isolate S057 fimbrial protein	180	180	100%	2e-42	100%
<a href="#">EF530056.1</a>	Salmonella enterica isolate S056 fimbrial protein	180	180	100%	2e-42	100%
<a href="#">EF530055.1</a>	Salmonella enterica isolate S055 fimbrial protein	180	180	100%	2e-42	100%
<a href="#">EF530054.1</a>	Salmonella enterica isolate S032 fimbrial protein	180	180	100%	2e-42	100%
<a href="#">EF530053.1</a>	Salmonella enterica isolate S031 fimbrial protein	180	180	100%	2e-42	100%
<a href="#">EF530052.1</a>	Salmonella enterica isolate S030 fimbrial protein	180	180	100%	2e-42	100%
<a href="#">EF530051.1</a>	Salmonella enterica isolate S029 fimbrial protein	180	180	100%	2e-42	100%
<a href="#">EF530050.1</a>	Salmonella enterica isolate S028 fimbrial protein	180	180	100%	2e-42	100%
<a href="#">EF530049.1</a>	Salmonella enterica isolate S027 fimbrial protein	180	180	100%	2e-42	100%
<a href="#">EF553324.1</a>	Salmonella enteritidis fimbrial protein	180	180	100%	2e-42	100%
<a href="#">X98516.1</a>	S. enterica	180	180	100%	2e-42	100%
<a href="#">L11008.1</a>	Salmonella enteritidis fimbrial protein	180	180	100%	2e-42	100%
<a href="#">J03832.1</a>	Salmonella enteritidis fimbrial antigen	180	180	100%	2e-42	100%
<a href="#">GU945269.1</a>	Salmonella enterica strain DP1009 fimbrial structural protein	174	174	100%	7e-41	99%
<a href="#">AM933173.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Gallinarum str. 287/91 complete genome	174	174	100%	7e-41	99%
<a href="#">CP001144.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin str. CT_02021853, complete genome	174	174	100%	7e-41	99%
<a href="#">FM200053.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi A str. AKU_12601 complete genome	174	174	100%	7e-41	99%
<a href="#">CP000026.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi A str. ATCC 9150, complete genome	174	174	100%	7e-41	99%
<a href="#">EF530063.1</a>	Salmonella enterica isolate S065 fimbrial protein	162	169	100%	3e-39	98%
<a href="#">CP003278.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. P-stx-12, complete genome	161	161	100%	5e-37	97%
<a href="#">AE014613.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi Ty2, complete genome	161	161	100%	5e-37	97%
<a href="#">AL627282.1</a>	Salmonella enterica serovar Typhi (Salmonella typhi) strain CT18, complete chromosome	161	161	100%	5e-37	97%
<a href="#">EF530065.1</a>	Salmonella enterica isolate S004 fimbrial protein	152	159	100%	2e-36	97%

Figura 8. Análisis BLAST para la región a amplificar del gen específico de *Salmonella enterica* Enteritidis.

### 7.1.2. *Salmonella* spp.

El gen seleccionado como blanco de amplificación se encuentra en diferentes variedades de *Salmonella enterica*, así como en otra especie (*Salmonella bongori*). Por lo que se decidió usarlo para realizar el tamizaje y poder identificar la presencia de *Salmonella* spp. en las muestras de queso.

La Figura 9 muestra el análisis en BLAST de la región a amplificar, mostrando valores de expectancia bajos y porcentajes de identidad altos para varias serovariedades de *Salmonella enterica* y para *Salmonella bongori*.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
CP003386.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. 798, com	158	158	100%	6e-36	100%
JN982040.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium strain J4STEF	158	158	100%	6e-36	100%
JN680859.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium strain EHO22	158	158	100%	6e-36	100%
CP002614.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. UK-1, co	158	158	100%	6e-36	100%
CP002487.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. ST4/74, c	158	158	100%	6e-36	100%
AP011957.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. T000240	158	158	100%	6e-36	100%
FO312003.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium SL1344 comp	158	158	100%	6e-36	100%
CP001363.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. 14028S,	158	158	100%	6e-36	100%
FN424405.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. D23580 c	158	158	100%	6e-36	100%
AE006468.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2, com	158	158	100%	6e-36	100%
CP001138.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Agona str. SL483, complet	158	158	100%	6e-36	100%
CP001113.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Newport str. SL254, compl	158	158	100%	6e-36	100%
EU348366.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Gallinarum strain S9873 inv	158	158	100%	6e-36	100%
EU348365.1	Salmonella typhimurium strain CVCC541 invasion protein	158	158	100%	6e-36	100%
DQ644633.1	Salmonella bongori strain CNM-256	158	158	100%	6e-36	100%
DQ644615.1	Salmonella enterica subsp. enterica strain CNM-3685-03	158	158	100%	6e-36	100%
U43237.1	Salmonella enterica	158	158	100%	6e-36	100%
M90846.1	Salmonella typhimurium	158	158	100%	6e-36	100%
CP003416.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Heidelberg str. B182, comp	152	152	100%	3e-34	99%
XQ812057.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Gallinarum strain WBSGPC	152	152	100%	3e-34	99%
CP003278.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. P-stx-12, compl	152	152	100%	3e-34	99%
JN982041.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium strain OEHST	152	152	100%	3e-34	99%
CP003047.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Gallinarum/pullorum str. RH	152	152	100%	3e-34	99%
FN496648.1	Salmonella enterica subsp. salamae serovar Sofia pathogenicity island 1	152	152	100%	3e-34	99%
AM933172.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis str. P125109 coi	152	152	100%	3e-34	99%
EU311614.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Abony InvA gene, partial co	152	152	100%	3e-34	99%
CP000886.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi B str. SPB7, com	152	152	100%	3e-34	99%
DQ644631.1	Salmonella enterica subsp. indica strain CDC-1937	152	152	100%	3e-34	99%
DQ644630.1	Salmonella enterica subsp. indica strain CDC-811	152	152	100%	3e-34	99%
DQ644628.1	Salmonella enterica subsp. houtenae strain ST-15	152	152	100%	3e-34	99%
DQ644627.1	Salmonella enterica subsp. houtenae strain ST-22	152	152	100%	3e-34	99%
DQ644626.1	Salmonella enterica subsp. houtenae strain CNM-2556-03	152	152	100%	3e-34	99%
DQ644618.1	Salmonella enterica subsp. salamae strain CNM-169	152	152	100%	3e-34	99%
CP000026.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi A str. ATCC 9150	152	152	100%	3e-34	99%
AE014613.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi Ty2, complete genom	152	152	100%	3e-34	99%
AL627276.1	Salmonella enterica serovar Typhi (Salmonella typhi) strain CT18, comp	152	152	100%	3e-34	99%
U43273.1	Salmonella gallinarum invasion protein	152	152	100%	3e-34	99%
U43272.1	Salmonella enterica invasion protein	152	152	100%	3e-34	99%
U43248.1	Salmonella enterica invasion protein	152	152	100%	3e-34	99%
U43247.1	Salmonella enterica invasion protein	152	152	100%	3e-34	99%
U43245.1	Salmonella enterica invasion protein	152	152	100%	3e-34	99%
U43244.1	Salmonella enterica invasion protein	152	152	100%	3e-34	99%
U43243.1	Salmonella enterica invasion protein	152	152	100%	3e-34	99%
U43242.1	Salmonella enterica invasion protein	152	152	100%	3e-34	99%
U43238.1	Salmonella enterica invasion protein	152	152	100%	3e-34	99%
JF951189.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi C strain XY25 pu	147	147	100%	1e-32	98%
JF951188.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi C strain DY1 pu	147	147	100%	1e-32	98%
JF951187.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi C strain XT11 pu	147	147	100%	1e-32	98%
JF951186.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi C strain DT4 pu	147	147	100%	1e-32	98%
FR775234.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Weltevreden str. 2007-60-	147	147	100%	1e-32	98%
DQ644632.1	Salmonella bongori strain CNM-262 gene, partial cds	147	147	100%	1e-32	98%
DQ644617.1	Salmonella enterica subsp. salamae strain CNM-176	147	147	100%	1e-32	98%
AE017220.1	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesuis str. SC-B67, c	147	147	100%	1e-32	98%
U43271.1	Salmonella enterica invasion protein	147	147	100%	1e-32	98%
U43239.1	Salmonella enterica invasion protein	147	147	100%	1e-32	98%
U43246.1	Salmonella enterica invasion protein	141	141	100%	6e-31	96%
CP000880.1	Salmonella enterica subsp. arizonae serovar 62:z4,z23:--, complete ge	130	130	100%	1e-27	94%

Figura 9. Análisis BLAST para la región a amplificar del gen específico para el género *Salmonella*.

### 7.1.3. *Salmonella enterica* Typhimurium

La Figura 10 muestra el análisis en BLAST de la región a amplificar del gen específico para *Salmonella enterica* Typhimurium, mostrando un valor de expectativa bajo y porcentaje de identidad alto.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">CP003386.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. 798, com	<a href="#">185</a>	185	100%	3e-44	100%
<a href="#">CP002614.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. UK-1, co	<a href="#">185</a>	185	100%	3e-44	100%
<a href="#">CP002487.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. ST4/74, c	<a href="#">185</a>	185	100%	3e-44	100%
<a href="#">HM920247.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium strain IVRI fla	<a href="#">185</a>	185	100%	3e-44	100%
<a href="#">AP011957.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. T000240	<a href="#">185</a>	185	100%	3e-44	100%
<a href="#">FQ312003.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium SL1344 comp	<a href="#">185</a>	185	100%	3e-44	100%
<a href="#">CP001363.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. 14028S,	<a href="#">185</a>	185	100%	3e-44	100%
<a href="#">FN424405.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. D23580 c	<a href="#">185</a>	185	100%	3e-44	100%
<a href="#">DQ838268.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Goldcoast strain S05200_0	<a href="#">185</a>	185	100%	3e-44	100%
<a href="#">DQ838271.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Heidelberg strain S00560_0	<a href="#">185</a>	185	100%	3e-44	100%
<a href="#">DQ838265.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Goldcoast strain 5456_03 p	<a href="#">185</a>	185	100%	3e-44	100%
<a href="#">DQ838251.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Kentucky strain 2295_05 p	<a href="#">185</a>	185	100%	3e-44	100%
<a href="#">DQ838250.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Kentucky strain 2570_05 p	<a href="#">185</a>	185	100%	3e-44	100%
<a href="#">DQ838235.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Agama strain 150_05 phas	<a href="#">185</a>	185	100%	3e-44	100%
<a href="#">DQ838229.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Bovismorbificans strain 826	<a href="#">185</a>	185	100%	3e-44	100%
<a href="#">DQ838228.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Bovismorbificans strain 777	<a href="#">185</a>	185	100%	3e-44	100%
<a href="#">DQ838203.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Virchow strain 1495_03 ph	<a href="#">185</a>	185	100%	3e-44	100%
<a href="#">EF599295.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium strain 95 pha	<a href="#">185</a>	185	100%	3e-44	100%
<a href="#">EF599292.1</a>	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Kentucky strain C7 phase 1	<a href="#">185</a>	185	100%	3e-44	100%
<a href="#">EF057790.1</a>	Salmonella typhimurium phase I flagellin middle domain variant C150 (fl	<a href="#">185</a>	185	100%	3e-44	100%
<a href="#">EF057789.1</a>	Salmonella typhimurium phase I flagellin middle domain variant C131 (fl	<a href="#">185</a>	185	100%	3e-44	100%

Figura 10. Análisis BLAST para la región a amplificar del gen específico para *Salmonella enterica* Typhimurium.



## **7.2. ESPECIFICIDAD DE LOS JUEGOS DE SONDAS Y CEBADORES**

Se realizó PCR tiempo real de los ADN de cepas puras, queso Cotija inoculado con la bacteria inactiva, queso Cotija inoculado con concentración de inóculo conocida y queso Cotija sin inocular (control de matriz).

Para el análisis de cada gen, es necesario realizar una reacción o ensayo de NTC o control negativo, éste contiene agua DDFE debido a que se requiere que la muestra a analizar no contenga ADN molde; por lo que estos no deben presentar amplificación.

### **7.2.1. ESPECIFICIDAD DE LOS CEBADORES Y SONDA PARA EL GEN ESPECÍFICO PARA *Salmonella* spp.**

Los NTC'S no mostraron amplificación, esto indica que los reactivos utilizados están libres de contaminación.

Los ADN analizados de las cepas de *Salmonella* Enteritidis (Figuras 11 y 12) y Typhimurium dieron resultados positivos para el gen endógeno de *Salmonella* spp. Esto ratifica que el juego de cebadores y sonda es capaz de detectar a *Salmonella* spp.

Las muestras de queso Cotija utilizadas para los análisis de especificidad de los cebadores y sonda, son muestras que se analizaron previamente siendo negativas para *Salmonella* spp. Debido a esto, el resultado de Ct obtenido de los ensayos de control de matriz (queso Cotija sin inocular) es considerado como control negativo.



Las muestras de queso Cotija sin inocular no presentaron amplificación (Tabla 10). Este resultado negativo para *Salmonella* spp, corrobora que la muestra utilizada no se encuentra contaminada con la bacteria.

Tabla 10. Valores de los promedios de Ct obtenidos para el gen específico para *Salmonella* spp., para las cepas de *Salmonella* Enteritidis y Typhimurium.

Muestra	Ct
Control de matriz :Queso Cotija sin inocular	NA
Cepa pura de <i>S. Enteritidis</i>	13.66 ± 0.03
Control de matriz con <i>S. Enteritidis</i> inactiva	15.04 ± 0.01
Cepa pura de <i>S. Typhimurium</i>	13.48 ± 0.01
Control de matriz con <i>S. Typhimurium</i> inactiva	14.12 ± 0.1
NTC	NA

\* Se muestra los valores promedio de Ct, cada ensayo se realizó por duplicado.  
NA = No hubo amplificación

Con la finalidad de verificar la detección de las cepas de estudio en la matriz alimentaria mediante el juego de cebadores y sonda elegidos, se agregó una cantidad de bacterias inactivas al control de matriz, para saber si existía alguna inhibición de la reacción o interferencia por algún componente de la muestra.

Los valores de Ct obtenidos por las muestras de control de matriz con ambas bacterias inactivas (Tabla 13), fueron cercanos a los presentados para las cepas puras de *S. Enteritidis* y *Typhimurium*. Estos valores nos muestran que es viable la detección por la metodología planteada para *Salmonella* spp. en el queso Cotija y que la purificación de ADN realizada mediante el kit de extracción Fast ID es efectiva.

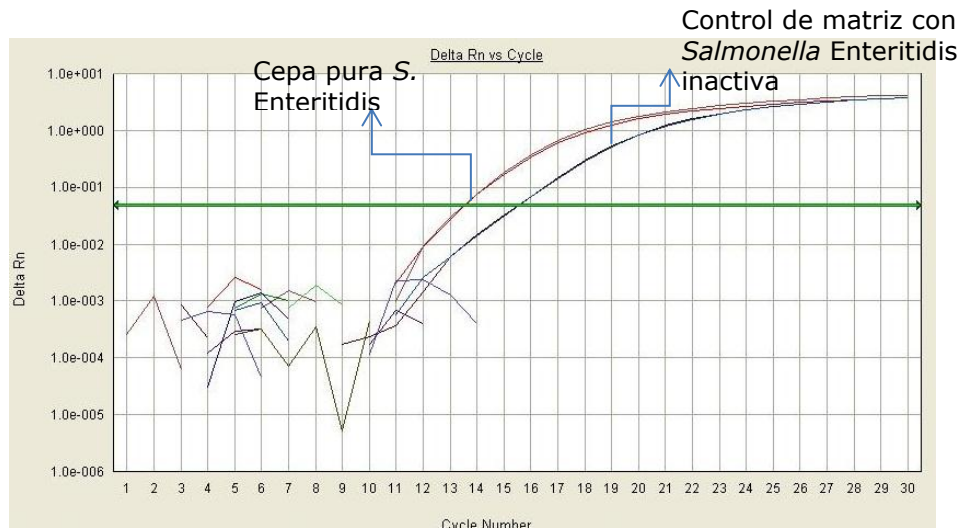


Figura 11. Amplificación por PCR tiempo real del gen específico para *Salmonella* spp., muestras: ADN cepas puras de *Salmonella* Enteritidis, control de matriz con *S. Enteritidis* inactiva.

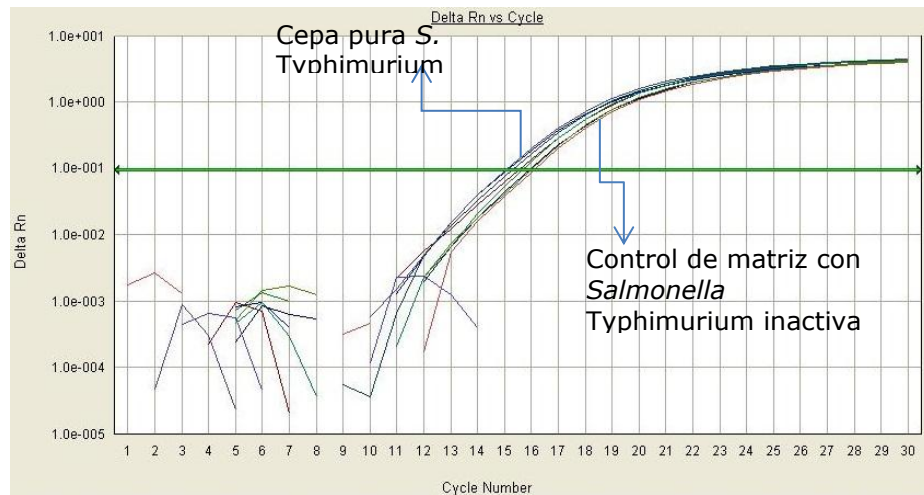


Figura 12. Amplificación por PCR tiempo real del gen específico para *Salmonella* spp., muestras: ADN cepas puras de *Salmonella* Typhimurium, control de matriz con *S. Typhimurium* inactiva.





### 7.2.2. ESPECIFICIDAD DE LOS CEBADORES Y SONDA PARA LOS GENES ESPECÍFICOS PARA *Salmonella enterica* Enteritidis y Typhimurium

Se decidió hacer la detección y diferenciación de *Salmonella enterica* Enteritidis y Typhimurium por medio de una reacción dúplex. Debido a esto, se sintetizó cada sonda con un fluorocromo distinto, con lo que se puede diferenciar la emisión de fluorescencia de cada sonda.

Para verificar el funcionamiento del sistema de amplificación en dúplex, se analizaron los ADN de ambas serovariedades con los juegos de cebadores y sonda elegidos.

En la Tabla 11 y Figura 13 se muestran los resultados obtenidos para el gen específico para *S. Enteritidis*. Los NTC'S de fueron negativos, es decir no hubo amplificación alguna, lo que asegura que los reactivos utilizados no se encuentren contaminados.

Tabla 11. Valores de los promedios de Ct obtenidos para el gen específico para *S. Enteritidis*.

Muestra	Ct
Control de matriz :Queso Cotija sin inocular	27.75 ± 0.10
Cepas pura de <i>S. Enteritidis</i>	13.44 ± 0.07
Control de matriz con <i>S. Enteritidis</i> inactiva	13.24 ± 0.01
Cepa puras de <i>S. Typhimurium</i>	NA
NTC	NA

\* Se muestra los valores promedio de Ct, cada ensayo se realizó por duplicado  
NA = No hubo amplificación

De acuerdo con la Tabla 11 y Figura 13, se observó la correcta amplificación del gen tanto en la mezcla de las cepas puras y en las muestras de control de matriz con *S. Enteritidis* inactiva. Esto significa que el sistema de detección sí fue capaz de amplificar específicamente el ADN de *Salmonella* Enteritidis en presencia de otra serovariedad de *Salmonella enterica*.



El valor de Ct obtenido por la muestra de ADN de control de matriz con *S. Enteritidis* inactiva (Tabla 11), fue el mismo valor de Ct presentado para la cepa pura. Estos valores nos muestran que es posible la detección de *Salmonella* Enteritidis en la matriz alimentaria analizada con los cebadores propuestos.



Figura 13. Amplificación de PCR tiempo real del gen específico para *S. enterica* Enteritidis en dúplex, muestras: ADN cepa pura de *Salmonella* Enteritidis, Control de matriz con *S. Enteritidis* inactiva.

En la Tabla 12 y Figura 14, se muestran los resultados obtenidos para la detección del gen específico para *Salmonella enterica* Typhimurium. Los NTC no presentaron amplificación, lo que verifica la pureza de los reactivos.

Tabla 12. Valores de los promedios de Ct obtenidos para gen específica para *Salmonella enterica* Typhimurium.

Muestra	Ct
Control de matriz :Queso Cotija sin inocular	NA
Cepas puras <i>S. Typhimurium</i>	10.03 ± 0.01
Control de matriz con <i>S. Typhimurium</i> inactiva	11.04 ± 0.01
Cepa puras de <i>S. Enteritidis</i>	NA
NTC	NA

\* Se muestra los valores promedio de Ct, cada ensayo se realizó por duplicado  
NA = No hubo amplificación



Se observó la correcta amplificación del gen tanto en la mezcla de las cepas puras y en las muestras de control de matriz con *S. Typhimurium* inactiva, los valores obtenidos de Ct son muy cercanos lo que muestra que es posible la detección de *S. Typhimurium* en el queso Cotija de la misma manera que la cepa pura, sin mostrar interferencia algún componente de las muestras, además de corroborar que el método de extracción de ADN Fast ID permite la obtención de ADN de buena calidad, amplificable, además de ser efectivo para su purificación.

Se mostró que la metodología de detección fue capaz de amplificar específicamente el ADN de *Salmonella Typhimurium* en presencia de otra serovariedad de *Salmonella enterica*.

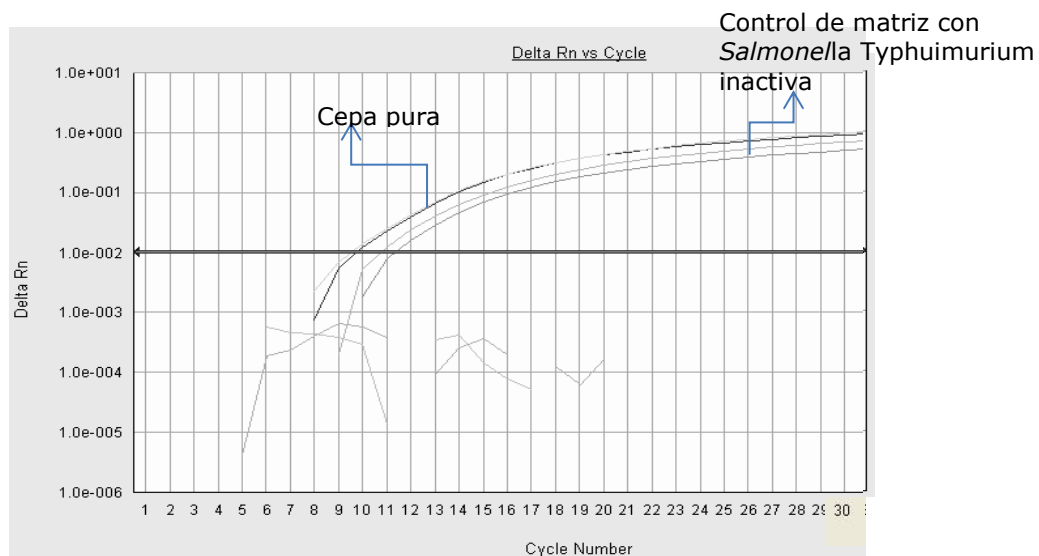


Figura 14. Amplificación por PCR tiempo real del gen específico para *S. enterica Typhimurium* en dúplex, muestras: ADN cepa pura de *Salmonella Typhimurium*, Control de matriz con *S. Typhimurium* inactiva.



Para verificar la especificidad de reactivos y estandarizar la reacción en dúplex, se realizaron reacciones en uniplex es decir un juego de cebadores y sonda con ADN de ambas cepas de estudio (*S. Enteritidis* y *Typhimurium*) y en dúplex en la que la mezcla de reacción incluyó los dos juegos de cebadores y dos sondas además de ambos ADN de las cepas. En todos los ensayos realizados se obtuvo amplificación y valores de Ct como los mostrados en las Tablas 11 y 12. No se mostró interferencia de alguno de los reactivos al realizar la reacción dúplex, por lo que se obtuvo un mismo patrón de detección y amplificación tanto en dúplex y uniplex. Los resultados mostraron que es posible la detección y diferenciación de ambas cepas por reacción dúplex mediante el uso de los juegos de cebadores y sonda utilizados. Por lo tanto para el análisis de las muestras de queso Cotija, se realizará primero la reacción con los juegos de cebadores y sonda para el gen específico para el género *Salmonella*, en caso de obtener un resultado positivo nos indicará la presencia de *Salmonella* spp., por lo que se procederá a realizar la reacción en dúplex.



### 7.3. ESPECIFICIDAD DE LOS CEBADORES Y SONDA CON CEPAS PURAS DE DIFERENTES GÉNEROS AL DE ESTUDIO

Los juegos de cebadores y sondas deben mostrar gran especificidad por *Salmonella* para realizar un correcto análisis de la muestra. Por lo tanto, se probó el sistema de detección contra cepas puras de microorganismos patógenos y otros aislados del queso, éstos sirven como controles negativos en las reacciones de PCR tiempo real. Los resultados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Valores de los promedios de Ct obtenidos para los genes analizados con cepas puras de *Salmonella* spp., *Micobacterium bovis*, *Staphylococcus aureus*, *Brucella abortus*, *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus* spp.

<b>Microorganismo</b>	<b>Ct promedio</b>
<b>Gen específico para <i>Salmonella</i> spp.</b>	
<i>Enterococcus</i> spp.	NA
<i>Staphylococcus aureus</i>	NA
<i>Brucella abortus</i>	NA
<i>Mycobacterium bovis</i>	NA
<i>Listeria monocytogenes</i>	NA
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	NA
<b>Gen específico para <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis</b>	
<i>Enterococcus</i> spp.	NA
<i>Staphylococcus aureus</i>	NA
<i>Brucella abortus</i>	NA
<i>Mycobacterium bovis</i>	NA
<i>Listeria monocytogenes</i>	NA
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	NA
<i>Salmonella</i> Typhimurium	NA
<b>Gen específico para <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium</b>	
<i>Enterococcus</i> spp.	NA
<i>Staphylococcus aureus</i>	NA
<i>Brucella abortus</i>	NA
<i>Mycobacterium bovis</i>	NA
<i>Listeria monocytogenes</i>	NA
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	NA
<i>Salmonella</i> Enteritidis	NA

\* Se muestra los valores promedio de Ct, cada ensayo se realizó por duplicado  
NA = No hubo amplificación



En la Tabla 13 se observa el análisis con cebadores y sonda para el gen específico para *Salmonella* spp. de ADN de *Enterococcus* spp, *Staphylococcus aureus*, *Brucella abortus*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium bovis* y *E. coli* DH5 $\alpha$ . Se mostró amplificación en los ensayos con *Staphylococcus aureus*, *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis* y *Listeria monocytogenes* a ciclos tardíos (29.07-29.83), las muestras de ADN de estos microorganismos no poseen el gen a amplificar; por lo tanto los valores de Ct obtenidos representan un valor negativo para la presencia del gen endógeno de *Salmonella* spp. La amplificación a ciclos tardíos se considera negativa, debido a que es una amplificación inespecífica la cual genera una curva atípica, sin embargo es común debido a la gran cantidad de número de ciclos utilizados en la PCR en tiempo real.

En el análisis para los genes específicos para *Salmonella enterica* Enteritidis y Typhimurium (Tabla 13) no se observó amplificación alguna. Debido a la ausencia de este gen en las bacterias analizadas.

Debido a que se obtuvo amplificación tardía con cepas puras de bacterias diferentes a *Salmonella* spp. con el gen endógeno del género estudiado y para conocer el límite de detección del método, se decidió realizar el análisis de una muestra de queso inoculada con una concentración conocida de *Salmonella* considerando la etapa de enriquecimiento.



## 7.5. DETECCIÓN DE UN INÓCULO DE CONCENTRACIÓN CONOCIDA

Se realizaron estos experimentos con la finalidad de analizar los valores de Ct obtenidos con una muestra de queso Cotija inoculada con concentración conocida al realizar el enriquecimiento, esto nos permitirá verificar el efecto de esta etapa durante la detección de *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* Enteritidis y *enterica* Typhimurium.

El objetivo de la etapa de enriquecimiento es aumentar el número de bacterias hasta niveles detectables. El enriquecimiento debe permitir la activación de las bacterias vivas y por consiguiente su multiplicación hasta un número detectable por la metodología utilizada. A pesar de conocer la importancia y necesidad de esta etapa en la detección de patógenos en alimentos es necesario conocer el patrón de amplificación o valor Ct que presentará la muestra en caso de ser positiva para las bacterias en estudio, además nos permite verificar la eficiencia de las condiciones de enriquecimiento (37°C, 24 h, 250 rpm) debido al medio utilizado (agua peptonada tamponada) el enriquecimiento no es selectivo por tal razón puede crecer además de *Salmonella* spp. otras bacterias como *Staphylococcus aureus*.

En la Tabla 14 se muestran los resultados de cuenta en placa de BHI, éstos señalan la cantidad de inóculo que se añadió a las muestras de queso Cotija para este experimento. La muestra utilizada es ausente de *Salmonella* spp. Los resultados de la placa se refieren a las UFC presentes en un mL de la dilución  $10^{-8}$  de cada una de las cepas. De la cual se agregó un mL antes de realizar la etapa de enriquecimiento de la muestra de queso Cotija.



Considerando la cantidad de muestra utilizada para cada análisis (25 g de muestra) y diluciones realizadas, podemos determinar la cantidad de UFCs inoculadas equivalentes por gramo de muestra a analizar. Esto nos permite saber el límite de detección de la metodología analizada directamente en la muestra.

Tabla 14. UFCs de las cepas puras inoculadas en mL de dilución ( $10^{-8}$ ) y por gramo de muestra a analizar.

<b><i>Salmonella enterica</i> Enteritidis</b>	<b><i>Salmonella enterica</i> Typhimurium</b>
2 UFC/mL de dilución	1 UFC/mL de dilución
8 UFC/g de queso Cotija	4 UFC/g de queso Cotija

En la Tabla 15 se muestran los valores de Ct para el gen específico para *Salmonella* spp. obtenidos para controles positivos, control de matriz y quesos inoculados con concentración conocida de inóculo.

De acuerdo a la tabla 13, Figura 15 y Figura 16, el resultado obtenido para control positivo es cercano a los ensayos previamente realizados para el gen específico para *Salmonella* spp. (Tabla 10). En el caso del control de matriz inoculado con 1 UFC *Salmonella* Typhimurium (4 UFC *S. Typhimurium*/g queso) y el análisis realizado con inóculo de 2 UFC de *S. Enteritidis* (8 UFC *S. Enteritidis*/g queso), ambos ensayos mostraron que el valor de Ct disminuyó respecto a una muestra negativa para *Salmonella* spp., de tal manera que se encuentra cercano a los presentados por ADN de la cepa pura. Esto nos indica que en caso de estar presente *Salmonella* spp. en la muestra de queso en concentración de 1 UFC ó 2 UFC y se encuentre viva en la etapa previa al enriquecimiento, es posible su detección debido a la multiplicación de células durante la etapa de





enriquecimiento, verificando así la eficiencia de ésta y de las condiciones utilizadas de acuerdo a la NOM 114-SSA1-1994. Además corroborar que el valor de Ct esperado para una muestra positiva para *Salmonella* spp. debe ser cercano al obtenido por la cepa pura con el gen endógeno para *Salmonella* spp. ( valores cercanos a 13-15).

Considerando las UFC inoculadas de cada serovariedad analizada, la cantidad mínima que se pudo detectar con la metodología empleada para la PCR tiempo real con los tres genes a analizar es del orden de magnitud de 1 a 10 UFC/g de queso Cotija para detección de *S. Typhimurium* y de *S. Enteritidis*.

Tabla 15. Valores de los promedios de Ct obtenidos para gen específico para *Salmonella* spp.

Muestra	Ct
Control positivo: <i>Salmonella</i> Enteritidis	13.58 ± 0.05
Q.Cotija inoculado con 4 UFC <i>S. Typhimurium</i> /g queso con enriquecimiento	13.78 ± 0.27
Q. Cotija inoculado con 8 UFC <i>S. Enteritidis</i> /g queso con enriquecimiento	14.77 ± 0.05
Q.Cotija con 4 UFC <i>S. Typhimurium</i> /g queso	24.00 ± 0.70
Q. Cotija con 8 UFC <i>S. Enteritidis</i> /g queso	23.69 ± 0.67
CONTROL DE MATRIZ : Q.Cotija sin inocular	NA

\* Se muestra los valores promedio de Ct, cada ensayo se realizó por duplicado  
NA = No hubo amplificación

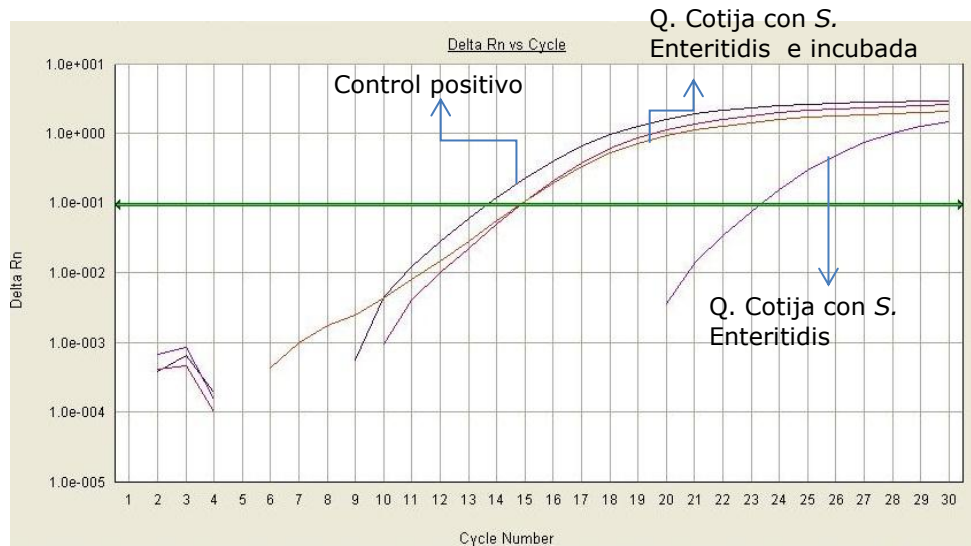


Figura 15. Amplificación por PCR tiempo real del gen específico para *Salmonella* spp., muestras: ADN cepa pura de *Salmonella* Enteritidis, Q. Cotija inoculado con 8 UFC *S. Enteritidis*/g queso con enriquecimiento, Q. Cotija con 8 UFC *S. Enteritidis*/g queso y control de matriz.

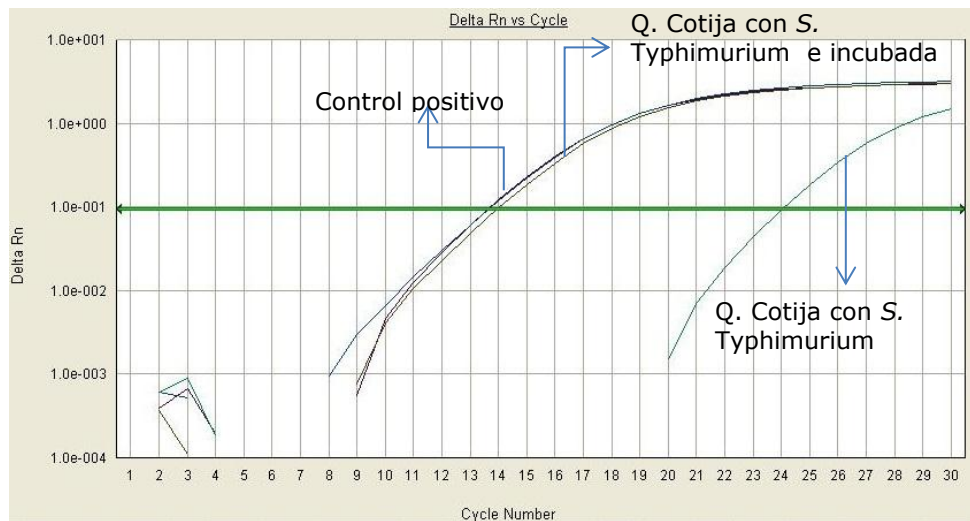


Figura 16. Amplificación por PCR tiempo real del gen específico para *Salmonella* spp., muestras: ADN cepa pura de *Salmonella* Enteritidis, Q. Cotija inoculado con 4 UFC *S. Typhimurium*/g queso con enriquecimiento, Q. Cotija con 4 UFC *S. Typhimurium*/g queso y control de matriz.



En la Tabla 16, se muestran los valores de Ct obtenidos para el gen específico para *Salmonella enterica* Enteritidis, tanto en cepa pura, queso Cotija inoculado y control de matriz. Los valores obtenidos por la muestra de queso Cotija inoculado con 2 UFC *Salmonella* Enteritidis e incubado amplificaron a un Ct cercano al presentado por el control positivo (cepa pura de *Salmonella* Enteritidis). Esto coincide con los obtenidos en experimentos anteriores (tabla 12) para cepa pura y queso Cotija con *S. Enteritidis* inactiva. En este experimento el control de matriz no mostró amplificación (figura 17), (valor negativo para *Salmonella enterica* Enteritidis) por lo que la muestra elegida como control negativo es libre de la bacteria en estudio. Además se observó que en caso de tener 2 UFC de la bacteria es posible detectarla a un Ct similar al de la cepa pura debido al efecto de la etapa de enriquecimiento. Esto verifica que teniendo un mínimo de 8 UFC *S. Enteritidis*/g queso la metodología planteada es capaz de detectar un resultado positivo. Por lo tanto la cantidad mínima de UFCs que se pueden detectar también entra en el rango de 1 a 10 UFC/g de queso.

Tabla 16. Valores de los promedios de Ct obtenidos para gen específico para *Salmonella* Enteritidis.

Muestra	Ct
Control positivo: <i>Salmonella</i> Enteritidis	13.74 ± 0.30
Q. Cotija inoculado con 8 UFC <i>S. Enteritidis</i> /g queso con enriquecimiento	14.03 ± 0.20
Q. Cotija con 8 UFC <i>S. Enteritidis</i> /g queso	25.59 ± 0.01
CONTROL DE MATRIZ : Q.Cotija sin inocular	28.50 ± 0.07

\* Se muestra los valores promedio de Ct, cada ensayo se realizó por duplicado

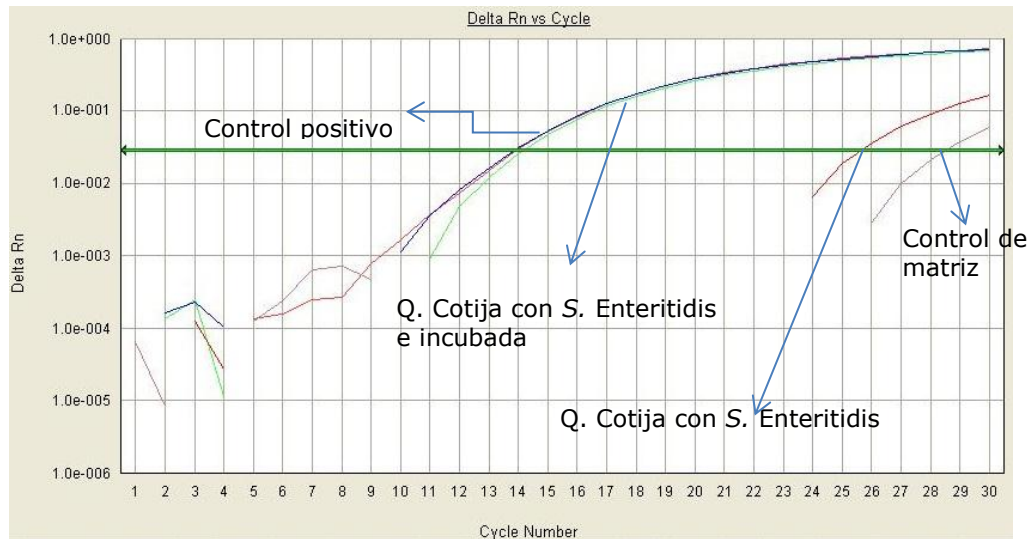


Figura 17. Amplificación por PCR tiempo real del gen específico para *Salmonella* Enteritidis, muestras: ADN cepa pura de *Salmonella* Enteritidis, Q. Cotija inoculado con 8 UFC *S. Enteritidis*/g queso con enriquecimiento, Q. Cotija con 8 UFC *S. Enteritidis*/g queso y control de matriz.

En la Tabla 17, se muestran los valores de Ct obtenidos para gen específico para *Salmonella* Typhimurium tanto en cepa pura, queso Cotija inoculado y control de matriz. Los valores obtenidos por la muestra de queso Cotija inoculado con 1 UFC *Salmonella* Typhimurium e incubado, amplificaron a un Ct cercano al presentado por el control positivo (cepa pura de *Salmonella* Typhimurium). En este experimento el control de matriz no mostró amplificación (valor negativo para *Salmonella enterica* Typhimurium).

Además se observó (Figura 18) que en caso de tener 1 UFC de la bacteria es posible detectarla a un Ct similar al de la cepa pura debido al efecto de la etapa de enriquecimiento. Esto verifica que teniendo un mínimo de 4 UFC *S. Typhimurium* /g queso la metodología planteada es capaz de detectar un resultado positivo.



De acuerdo a los resultados obtenidos para los 3 genes acerca del efecto de la etapa de enriquecimiento, se asegura que en caso de presencia de la bacteria en bajas concentraciones su detección es posible.

Tabla 17. Valores de los promedios de Ct obtenidos para gen específico para *Salmonella* Typhimurium.

Muestra	Ct
Control positivo: <i>Salmonella</i> Typhimurium	13.01 ± 0.50
Q.Cotija inoculado con 4 UFC <i>S. Typhimurium</i> /g queso con enriquecimiento	13.05 ± 0.01
Q.Cotija con 4 UFC <i>S. Typhimurium</i> /g queso	23.75 ± 0.21
CONTROL DE MATRIZ : Q.Cotija sin inocular	NA

\* Se muestra los valores promedio de Ct, cada ensayo se realizó por duplicado  
NA = No hubo amplificación

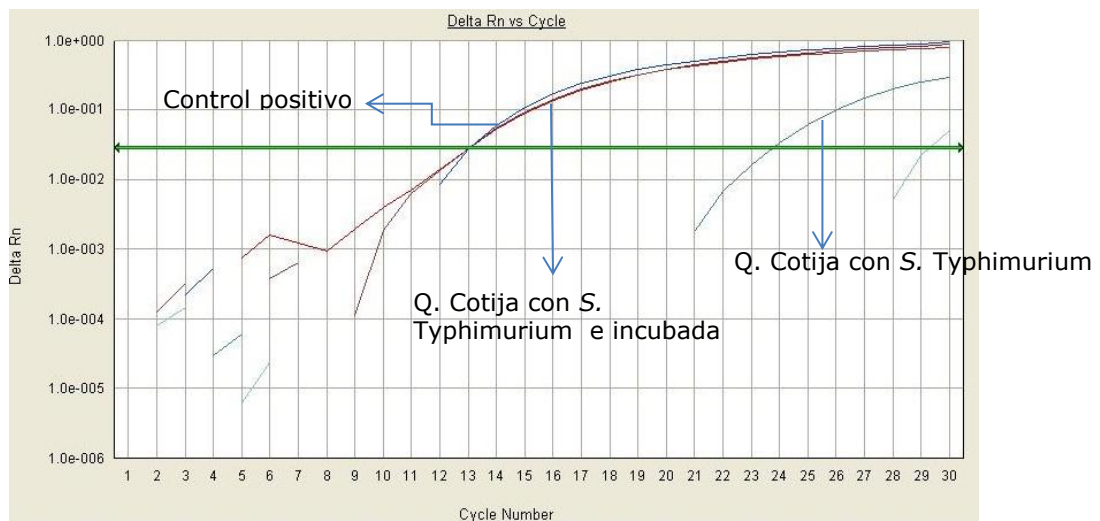


Figura 18. Amplificación por PCR tiempo real del gen específico para *S. Typhimurium*, muestras: ADN cepa pura de *Salmonella* Typhimurium, Q.Cotija inoculado con 4 UFC *S. Typhimurium*/g queso con enriquecimiento, Q.Cotija con 4 UFC *S. Typhimurium*/g queso y control de matriz.



## 7.6. ANÁLISIS DE MUESTRAS DE QUESO COTIJA

Se realizó un análisis visual de cada muestra al momento de la recepción, así como al momento del procesamiento, realizándose un registro de las muestras con presencia de materia extraña. En la tabla 19 se muestra la materia extraña y características inusuales presente en la parte interna del queso y el número de muestras en las que se encontró. El 91.6% de las muestras analizadas no contiene materia extraña, por lo que poseen aspecto y color característico del queso Cotija.

En la tabla 18 se muestran las encontradas en la corteza, a pesar de que esta zona del queso Cotija no forma parte de la muestra debido a que no es consumida, es importante que el producto alimenticio en su totalidad esté ausente de materia extraña.

Tabla 18. Materia extraña encontrada y características inusuales en la corteza de las muestras de queso Cotija.

<b>Materia extraña encontrada</b>
Astillas de madera
Cabello
Corteza verdosa
Hongos (manchas color blanco y verde)
Manchas naranjas
Manchas negras
Manchas rosas
Papel estraza



Tabla 19. Materia extraña y características inusuales encontradas al interior de las muestras de queso Cotija.

<b>Materia extraña encontrada</b>
Astillas de madera
Cabello
<b>Fibra de escobillón</b>
Hilo
Hongos (manchas color blanco y verde)
Insecto
Manchas café
Manchas naranjas
Manchas negras
Manchas rosa

La Tabla 20, muestra los resultados obtenidos en las 95 muestras procedentes de la región de la zona de JalMich con el gen de tamizaje para determinar ausencia o presencia de *Salmonella* spp. En el anexo 8 se muestran las gráficas de amplificación de las muestras analizadas para el gen endógeno de *Salmonella* spp. Para el análisis de las 95 muestras se realizó el procedimiento descrito en los puntos 6.4, 6.6 al 6.10.2 del capítulo de Metodología.



Tabla 20. Resultados obtenidos de las muestras de queso Cotija para el gen específico para *Salmonella* spp.

Muestra	Ct	<i>Salmonella</i> spp.	$a_w$
Q.C -1	NA	Negativo	0.890 ± 0.0064
Q.C -2	NA	Negativo	0.883 ± 0.0063
Q.C -3	NA	Negativo	0.890 ± 0.0028
Q.C -4	NA	Negativo	0.858 ± 0.0311
Q.C -5	NA	Negativo	0.854 ± 0.0007
Q.C -6	NA	Negativo	0.877 ± 0.0035
Q.C -7	NA	Negativo	0.889 ± 0.0007
Q.C -8	NA	Negativo	0.892 ± 0.0007
Q.C -9	NA	Negativo	0.891 ± 0.0064
Q.C -10	NA	Negativo	0.870 ± 0.0035
Q.C -11 *	24.76 ± 0.85	Negativo	0.860 ± 0.0021
Q.C -12 *	23.54 ± 0.14	Negativo	0.867 ± 0.0007
Q.C -13 *	25.23 ± 0.90	Negativo	0.857 ± 0.0028
Q.C -14 *	23.85 ± 0.21	Negativo	0.885 ± 0.0049
Q.C -15 *	26.03 ± 0.52	Negativo	0.890 ± 0.0007
Q.C -16 *	24.75 ± 0.37	Negativo	0.892 ± 0.0021
Q.C -17 *	23.78 ± 0.15	Negativo	0.899 ± 0.0057
Q.C -18 *	24.17 ± 0.49	Negativo	0.888 ± 0.0021
Q.C -19 *	27.93 ± 0.63	Negativo	0.889 ± 0.0057
Q.C -20 *	26.17 ± 0.63	Negativo	0.869 ± 0.0028
Q.C -21	NA	Negativo	0.870 ± 0.0021
Q.C -22	NA	Negativo	0.877 ± 0.0007
Q.C -23	NA	Negativo	0.864 ± 0.0057
Q.C -24	NA	Negativo	0.890 ± 0.0049
Q.C -25	NA	Negativo	0.852 ± 0.0163
Q.C -26	NA	Negativo	0.894 ± 0.0007
Q.C -27	NA	Negativo	0.883 ± 0.0000
Q.C -28	NA	Negativo	0.872 ± 0.0028
Q.C -29	NA	Negativo	0.897 ± 0.0035
Q.C -30	NA	Negativo	0.904 ± 0.0049
Q.C -31	NA	Negativo	0.869 ± 0.0014
Q.C -32	NA	Negativo	0.910 ± 0.0042
Q.C -33	NA	Negativo	0.865 ± 0.0000
Q.C -34	NA	Negativo	0.890 ± 0.0057
Q.C -35	NA	Negativo	0.905 ± 0.0028
Q.C -36	NA	Negativo	0.919 ± 0.0297
Q.C -37	NA	Negativo	0.912 ± 0.0057
Q.C -38	NA	Negativo	0.865 ± 0.0064
Q.C -39	NA	Negativo	0.904 ± 0.0021
Q.C -40	NA	Negativo	0.899 ± 0.0021
Q.C -41	NA	Negativo	0.885 ± 0.0071





Q.C -42	NA	Negativo	0.909 ± 0.0014
Q.C -43	NA	Negativo	0.830 ± 0.0014
Q.C -44	NA	Negativo	0.832 ± 0.0049
Q.C -45	NA	Negativo	0.881 ± 0.0028
Q.C -46	NA	Negativo	0.887 ± 0.0085
Q.C -47	NA	Negativo	0.884 ± 0.0014
Q.C -48	NA	Negativo	0.874 ± 0.0028
Q.C -49	NA	Negativo	0.859 ± 0.0014
Q.C -50	NA	Negativo	0.833 ± 0.0000
Q.C -51	NA	Negativo	0.847 ± 0.0021
Q.C -52	NA	Negativo	0.876 ± 0.0014
Q.C -53	NA	Negativo	0.846 ± 0.0000
Q.C -54	NA	Negativo	0.893 ± 0.0014
Q.C -55	NA	Negativo	0.864 ± 0.0085
Q.C -56	NA	Negativo	0.844 ± 0.0028
Q.C -57	NA	Negativo	0.831 ± 0.0000
Q.C -58	NA	Negativo	0.884 ± 0.0049
Q.C -59	NA	Negativo	0.877 ± 0.0028
Q.C -60	NA	Negativo	0.875 ± 0.0007
Q.C -61	NA	Negativo	0.782 ± 0.0092
Q.C -62	NA	Negativo	0.894 ± 0.0014
Q.C 63	NA	Negativo	0.894 ± 0.0057
Q.C -64	NA	Negativo	0.889 ± 0.0000
Q.C -65	NA	Negativo	0.880 ± 0.0042
Q.C -66	NA	Negativo	0.879 ± 0.0014
Q.C -67	NA	Negativo	0.893 ± 0.0000
Q.C -68	NA	Negativo	0.873 ± 0.0035
Q.C -69	NA	Negativo	0.896 ± 0.0007
Q.C -70	NA	Negativo	0.868 ± 0.0007
Q.C -71	NA	Negativo	0.866 ± 0.0049
Q.C -72	NA	Negativo	0.825 ± 0.0021
Q.C -73	NA	Negativo	0.879 ± 0.0007
Q.C -74	NA	Negativo	0.812 ± 0.0021
Q.C -75	NA	Negativo	0.829 ± 0.0014
Q.C -76	NA	Negativo	0.877 ± 0.0007
Q.C -77	NA	Negativo	0.887 ± 0.0014
Q.C -78	NA	Negativo	0.837 ± 0.0007
Q.C -79	NA	Negativo	0.860 ± 0.0014
Q.C -80	NA	Negativo	0.889 ± 0.0000
Q.C -81	NA	Negativo	0.831 ± 0.0007
Q.C -82	NA	Negativo	0.896 ± 0.0035
Q.C -83	NA	Negativo	0.905 ± 0.0014
Q.C -84	NA	Negativo	0.818 ± 0.0000
Q.C -85	NA	Negativo	0.833 ± 0.0071
Q.C -86	NA	Negativo	0.854 ± 0.0028



Q.C -87	NA	Negativo	0.877 ± 0.0021
Q.C -88	NA	Negativo	0.818 ± 0.0007
Q.C -89	NA	Negativo	0.880 ± 0.0007
Q.C -90	NA	Negativo	0.836 ± 0.0028
Q.C -91	NA	Negativo	0.830 ± 0.0007
Q.C -92	NA	Negativo	0.793 ± 0.0078
Q.C -93	NA	Negativo	0.864 ± 0.0035
Q.C -94	NA	Negativo	0.855 ± 0.0021
Q.C -95	NA	Negativo	0.852 ± 0.0042

**\*Se detectó la presencia de ADN de *Salmonella* spp.**

Se muestra los valores promedio de Ct, cada ensayo se realizó por cuadruplicado.

NA= No hubo amplificación

Las muestras 11 a 20 mostraron amplificación en los ensayos para la detección del gen endógeno para *Salmonella* spp., sin embargo no poseen un Ct cercano a los obtenidos con la cepa pura viable. Debido al efecto ya analizado de esta etapa, se espera que en caso de presencia de la bacteria incluso en bajas concentraciones, el valor de Ct obtenido sea aproximadamente 10 ciclos menor al obtenido por las muestras mencionadas. Y dado a que son ciclos logarítmicos la concentración detectada es pequeña después de haber realizado la etapa de enriquecimiento. Por lo tanto son consideradas como negativas para *Salmonella* spp. Sin embargo los valores de Ct obtenidos de las muestras 11 a 20 son cercanos a los obtenidos por muestras de Q.Cotija con 1 UFC y 2 UFC de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* respectivamente (Tabla 15), esto nos indica que se detectó la presencia de ADN de *Salmonella* spp. que no fue capaz de crecer o aumentar el número de bacterias mediante la etapa de enriquecimiento.

No obstante se realizó la reacción dúplex para identificar la presencia del gen específico para *S. Enteritidis* y el específico para *S. Typhimurium*, dado que obtuvimos resultado negativo para *Salmonella* spp. estos



experimentos servirán para confirmar la ausencia de *Salmonella enterica* Enteritidis y Typhimurium.

La Tabla 21 muestra los valores de Ct obtenidos por las muestras analizadas en la reacción dúplex. En estos se muestra que no hubo amplificación del gen específico para *S. Enteritidis* en ninguna de las muestras.

En cambio, para las muestras 11, 12, 14, 15, 16, 17 y 18 se obtuvieron valores de Ct para el gen específico para *S. Typhimurium* cercanos a los obtenidos por muestras de Q.Cotija con 2 UFC de *S. Typhimurium* (Tabla 20), esto nos indica que se detectó la presencia de ADN de *Salmonella Typhimurium* que no fue capaz de crecer mediante la etapa de enriquecimiento.

Todos los quesos mostraron valores de  $a_w$  menores al mínimo requerido por *Salmonella* spp. para su sobrevivencia, los valores de  $a_w$  finales del alimento (después de la maduración) disminuyen la probabilidad de sobrevivencia de *Salmonella* spp. en caso de haber estado presente en algún momento de la elaboración o materia prima.

El proceso de maduración es de gran importancia en el aseguramiento de la inocuidad del queso, ya que los microorganismos presentes desempeñan un papel importante durante el proceso de elaboración y la maduración, estos transforman la lactosa en ácido láctico contribuyendo así en el aumento de la acidez, que funciona como un agente inhibidor de cierta población microbiana. Además de que la microbiota presente en el queso produce bacteriocinas y diversos compuestos provenientes de reacciones de proteólisis, lipólisis y glicólisis que contribuyen a la inocuidad y propiedades organolépticas del producto.

Tabla 21. Valores de Ct obtenidos para las muestras 11 a 20 para los genes específicos para *S. Enteritidis* y *Typhimurium*.

<b>Muestra</b>	<b>Ct Gen específico para <i>S. Enteritidis</i></b>	<b>Ct Gen específico para <i>S. Typhimurium</i></b>	<b><i>Salmonella</i> Enteritidis</b>	<b><i>Salmonella</i> Typhimurium</b>
Q.C - 11	NA	27.76 ± 0.10	Negativo	Negativo
Q.C - 12	NA	26.95 ± 0.10	Negativo	Negativo
Q.C - 13	NA	29.42 ± 0.10	Negativo	Negativo
Q.C - 14	NA	25.29 ± 0.01	Negativo	Negativo
Q.C - 15	NA	26.37 ± 0.20	Negativo	Negativo
Q.C - 16	NA	26.09 ± 0.50	Negativo	Negativo
Q.C - 17	NA	25.22 ± 0.01	Negativo	Negativo
Q.C - 18	NA	24.07 ± 0.50	Negativo	Negativo
Q.C - 19	NA	NA	Negativo	Negativo
Q.C - 20	NA	NA	Negativo	Negativo
C(+) <i>S. Enteritidis</i>	13.32 ± 0.30	NA	Positivo	Negativo
C(+) <i>S. Typhimurium</i>	NA	12.05±0.50	Negativo	Positivo



## 7.7. PCR PUNTO FINAL

### Región V<sub>3</sub> del gen ribosomal 16s

Se realizó la PCR para amplificar la región V<sub>3</sub> del gen ribosomal 16s de 25 muestras al azar de ADN procedentes de los quesos Cotija analizados, debido a que esta región es característica del ADN bacteriano. El tamaño del amplicón buscado es de 180 pb. De esta manera al haber encontrado que la PCR amplificó esta región mediante la visualización en el gel de agarosa 2% por electroforesis, se comprueba que se realizó la extracción de ADN de bacterias. Esto con la finalidad de corroborar que contamos con muestras de ADN amplificable de microorganismos presentes en los quesos Cotija analizados.

En todos los PCR se realizó un blanco de muestra, este funciona como un control negativo. Ya que debido al uso de H<sub>2</sub>O para biología molecular (Destilada, desionizada, filtrada y estéril) no se debe obtener amplificación. Además nos indica la pureza del resto de los reactivos utilizados para la PCR, en caso de obtener algún producto, nos indica posible contaminación de cebadores, H<sub>2</sub>O, dNTP's, Buffer o Pfu.

En el caso de los análisis de PCR punto final realizados, los blancos no muestran amplificación, por lo que no se presentó contaminación alguna, todos los controles positivos mostraron amplificación de la región buscada. Se analizaron las muestras de queso Cotija QC- 1, 3, 5, 6, 10, 21, 22, 25, 30, 38, 43, 47, 53, 59, 60, 63, 67, 72, 78, 80, 83, 86, 90, 92, 95.

Para todos los ADN de muestras de queso Cotija analizados por PCR, se presentaron bandas de 180 pb en gel de agarosa 2%, éstas correspondientes al amplicón buscado (región V<sub>3</sub>). Confirmando así que el ADN extraído de las muestras de queso Cotija corresponden a



microorganismos y que los resultados obtenidos son realmente negativos y no son falsos negativos.

En la Figura 19 se muestra el gel de agarosa 2%, para las muestras de queso Cotija 1, 3, 5, 6 y 10. Los gels correspondientes al resto de las muestras se encuentran en el Anexo 9.

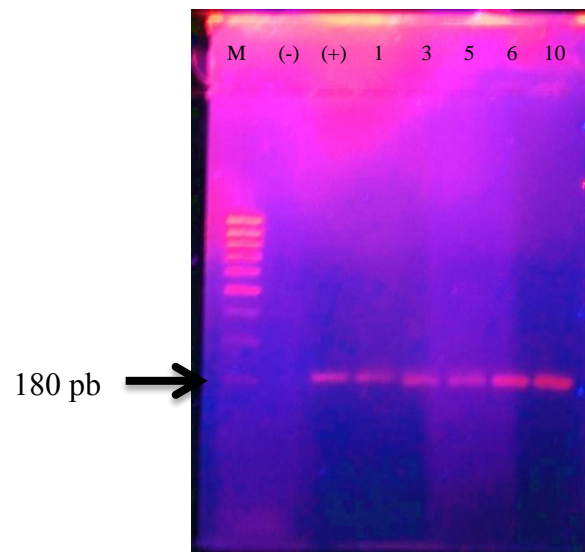


Figura 19. Gel de electroforesis de los amplicones obtenidos de la PCR de la región  $V_3$  del gen 16s; agarosa 2 %. B: blanco de muestra, M: Marcador de peso molecular MassRuler Low range, (-): Control negativo, (+): Control positivo: *Salmonella* entérica Enteritidis cepa pura, 1: queso Cotija QC-1, 3: queso Cotija QC-3, 5: queso Cotija QC-5, 6: queso Cotija QC-6, 10: queso Cotija QC-10.



La metodología de detección y enriquecimiento es adecuada, ya que a pesar de la utilización de un medio no selectivo para *Salmonella* spp., permite el crecimiento de la bacteria en estudio, además de que ésta posee adaptabilidad y resistencia al estrés.

De acuerdo a las pruebas de especificidad realizadas para los juegos de cebadores y sondas elegidos para la identificación de los genes específicos para *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* Enteritidis y *Salmonella enterica* Typhimurium, es posible, mediante la metodología planteada la detección de estas cepas en la matriz alimenticia analizada: queso Cotija.

La determinación de la calidad microbiológica de los alimentos es de gran importancia ya que forma parte de su calidad integral e inocuidad.

Las muestras analizadas si bien son elaboradas bajo las BPM (Buenas Prácticas de Manufacturas) y las condiciones higiénicas mencionadas en las reglas de uso de la Marca colectiva queso Cotija Región de origen como en la NMX-F-735-COFOCALEC-2011 (Queso Cotija artesanal madurado, denominación, especificaciones y métodos de prueba), la materia prima utilizada no contempla algún tratamiento térmico. Esto implica un punto crítico en la inocuidad del alimento. Sin embargo el proceso de maduración es de gran importancia para el aseguramiento de la calidad de producto.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se concluye que el queso Cotija es seguro para su consumo respecto a la ausencia de *Salmonella* spp.



## 8. CONCLUSIONES

- El juego de cebadores para el gen endógeno de *Salmonella* spp. permitió la correcta detección de la bacteria en estudio.
- El juego de cebadores utilizado que tiene como blanco un gen específico para *S. Enteritidis*, permitieron la detección de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis tanto en cepas puras como en quesos Cotija inoculados.
- El juego de cebadores utilizado que tiene como blanco un gen específico para *S. Typhimurium*, permitieron la detección de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium tanto en cepas puras como en quesos Cotija inoculados.
- La detección y diferenciación entre *Salmonella enterica* serovar Enteritidis y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium fue posible mediante una técnica PCR tiempo real dúplex en cepas puras y quesos inoculados.
- La etapa de enriquecimiento es esencial para la correcta detección de *Salmonella* spp. viable por medio de la metodología planteada.
- La cantidad mínima de detección mediante la metodología es de 1 a 10 UFC *Salmonella* spp./g queso.
- El 91.6% de las muestras analizadas tuvieron el aspecto y color característico.
- Las 95 muestras de queso Cotija analizadas, no presentan contaminación por *Salmonella* spp, *Salmonella enterica* Enteritidis ni Typhimurium.





## **ANEXO**

### **Anexo 1**

#### **Procesamiento de muestras de Queso Cotija**

- Recepción de las muestras

Las muestras se recibieron como pedazos de queso con corteza, de peso aproximado de 1 kg dentro de bolsas ziploc, etiquetadas.

1. Realizar análisis visual de cada muestra realizándose un registro de las muestras con características inusuales y materia extraña presente visible al momento de la recepción.
2. Guardar en refrigeración para posteriormente realizar el procesamiento de la muestra.
3. El procesamiento de la muestra se realiza en zona aséptica dentro de la campana de flujo laminar, después de procesar cada muestra se debe limpiar y desinfectar con etanol al 75%

- Limpieza del material a usar

(Cucharas, cuchillos, tabla para picar, cuchilla del procesador y procesador)

1. Lavar con agua y jabón, después limpiar con hipoclorito de sodio al 20% y etanol al 75%.
2. Exponer a UV durante 5 min, se deben considerar 5 min para un lado de la superficie del material y posteriormente voltear y exponer la superficie restante.

- Procesamiento

1. Quitar corteza con cuchillo específico para retirar esta área de la muestra, separar del resto de la muestra evitando contacto con zona interna.



2. Cortar con un cuchillo previamente esterilizado la parte interna en fragmentos.
3. Usar el procesador para homogeneizar y triturar los fragmentos de queso.
4. Guardar el queso ya procesado en bolsas ziploc para congelar (Revco, -70°C)
5. Pesar 4 bolsas con 25 g de cada muestra y se guardaron dentro del Revco, esto para evitar descongelar la muestra en su totalidad para su uso en la metodología posterior.

## **Anexo 2**

### **Recuperación del paquete celular a partir del queso.**

Las muestras de queso Cotija se descongelaron en refrigeración a 4 °C por no más de 18 h según lo establecido en la norma NOM-110-SSA1-1994 antes de ser utilizadas.

Posteriormente se seguirá el siguiente procedimiento experimental:

1. Colocar 25 g de la muestra dentro de bolsas para Stomacher (Seward).
2. Adicionar 225 mL de Citrato de Sodio al 2%, pH 8.
3. Adicionar 1 mL de solución de neutrasas (Novo Nordisk). Se incubó durante 1 h a 45°C.
4. Homogenizar durante 5 min a alta velocidad dentro del Stomacher (Seward).
5. Transferir 40 mL del homogenizado a tubos falcon estériles.
6. Centrifugar a 1500 x g durante 10 min a 4 °C.
7. Tomar 2.5 mL de la fase intermedia atravesando la capa de grasa. Transferir a 25 mL de agua de peptona tamponada (medio de enriquecimiento NOM 114-SSA1-1994).



8. Incubar a 37°C, 250 rpm durante 24 hrs.
9. Inactivar por calor, calentar los tubos falcon en baño a 80°C por 20min.
10. Centrifugar a 10,000 x g, durante 10 minutos a 4°C.
11. Lavar el pellet 3 veces con 200 mL de solución salina pH 7 (0.85% NaCl) estéril.
12. Resuspender el pellet en 500 mL de solución salina pH 7 (0.85% NaCl) estéril, homogenizar en vortex durante 1 min y transferir a un tubo Eppendorf de 2 mL estéril.
13. Centrifugar a durante 10 min a 10,000 x g a 4 °C, descartar el sobrenadante.
14. Conservar el paquete celular para la posterior extracción de ADN mediante Fast ID Kit.

### **Evaluación del kit de extracción y purificación de ADN**

#### **Anexo 3**

Inactivar el cultivo de cepa pura en agua peptonada tamponada (obtenido en el punto 6.5.2), calentando el medio a 80°C, 20 min, y se transfirieron 25 mL del cultivo desactivado a un tubo Falcon estéril.

1. Centrifugar a 10,000 x g durante 5 min. Eliminar la fase acuosa.
2. Lavar el pellet celular con 500 µL de solución salina estéril pH 7. Centrifugar a 10,000 x g durante 5 min. Eliminar la fase acuosa (solución salina)
3. Resuspender el pellet celular en 5 mL de solución salina estéril.
4. Conservar el paquete celular para la posterior extracción de ADN mediante el kit Fast ID.



#### **Anexo 4**

Se realizó por separado la inoculación de *Salmonella enterica* Enteritidis y Thypimurium.

Partir del medio con cada microorganismo ya crecido en agua peptonada tamponada (obtenido en el punto 6.5.2).

1. Realizar los pasos 1 al 4 del Anexo 2.
2. Añadir los 5 mL de solución salina en los que se resuspendió el pellet con el microorganismo.
3. Realizar los puntos 3 al 14 de la metodología del anexo 2.

#### **Anexo 5**

##### **Extracción de ADN mediante Fast ID kit**

1. Diluir la proteinasa K en 2 mL o 500  $\mu$ L de agua grado biología molecular, a fin de obtener una solución 10 mg / mL. Este reactivo deberá guardarse en refrigeración entre cada uso (2-8°C).
2. Concentrar el pellet celular en un tubo para centrifuga de 2 mL, agregar 1mL de Buffer de Lisis, 3  $\mu$ L de Lisozima (1 mg/mL) y 10  $\mu$ L de Proteinasa K. Nota: A bajas temperaturas el buffer de lisis tiende a cristalizar, si esto ocurre, deberá colocarse algunos minutos a temperatura entre 20 y 30°C hasta que desaparezca la turbidez.
3. Agitar vigorosamente en el vortex hasta diluir completamente e incubar a 65°C durante 30 minutos/600 rpm (thermomixer)
4. Agregar 750  $\mu$ L de cloroformo y agitar vigorosamente en el vortex.
5. Centrifugar a 10,000 x g, 5 min.
6. Tomar 500  $\mu$ L de la fase superior, sin tocar la capa intermedia y pasarlos a otro tubo para centrifuga de 2 mL.
7. Agregar un 500  $\mu$ L de Buffer de unión y agitar en el vortex brevemente.



8. Centrifugar a 10,000 x g por 5 min.
9. Pasar el sobrenadante a través de una de las columnas para retención de ADN mediante centrifugación o bien utilizando el equipo de vacío manifold.
10. Lavar con 800 µL de solución de lavado si se usa la centrifuga, o bien con 100 µL si se usa el manifold.
11. Realizar tres lavados con 1,000 µL EtOH al 75% o con 800 µL si se usa centrifugación.
12. Dejar secar todo el EtOH antes de retirar la columna o centrifugar a 10,000 x g por algunos segundos.
13. Colocar la columna en un tubo nuevo para centrifuga de 1.6 mL y agregar 50 µL de Buffer TE 1X (medio de elución) previamente calentado a 65°C.
14. Dejar reposar a 65°C durante 10 minutos
15. Centrifugar 30 seg. a 10,000 x g, para eluir y colectar el ADN. Añadir de nuevo 50 µL de buffer TE.
16. Conservar el ADN colectado a -20°C.

## **Anexo 6**

### **Análisis del queso con inóculo de concentración conocida y recuperación del paquete celular.**

Se realizó por separado para cada cepa (*Salmonella* Enteritidis y Typhimurium)

#### **a) Obtención del inóculo y cuenta de UFC.**

Partir de un cultivo de las cepas puras en agar BHI, obtenido mediante un inóculo de agar Lauril (del punto 6.5.1).



1. Tomar una colonia de aproximadamente 3 mm de diámetro y resuspenderla en 10 mL de solución salina estéril (al 0.85%). Utilizar para ello tubos Falcon estériles con tapón de rosca de 15 mL.
2. Agitar durante 15 s a velocidad alta en el vórtex (Dilución  $10^{-1}$ ).
3. Tomar un mililitro de la dilución anterior y resuspender en 9 mL de solución salina. Agitar de la misma forma (Dilución  $10^{-2}$ ).
4. Continuar de la misma manera hasta la dilución  $10^{-8}$ .
5. Tomar 1ml de la disolución  $10^{-8}$  y colocarla en una placa petri estéril. Verter enseguida de 12 a 15 mL de agar BHI estéril. Homogenizar bien antes de que gelifique (6 movimientos ascendentes y descendentes, 6 movimientos circulares en dirección de las manecillas del reloj, 6 movimientos circulares en dirección contraria a las manecillas del reloj y, 6 movimientos hacia los lados). Realizar por duplicado.
6. Incubar las placas en forma invertida durante el tiempo correspondiente.

## **b) Inoculación de los Quesos**

7. Elegir una muestra presuntivamente negativa y descongelarla un día antes del análisis. Mantener en refrigeración.
8. Realizar los pasos del 1 al 7 del anexo 2, por duplicado.
9. En cada tubo se inocula 1mL de la dilución  $10^{-8}$  previamente homogenizada.
10. Incubar los tubos a 37°C, 24 h, 250 rpm.
11. Realizar la extracción y purificación mediante el Kit Fast ID.

## **Anexo 7**

Preparación de medios de cultivo y medios de dilución

### **•Agar BHI**

#### **Fórmula**

BHI 37 g

Bacto agar 15 g

Agua 1 L

#### **Preparación**

Disolver los componentes en agua.

Esterilizar por 15 min a 121°C

### **•Agar Mac Conkey**

#### **Fórmula**

Agar Mac Conkey 51.5g

Agua 1 L

#### **Preparación**

Disolver los componentes en agua.

Esterilizar por 15 min a 121°C

### **•Agar Lauril**

#### **Fórmula**

Agar Lauril sulfato 35.6 g

Agua 1 L

#### **Preparación**

Disolver los componentes en agua.

Esterilizar por 15 min a 121°C

**•Agar CTA (Cistina tripteína agar)****Fórmula**

Agar CTA 28.5 g

Agua 1 L

**Preparación**

Disolver los componentes en agua.

Esterilizar por 15 min a 121°C

**•Caldo Lauril****Fórmula**

Agar Lauril Sulfato 36.6 g

Agua 1 L

**Preparación**

Disolver los componentes en agua.

Esterilizar por 15 min a 121°C

**•Agua Peptonada tamponada****Fórmula**

Peptona 10.0 g

Cloruro de sodio 5.0 g

Fosfato sódico dibásico 3.5 g

Fosfato potásico monobásico 1.5 g

Agua 1 L

**Preparación**

Disolver los componentes en agua, calentando si es necesario.

Esterilizar por 15 min a 121°C



**• Citrato 2%, pH 8****Fórmula**

Citrato de sodio 20.0 g

Agua 1 L

**Preparación**

Disolver los componentes en agua, calentando si es necesario.

Ajustar el pH, si es necesario.

Esterilizar por 15 min a 121°C

**• Solución salina 0.85%, pH 7****Fórmula**

Cloruro de sodio 0.85 g

Agua 100 mL

**Preparación**

Disolver los componentes en agua.

Ajustar el pH, si es necesario.

Esterilizar por 15 min a 121°C



## Anexo 8

### Gráficos de PCR tiempo real obtenidos de las muestras analizadas

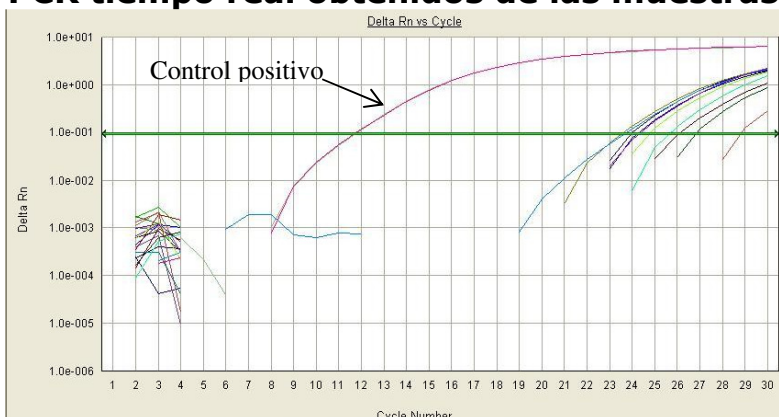


Figura 20. Gráfico de amplificación obtenido en el análisis de las muestras Q.C-1 al Q.C-20 para el gen específico para *Salmonella* spp.

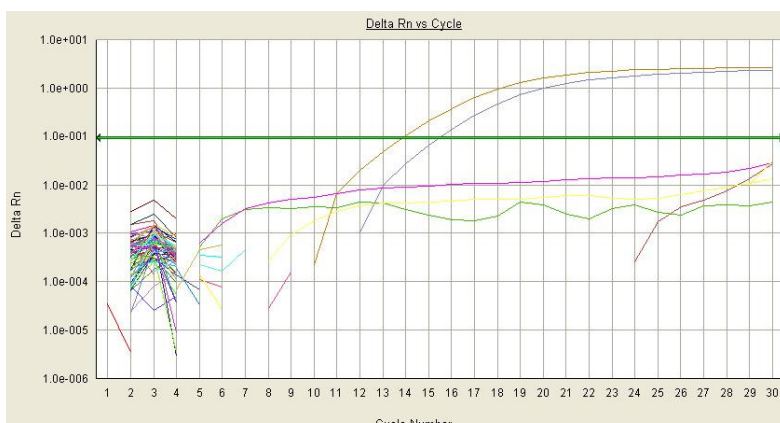


Figura 21. Gráfico de amplificación obtenido en el análisis de las muestras Q.C-21 al Q.C-40 para el gen específico para *Salmonella* spp.

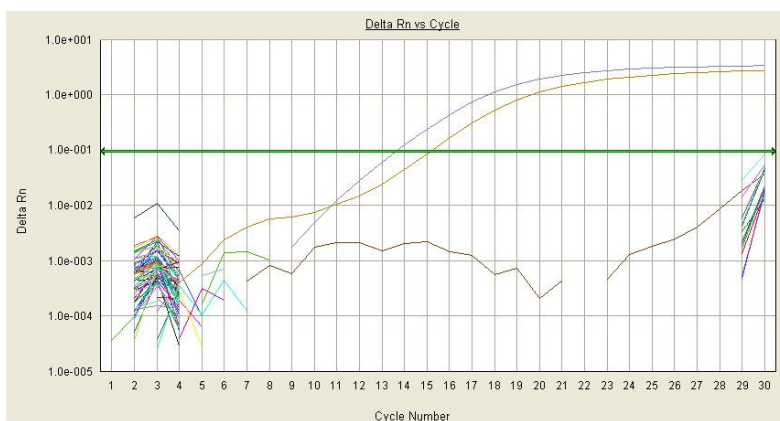


Figura 22. Gráfico de amplificación obtenido en el análisis de las muestras Q.C-41 al Q.C-60 para el gen específico para *Salmonella* spp.

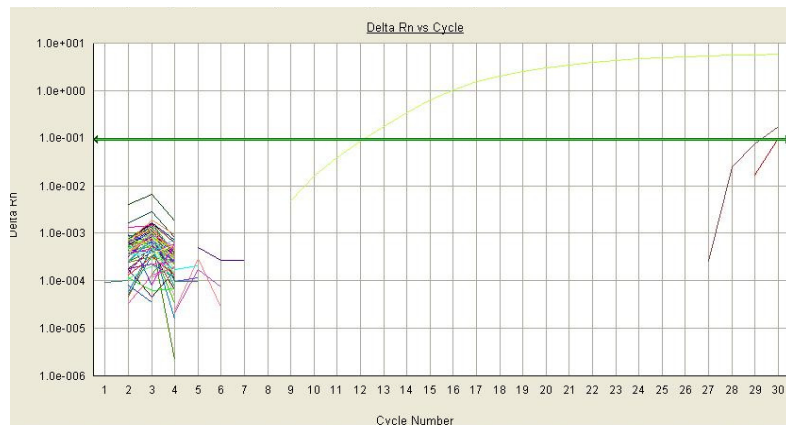


Figura 23. Gráfico de amplificación obtenido en el análisis de las muestras Q.C-61 al Q.C-80 para el gen específico para *Salmonella* spp.



Figura 24. Gráfico de amplificación obtenido en el análisis de las muestras Q.C-81 al Q.C-95 para el gen específico para *Salmonella* spp.



## Anexo 9

### Geles de agarosa 2%, PCR región V<sub>3</sub>

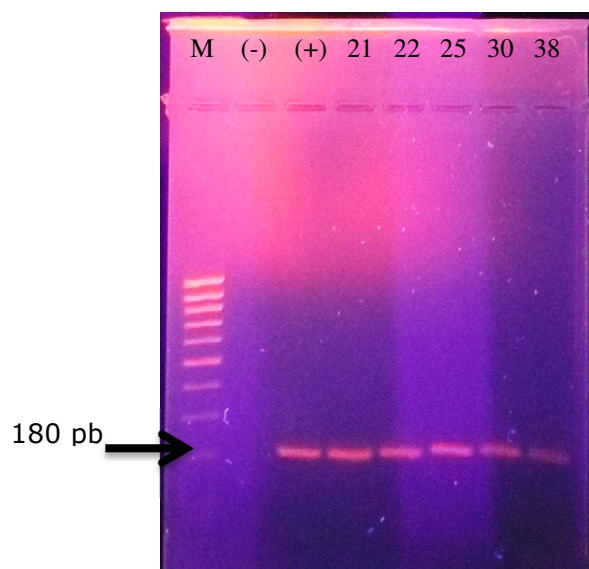


Figura 25. Gel de electroforesis de los amplicones obtenidos de la PCR de V<sub>3</sub>; agarosa 2 %. B: blanco de muestra, M: Marcador de peso molecular MassRuler Low range, (-): Control negativo, (+): Control positivo: *Salmonella* entérica Enteritidis cepa pura, 21: queso Cotija QC-21, 22: queso Cotija QC-22, 25: queso Cotija QC-25, 30: queso Cotija QC-30, 38: queso Cotija QC-38.

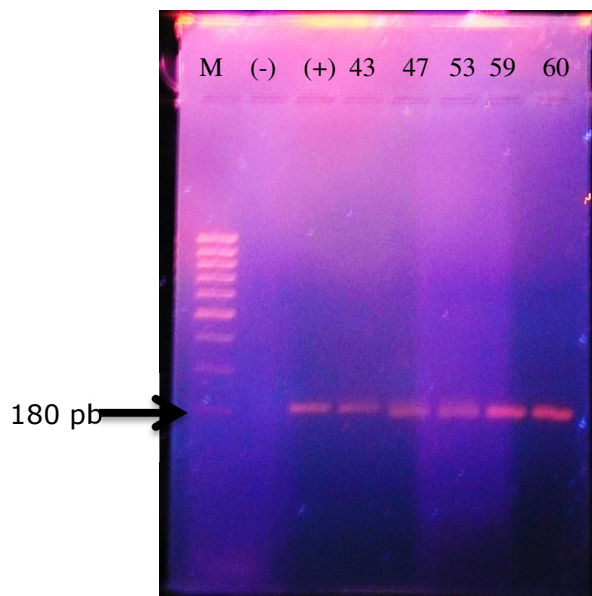


Figura 26. Gel de electroforesis de los amplicones obtenidos de la PCR de V<sub>3</sub>; agarosa 2 %. B: blanco de muestra, M: Marcador de peso molecular MassRuler Low range, (-): Control negativo, (+): Control positivo: *Salmonella* entérica Enteritidis cepa pura, 43: queso Cotija QC-43, 47: queso Cotija QC-47, 53: queso Cotija QC-53, 59: queso Cotija QC-59, 60: queso Cotija QC-60.

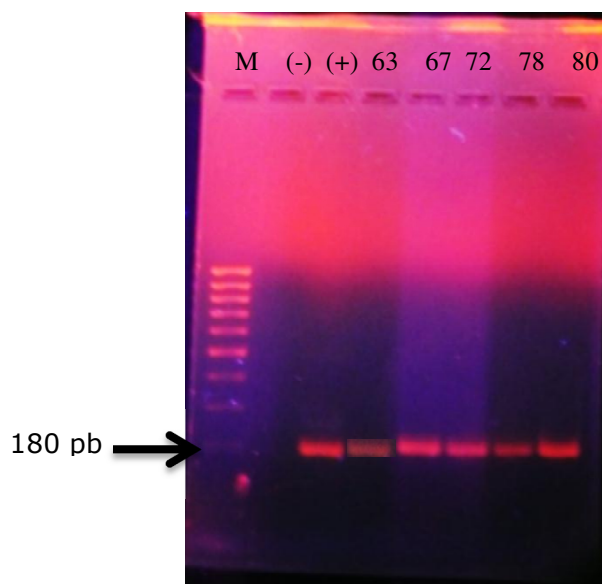


Figura 27. Gel de electroforesis de los amplicones obtenidos de la PCR de  $V_3$ ; agarosa 2 %. B: blanco de muestra, M: Marcador de peso molecular MassRuler Low range, (-): Control negativo, (+): Control positivo: *Salmonella* entérica Enteritidis cepa pura, 63: queso Cotija QC-63, 67: queso Cotija QC-67, 72: queso Cotija QC-72, 78: queso Cotija QC-78, 80: queso Cotija QC-80.

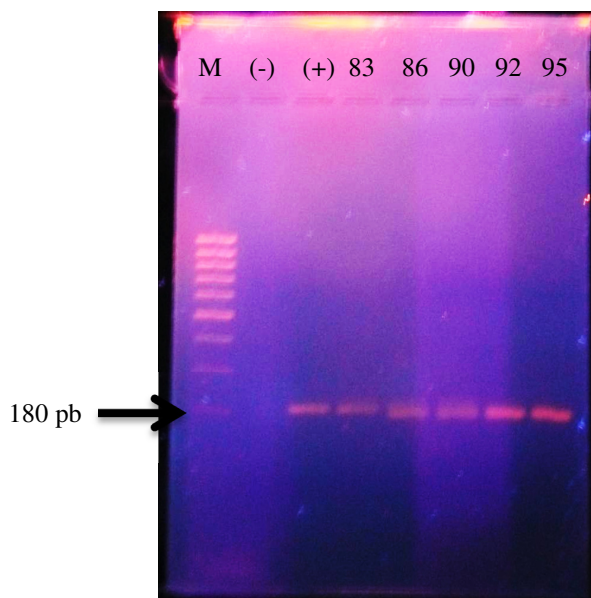


Figura 28. Gel de electroforesis de los amplicones obtenidos de la PCR de la región  $V_3$  del gen 16s; agarosa 2 %. B: blanco de muestra, M: Marcador de peso molecular MassRuler Low range, (-): Control negativo, (+): Control positivo: *Salmonella* entérica Enteritidis cepa pura, 83: queso Cotija QC-83, 86: queso Cotija QC-86, 90: queso Cotija QC-90, 92: queso Cotija QC-92, 95: queso Cotija QC-95.



## BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, R., Barragán López, E., & Chombo Morales, P. (2005). *Reglas de uso. Marca colectiva Queso Cotija Región de Origen MR.* México: Asociación Regional de Productores de Queso Cotija.
- Bhagwat, A. (2003). Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 84, 217-224.
- Biosystems, A. (2005). *Real-Time PCR systems, Chemistry Guide.* AB, 2-3.
- Biosystems, A. *Applied Biosystems StepOne Real-time PCR system.* Obtenido de [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_053238.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_053238.pdf)
- Cliver, D. O. (1990). *Foodborne diseases.* San Diego: Academic Press, 185-199.
- Dorak, T. (2006). *Real-time PCR.* UK: Taylor & Francis group, 3-29, 45-47.
- Doyle, M. (2001). *Food Microbiology: Fundamentals and frontiers* (2a ed.). Washington: ASM, 141-178.
- ECDC. Obtenido de: <http://www.ecdc.europa.eu/EN/HEALTHTOPICS/SALMONELLOSIS/Pages/index.aspx>
- Ercolini, D. (2004). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbial Methods*, 56, 297-314.
- Estrada, C. (2007). *Análisis microbiológico de Queso Cotija, identificación de microorganismos patógenos mediante la técnica de PCR punto final. Tesis profesional.* México: Facultad de Química, UNAM, 10-21.



- Fox, P., Guinee, T., Cogan, T., & McSweeney, P. (2000). *Fundamentals of cheese science*. USA: Aspen, 484-500.
- Fricker, M., Messelhaüßer, U., Busch, U., Scherer, S. & Ehling-Schulz, M. (2007). Diagnostic Real-Time PCR Assays for the Detection of Emetic *Bacillus cereus* Strains in Foods and Recent Food-Borne Outbreaks. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1892–1898.
- Fusco, V., Marina, G., Moreo, M. & Blaiotta, G. (2011). Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* harbouring the enterotoxin gene cluster (egc) and quantitative detection in raw milk by real time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 528-537.
- Giraffa, G. (2003) Functionality of enterococci in dairy products. *Int J Food Microbiol* 88, 215-222.
- Hernández, V. (2007). *Queso Cotija: Estudio del análisis fisicoquímico, proximal y actividad antioxidante*. Tesis profesional. . México: Facultad de Química, UNAM, 21.
- Hernández-Briones, V. (2010). *Composición nutrimental de queso cotija region de origen en funcion de condiciones de produccion y maduracion*. Tesis de maestria. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México, 29-35.
- Hu, S. & Bhagwat, A. (2004). Application of a molecular beacon—real-time PCR technology to detect *Salmonella* species contaminating fruits and vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 95, 177-187.
- Ingebord, H., & Flekna, G. (2006). Real time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in food: An alternative approach to a conventional PCR system suggested by the food PCR project. *Journal of Microbiology Methods*, 66, 538-547.



- James, M. (2005). *Modern Food Microbiology* (7a ed.). New York: Food Science Text, 619-625.
- Jamshisi, A., Bassami, M., & Affshari, N. (2009). Identification of *Salmonella* spp. and *Salmonella typhimurium* by a multiplex PCR based assay from poultry carcasse Mashhad-Iran. *International Journal of Veterinary*, 3, 43-48.
- Jing, C., & Lida, Z. (2010). A real-time PCR method for the detection of *Salmonella enterica* from food using a target sequence identified by comparative genomic analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 168-174.
- Korf, I. (2003). *BLAST: An essential guide*. Gravenstein.
- Lermo, A., Liébana, S., Campoy, S., García, I., Soutullo, A. & Alegret, S. (2010). A novel strategy for screening-out raw milk contaminated with *Mycobacterium bovis* on dairy farms by double-tagging PCR and electrochemical genosensing. *International Microbiology*, 13, 91-97.
- Logan, J., Edwards, K., & Saunde, N. (2009). *Real-Time PCR: Current technology and applications*. Horizon Scientific Press.
- Malorny, B., Paccassoni, E., Fach, P., Cornelia, D. & Martin, A. (2004) Diagnostic Real-Time PCR for Detection of *Salmonella* in Food. *American Society for Microbiology*, 70, 7046–7052.
- Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A. and Lodi R. (2006) Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from north–west Italian dairy products. *Int Dairy J* 16, 867–875.
- Moussa, L., & Gassem, M. (2010). Using molecular techniques for rapid detection of *Salmonella* serovars in frozen chicken and chicken products collected from Riyadh, Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology*, 9, 612-619.





- Muñoz, D. (2010). Development and Evaluation of a Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction Procedure to Clinically Type Prevalent *Salmonella enterica* Serovars. *Journal of Molecular Diagnostics*, 12, 220-225.
- Rao, S. (2008). *Molecular epidemiological investigation of Salmonella and its antibiotic resistance patterns in swine production units*. ProQuest. University of Illinois at Urbana-Champaign, 4-13.
- Rhen, M. (2007). *Salmonella. Molecular Biology and Pathogenesis* (1a ed.). Taylor.
- Ruíz-Rueda, o., Marcal, S. & Laia, C. (2011). Multiplex Real-time PCR for the Simultaneous Detection of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in Food Samples. *Food Analytical Methods*, 4, 131-138.
- Rodriguez-Lazaro. (2012). *Real-Time PCR in Food Science: Current Technology and Applications*. España: Caister Academic Press, 5.
- Secretaria de Salud de Estados Unidos Mexicanos (22 de Septiembre de 1995). Obtenido de NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-114-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE SALMONELLA EN ALIMENTOS: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/114ssa14.html>
- Trnčíková, T., & Hrušková, V. (2009). Rapid and Sensitive Detection of *Staphylococcus aureus* in Food Using Selective Enrichment and Real-Time PCR Targeting a New Gene Marker. *Food Analytical Methods*, 2, 241-250.
- WHO (2012). Obtenido en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/index.html>
- Yoder, S., Argueta, C., Holtzman, A., & Glover, N. (1999). PCR Comparison of *Mycobacterium avium* isolates obtained from Patients and foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2650-2653.



- 
- Zaidi, M., López Macías, C., & Calva, E. (2006). Estudios mexicanos sobre Salmonella: vacunas y biología molecular. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 121-125.