



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETECCIÓN DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN QUESO COTIJA ARTESANAL
MADURADO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

MARÍA BELÉN BECERRA CEDILLO



MÉXICO, D.F.

AÑO 2013



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: VELÁZQUEZ MADRAZO OLGA
VOCAL: Profesor: GILES GÓMEZ MARTHA
SECRETARIO: Profesor: QUIRASCO BARUCH MARICARMEN
1er. SUPLENTE: Profesor: CAMACHO DE LA ROSA NORMA ANGÉLICA
2° SUPLENTE: Profesor: MINA CETINA ALEIDA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA. EDIFICIO E LABORATORIO 312. ESTA TESIS FUE FINANCIADA POR EL PROYECTO DE 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: MARÍA BELÉN BECERRA CEDILLO

AGRADECIMIENTOS

A MI ALMA MÁTER LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO POR PERMITIRME FORMAR PARTE DE ELLA Y FORMARME COMO CIUDADANO Y PROFESIONISTA.

A LA **FACULTAD DE QUÍMICA** POR FORMARME COMO QUÍMICA DE ALIMENTOS.

A la *Dra. Maricarmen Quirasco Baruch* por aceptarme en el proyecto, por su asesoría, por su paciencia, por su tiempo y sobre todo por su confianza y amistad, muchas gracias por todo.

A la *Dra. Carolina Peña Montes* por su asesoría, por transmitirme sus conocimientos en el laboratorio, por su confianza, por ser tan paciente conmigo y por su amistad, muchas gracias por tanto tiempo.

Al *QFB. Alejandro Camacho* por su asesoría en microbiología, por su confianza y por su amistad.

A la *QA. Cindy Adriana Estrada Hernández* por su colaboración en el proyecto.

DETECCIÓN DE *Listeria monocytogenes* EN QUESO COTIJA ARTESANAL
MADURADO

Contenido

1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	3
2.1. Características generales del queso Cotija.....	3
2.1.1. Proceso de elaboración del queso Cotija.....	4
2.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	9
2.3. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	15
2.3.1. PCR entiempo real.....	16
2.4. Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> por PCR en tiempo real.....	18
3. Justificación.....	21
4. Hipótesis.....	22
5. Objetivos.....	22
5.1. Objetivos particulares.....	22
6. Metodología.....	23
6.1. Material biológico.....	24
6.2 Selección de blanco de amplificación.....	24
6.3. Obtención del paquete celular de los microorganismos puros que se utilizaron como control.....	25
6.4. Recuperación del paquete celular a partir del queso Cotija.....	25
6.5. Recuperación del paquete celular a partir del queso Cotija inoculado con una cantidad desconocida de inóculo.....	26
6.6. Limite de detección del método de enriquecimiento y PCR en tiempo real.....	27
6.7. Extracción de ADN.....	28

6.8. Cuantificación de ADN en las muestras	29
6.9. Condiciones de PCR punto final.....	29
6.10. Condiciones de PCR en tiempo real.....	31
6.11. Procesamiento de muestras.....	32
7. Resultados y discusión.....	33
7.1. Selección de cebadores.....	33
7.2. Calidad y cuantificación de ADN extraído.....	34
7.3. Visualización de los productos de PCR.....	35
7.3.1. Especificidad de cebadores con <i>L. monocytogenes</i> y otros patógenos.....	37
7.4. Queso inoculado con <i>L. monocytogenes</i> inactivada.....	38
7.5. Queso inoculado con <i>L. monocytogenes</i> viable.....	39
7.6. Análisis de muestras de queso Cotija Región de Origen.....	41
7.6.1. Análisis visual de las muestras de queso Cotija.....	41
7.6.2. Análisis de presencia o ausencia de <i>L. monocytogenes</i> en las muestras de queso Cotija.....	43
7.6.2.1. Amplificación de la región V3 del gen ribosomal 16S por punto final a partir del ADN extraído	43
7.6.2.2. Análisis de las muestras por PCR en tiempo real del gen específico para <i>L. monocytogenes</i>	45
8. Conclusiones.....	53
9. Perspectivas.....	53
10. Bibliografía.....	54
ANEXO 1.....	57
ANEXO 2.....	58
ANEXO 3.....	64



1. Introducción.

El queso Cotija artesanal madurado es un derivado lácteo elaborado en México, específicamente en comunidades de los estados de Jalisco y Michoacán; tiene como características principales ser un queso madurado de pasta dura, seco, elevado contenido de sal, olor penetrante y gusto ácido y fuerte.

En las zonas donde se elabora la topografía y la ubicación geográfica tienen influencia en el clima. La que muestra una temperatura de 20-25°C, precipitaciones de 900-1200 mm/año (entre el periodo de julio a octubre) y una humedad relativa de 80%. Estos parámetros son importantes para la maduración del producto, porque dicho proceso se desarrolla en estas condiciones ambientales. El queso es elaborado con leche cruda obtenida de vacas de raza cebú y criollas, alimentadas por libre pastoreo. La calidad de la leche para la producción de Cotija Región de Origen requiere de un mínimo de 3.7% de grasa y 3.0% de proteína (Álvarez *et.al.*, 2005). Es elaborado en temporada de lluvias, por lo que la vegetación es muy abundante en este tiempo y la producción de leche es más alta.

El queso Cotija es un producto que está en vías de obtener la denominación de origen. La Asociación Regional de productores de Queso Cotija publicó en el 2005 las “Reglas de uso” con las que se hace un esfuerzo por estandarizar el proceso y se inicia su protección oficial.

Como primera etapa para obtener la denominación de origen, en marzo del 2005, bajo la figura legal de la Sociedad de Producción Rural (SPR-RI) la asociación obtuvo, del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) la marca colectiva del queso Cotija Región de Origen.

Durante el proceso de elaboración del queso Cotija, no se incluye algún tratamiento térmico que reduzca la carga microbiana presente, ni tampoco se adicionan cultivos iniciadores. El queso es madurado por lo menos tres meses.



Este trabajo busca evaluar la inocuidad del queso Cotija con respecto a la presencia de *L. monocytogenes* debido a que es un patógeno de origen alimentario que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Quienes tienen mayor riesgo de infección son las mujeres embarazadas, recién nacidos, personas inmunocomprometidas y los ancianos.

El método por el cual se busca detectar a *L. monocytogenes* es PCR en tiempo real ya que se ha convertido en una poderosa herramienta altamente selectiva y de gran capacidad de procesamiento de muestras para el análisis de microorganismos en alimentos.



2 Marco teórico

2.1. Características generales del queso Cotija

El Queso Cotija Región de Origen es un producto lácteo artesanal, madurado, salado, de pasta dura, prensada y no cocida, de textura desmoronable. Es elaborado en México desde hace más de 400 años, específicamente en la región serrana entre los estados de Jalisco y Michoacán (Sierra Jalmich) (Figura 1). Es elaborado a partir de leche entera bronca (no pasteurizada) de ganado cebú o criollo que se alimenta bajo un sistema de libre pastoreo dentro del área delimitada, en donde el queso es un ícono fundamental de la identidad cultural y territorial de los habitantes. Su periodo de elaboración se restringe a los meses de lluvia debido a que la vegetación con la que se alimenta el ganado es más abundante durante esta época, aumentando la producción de leche (Álvarez *et al.*, 2005). Su proceso de maduración se lleva a cabo durante el resto del año, con lo que se logra la obtención de un producto con características únicas, que se comercializa tradicionalmente en el mes de diciembre.

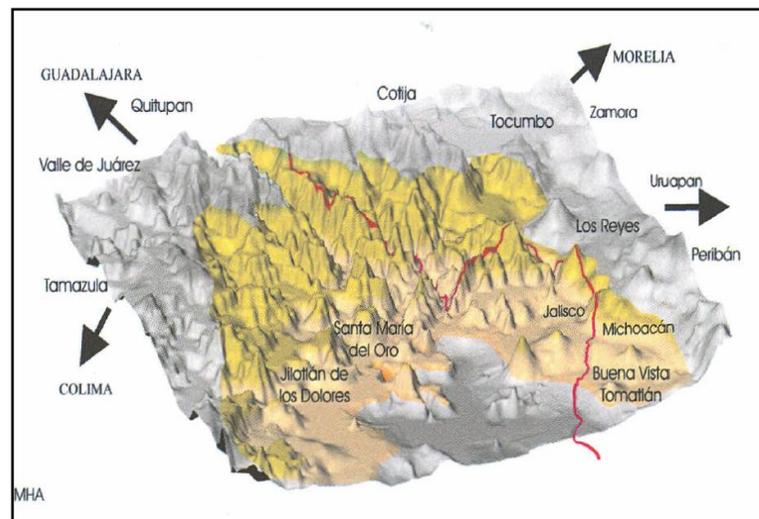


Figura 1. Sierra de Jalmich (Álvarez *et al.*, 2005).



Este queso posee una pasta friable, ácida y con un elevado porcentaje de sal (2.5-3%). Es cilíndrico y de gran formato: 40 cm de diámetro y 20 cm de altura, en promedio, y peso de alrededor de 20-30 kg. El tiempo de maduración es de 3 meses como mínimo (a $T=25^{\circ}\text{C}$, $\text{HR}=90\%$, en promedio).

Aunque el queso Cotija se incluye en la clasificación de la NOM-121-SSA1-1994 para quesos, la definición no considera completamente a este tipo de queso, ya que sólo menciona a los elaborados con leche pasteurizada. Actualmente, se encuentra publicada en el Diario Oficial la norma que define al Queso Cotija. Ésta se elaboró y aprobó por el Consejo para el Fomento de la Calidad de la Leche y sus Derivados, A. C. (COFOCALEC) y se encuentra bajo la clave de NMX-F-735-COFOCALEC-2011.

2.1.1 Proceso de elaboración del queso Cotija

De acuerdo a la NMX-F-735-COFOCALEC-2011, el queso Cotija se clasifica como un queso maduro prensado de pasta dura, características que se adquieren debido a su proceso. El proceso de elaboración del queso Cotija, Región de Origen, se describe a continuación y se ilustra en la Figura 2 (Álvarez *et al.*, 2005; NMX-F-735-COFOCALEC-2011), así como los posibles puntos de inoculación microbiana.



Figura 2. Proceso de elaboración del queso Cotija y posibles puntos de contaminación microbiana (en azul).



Ordeña

La leche que se utilice debe ser recién ordeñada del día. La ordeña de las vacas se realiza siempre temprano, entre las 7:00 y 9:00 a.m.

La persona dedicada a ordeñar las vacas debe asegurarse de cumplir dos pasos previos a la ordeña: lavarse muy bien las manos y posteriormente, limpiar la ubre de las vacas con un trapo limpio. Para mantener la mayor higiene posible, el ordeñador no debe ser quien acarree el ganado o realice otras actividades que puedan ensuciar sus manos, por lo menos hasta el término de la ordeña.

La mayor parte del ganado utilizado es de raza Cebú, Suiza, Criollas y mezcla de ambas, aunque también cuentan con vacas Holstein, en menor cantidad. Estas últimas no son recomendables pues de ellas se obtiene leche con menor porción de grasa y proteína.

Reposo

La mezcla de toda la leche se pasa por cedazos limpios para separar cualquier materia extraña, antes de procesarla. La temperatura de la leche recién ordeñada es de 36-38°C. Después de la ordeña, se lleva a cabo un reposo de la leche, denominado así porque mientras transcurre la ordeña de todas las vacas de hato, la leche se mantiene en recipientes de acero inoxidable con tapa (en la mayoría de los casos) durante tres o cuatro horas, a temperatura ambiente, antes del cuajado. En algunos ranchos se utilizan recipientes de plástico y cazos grandes para contener la leche.

Adición del cuajo

Una vez que la leche alcanza la temperatura óptima para ser cuajada (alrededor de 34°C, con un pH cercano a siete), se adiciona el cuajo (Cuamex, Cuajo estandarizado, enzimas coagulantes de leche bovina, CHR Hansen de México) y se mezcla rápidamente. Para esto, se utilizan tinajas grandes de acero inoxidable o en su defecto, tinajas grandes de plástico donde se lleva a cabo el cuajado de toda la leche obtenida de un día (aproximadamente 100 litros). El tiempo de coagulación es variable, de 30 a 40 minutos, y hasta una hora, de acuerdo a las costumbres de cada productor.



Corte

La consistencia de la cuajada se determina cruzándola con una cuchara o cuchillo previamente lavado y desinfectado en agua hirviendo. Una vez alcanzado el punto deseado, se realiza el corte de la cuajada con los mismos utensilios hasta obtener grumos equivalentes en tamaño a un grano de maíz.

Desuerado

Después del corte, se deja decantar para obtener la separación del suero y la cuajada, hasta que esta última se asienta al fondo del recipiente. Para eliminar el suero, se drena o cuela con ayuda de un trapo de manta limpio, previamente hervido en agua. Al final, la cuajada se coloca en tinas de acero inoxidable para que se siga desuerando. Previamente, las tinas se lavan con agua hirviendo.

Desmenuzado

Cuando se pierde el exceso de suero, la cuajada se desmenuza o desmorona manualmente en su totalidad. Si es necesario, se deja escurrir en la misma tina de acero inoxidable o en una artesa de madera algunos minutos más, para quitar el exceso de suero en la cuajada.

Adición de sal

La cuajada desmoronada se sala y mezcla manualmente para que la sal quede bien distribuida. Se utiliza sal de mar en grano procedente del estado de Colima, la que no se encuentra yodada ni fluorada. La cantidad de sal agregada no está estandarizada, sólo agregan un número determinado de tazas de sal con respecto a la cantidad de leche cuajada. La cantidad aproximada que se agrega es de 138 -140 g por cada 20 litros de leche, lo que equivale en promedio a 0.007 g de sal por gramo de cuajada fresca. Esta cantidad varía en cada proceso según el gusto del productor. La cuajada salada adquiere una textura granulosa, característica de una pasta friable.



Moldeado y prensado

La masa salada se puede moldear si se obtienen la cantidad necesaria para una pieza; si se llega a obtener menos, se deja escurrir sobre una artesa a temperatura ambiente para que al día siguiente se incorpore en la cuajada salada del día, y así obtener la cantidad adecuada para llenar el aro (un cincho de diámetro específico) que está cubierto en su interior con dos bandas de ixtle (fibra de maguey), con las que se moldeará la masa. Así se obtiene la presentación tradicional cilíndrica de alrededor de 20 Kg. La pasta moldeada se prensa de 18 a 24 horas (se colocan piedras de pesos variable, de entre 50 y 90 Kg, de acuerdo al productor), se voltea sobre su propia cara, al concluir el periodo.

El prensado se lleva a cabo en moldes y se cubren los quesos con una malla limpia para evitar que entren los insectos y se colocan en un cuarto ventilado en condiciones ambientales.

Desfajado, oreado y maduración

La pasta prensada se mantiene fajada para que no pierda la forma cilíndrica, se voltea sobre su cara diariamente y se orea a temperatura ambiente durante 15 días o hasta que adquiera la firmeza necesaria para cada pieza pueda ser manipulada. Durante este tiempo, el queso se voltea y se limpia diariamente con un trapo limpio. Cuando el queso se seca empieza a formarse una costra, en ese momento se desfaja y empieza la maduración. El periodo de maduración es de tres meses como mínimo, para asegurar que el producto tenga una buena calidad microbiológica (Álvarez *et al.*, 2005).

La elaboración del queso con leche cruda de cebú o criolla, la ausencia de algún tratamiento térmico durante el proceso, el saldo y amasado manual, la variabilidad del prensado y el tiempo mínimo de tres meses de maduración antes de ser consumido son aspectos que diferencian al Cotija de los demás quesos.

Además, se ha observado que las etapas del proceso que pueden ser vehículos de inoculación de microorganismos son la ordeña, el tiempo que pasa la leche a temperatura ambiente antes de agregar el cuajo, el amasado, salado manual, la etapa del oreo y la



maduración. Adicionalmente a los utensilios, como cuchillos o cucharas, que frecuentemente se utilizan sin esterilizar.

Para que se considere un queso Cotija auténtico debe cumplir con los siguientes puntos importantes marcados en las Reglas de uso:

- Producirse de manera natural, a partir de leche entera, sin la adición de compuestos químicos o análogos de la leche u otros ingredientes que no sean sal y cuajo.
- Estar libre de cualquier microorganismo patógeno.
- Estar libre de compuestos químicos ajenos a su naturaleza, con pesticidas, fertilizantes, detergentes, etc.
- La composición básica del queso será la siguiente:

Humedad máxima 36%

Grasa mínima 23%

Proteína mínima 25%

El cuajo utilizado deberá ser, elaborado higiénicamente por los mismos productores de queso, o a partir del cuajo comercial de origen animal, no microbiano, es decir que la composición corresponda a la mezcla enzimática, proveniente del extracto del estómago de rumiantes.

La sal deberá ser de mar (en grano) libre de materia extraña y de compuestos químicos.

El Cotija Región de Origen deberá tener un mínimo de tres meses de vida dentro del área geográfica que protege esta marca, considerando el inicio de su vida a partir del retiro de la prensa.

Actualmente se desea obtener la Denominación de Origen y para lograr este objetivo se han realizado, en el grupo de trabajo, diversos análisis fisicoquímicos y microbiológicos, entre los que destacan la identificación y caracterización de los microorganismos presentes en el lácteo, la búsqueda de microorganismos patógenos, análisis proximal y fisicoquímico.



En la Tabla 1 se muestra la composición fisicoquímica promedio del queso Cotija oreado (maduración de 3-6 meses), realizado a 8 diferentes muestras de la zona productora de Queso Cotija (Hernández, 2007).

Tabla 1. Análisis proximal y característico del Queso Cotija (Hernández, 2007).

Característica	Porcentaje (Base húmeda)
Humedad	23.5-32
Proteína	26.3-32
Grasa	23.5-32
Cenizas	5.7-7.2
NaCl	2.5-3
Carbohidratos	0.08-0.15
pH	4.8-5.2
Acidez (ácido láctico)	0.2-0.32%
a_w	0.87-0.90

Se ha reportado que la microbiota del queso Cotija cambia durante su maduración y que después de 3 meses no se encuentran levaduras y los coliformes están en cuentas <3 NMP/g queso, además que predominan las bacterias lácticas pertenecientes al género de enterococos (Zúñiga, 2009). Se ha planteado que no son sólo las condiciones de humedad y pH que prevalecen en el queso Cotija las que ejercen un control sobre las poblaciones microbianas sino, que podrían existir sustancias que contribuyen a la selección de los microorganismos que son capaces de sobrevivir en las etapas avanzadas de maduración (Bravo, 2008).

2.2 *Listeria monocytogenes*

Si se considera su contenido de G + C, el género *Listeria* pertenece al mismo subgrupo que *Clostridium* junto con *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Brochothrix*. La posición filogenética de *Listeria* corresponde a bacterias con su bajo contenido de G+C (36 a 42%). Hay seis especies reconocidas actualmente: *Listeria monocytogenes*, *Listeria*



innocua, *Listeria ivanovii*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri* y *Listeria grayi*. En el género *Listeria* sólo son consideradas virulentas las especies *L. monocytogenes* en humanos y *L. ivanovii* en otros mamíferos (Uta Gasanov *et al*, 2005; Doyle *et al*, 2001).

Listeria monocytogenes, se describe como un bacilo corto Gram-positivo no esporulado móvil a 22°C, aerobio y anaerobio facultativo, intracelular facultativo, con metabolismo fermentativo, productor de ácido pero no de gas a partir de glucosa, oportunista; mide de 1 a 2 µm de largo por 0.5 µm de ancho, sus extremos son curvos (Figura 3). Se encuentra ampliamente distribuida en el suelo, agua, productos agrícolas, y alimentos procesados (especialmente lácteos) causando infecciones en peces, aves y mamíferos incluyendo al humano. *L. monocytogenes* tiene gran capacidad de adaptación, es altamente resistente a los efectos de la refrigeración, el secado, altas concentraciones de NaCl (hasta 10%) y calentamiento aunque se inactiva a temperaturas superiores a 75°C. Crece en un rango de pH de 4.1 a 9.6 y en un rango de temperatura de 1 a 45°C (Doyle *et al*, 2001; Jay *et al*, 2005).

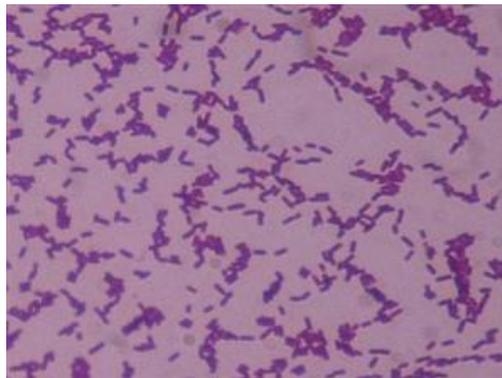


Figura 3. Bacilos Gram-positivos de *Listeria monocytogenes*

Requerimientos nutricionales

Listeria monocytogenes es un organismo no exigente esto se debe a que se puede reproducir en medios sintéticos simples. El carbohidrato ideal para el crecimiento de *L. monocytogenes* es la glucosa, que no puede ser sustituido como fuente de energía o de carbono por gluconato, xilosa, arabinosa, o ribosa. La sangre y el suero no son requisitos estrictos para el crecimiento, sin embargo, mejorarán el crecimiento del organismo en medios con factores de crecimiento limitados. Las cepas de *L. monocytogenes* difieren en



sus necesidades de vitaminas del grupo B, algunas cepas requieren tanto piridoxina y riboflavina. Un medio óptimo para el crecimiento de *L. monocytogenes* debe incluir glucosa, riboflavina, y biotina, junto con cuatro aminoácidos (isoleucina, leucina, valina, y cisteína), y presencia de Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^{+} y PO_4^{3-} , que también se requieren para el crecimiento (Ryser, 1991). Uno de los medios más utilizados para la detección de *L. monocytogenes* es el medio Fraser ya que es un medio de enriquecimiento que contiene peptonas, extracto de carne y extracto de levadura las cuales proporcionan nitrógeno, vitaminas y minerales (Uta Gasanov *et al.*, 2005).

Patogenicidad y patogénesis

El proceso por el cual *L. monocytogenes* causa la enfermedad se ha dividido en tres pasos generales.

Penetración del huésped, la supervivencia y multiplicación de los organismos dentro del huésped, y la invasión de tejido diana.

Se ha sugerido que el tracto intestinal puede ser el sitio principal de entrada de la bacteria (Ryser, 1991). La frecuente aparición de síntomas gastrointestinales en el inicio de la enfermedad y la relación que se establece entre consumo de alimentos contaminados nos lleva a creer que la listeriosis puede ser predominantemente a las infecciones transmitidas por los alimentos.

Una vez ingerido *L. monocytogenes* penetra en el revestimiento intestinal y comienza a multiplicarse dentro del huésped, por lo tanto, *L. monocytogenes* puede ser clasificado como un patógeno enteroinvasivo. Al menos dos hipótesis diferentes se han propuesto sobre el lugar de la penetración y la replicación una vez que el organismo ha entrado en el tracto intestinal.

La primera, hipótesis es que las células epiteliales que recubren el intestino sirven tanto como un sitio de entrada y como un sitio para la multiplicación bacteriana antes de la fagocitosis de los macrófagos por el organismo (Doyle *et al.*, 2001).



La segunda hipótesis es que el sitio de entrada son las células M (células especializadas que se encuentran en las placas de Peyer en el intestino), todavía tiene que ser esclarecido.

Después de haber entrado las bacterias son interiorizadas por macrófagos en los cuales son capaces de sobrevivir y multiplicarse.

En el paso final del proceso infeccioso, *Listeria monocytogenes* lisa el macrófago y cruza el epitelio capilar para producir una septicemia. El agente patógeno gana el acceso a los órganos diana (es decir, la placenta y el sistema nervioso central, incluyendo el cerebro) para provocar un aborto y/o para producir síntomas en el huésped que son característicos de meningioencefalitis (Ray, 2008; Ryser, 1991).

Factores de virulencia

Los factores de virulencia bacteriana incluyen todas las sustancias producidas por bacterias que permiten a un organismo causar enfermedad o infección.

Listeria monocytogenes debe sobrevivir a la acidez del estómago, penetrar la mucosa intestinal, y crecer en el huésped antes de que en el organismo se pueda producir enfermedad. Como otros agentes patógenos enteroinvasivos *L. monocytogenes* posee una variedad de factores de virulencia que dañan el tejido del huésped, permitiendo así la entrada al torrente sanguíneo, posteriormente son transportadas por la sangre a los ganglios linfáticos regionales y así producir la enfermedad (Ray, 2008).

Estos factores de virulencia contribuyen con la capacidad de *L. monocytogenes* para causar enfermedades, incluye una o más hemolisinas, un agente promotor de monocitos, varios constituyentes de membrana celular y pared celular, especies tóxicas de oxígeno, y varias toxinas no estudiadas.

L. monocytogenes posee una hemolisina O, conocida como listeriolisina O, generalmente se reconoce que es activada por tiol y que es antigénicamente similar a la estreptolisina O.

La toxina estreptolisina O, se designó como α -listeriolisina, y las hemolisinas restantes, que no son producto de una reacción cruzada con estreptolisina O, se designaron como β -hemolisinas.



La secreción de hemolisina ha sido propuesta como un factor importante para promover la virulencia de *L. monocytogenes*, ya que las cepas aisladas de infecciones naturales de *L. monocytogenes* han sido β -hemolisina positivo en modelos animales (Doyle *et al.*, 2001).

La secuencia de eventos después de que *L. monocytogenes* ha penetrado consiste en que el hospedero comienza con la fagocitosis rápida de la bacteria invasora, en un entorno pobre en hierro que a su vez estimula la secreción de hemolisina. El ambiente ácido dentro de fagosomas y de macrófagos, también sirve para aumentar la producción de hemolisina. La unión irreversible de la hemolisina con el colesterol de la membrana es seguida por la lisis de la membrana intracelular y la liberación de listerias en el citoplasma, que a su vez proporcionan un ambiente más favorable (aumento de la disponibilidad de hierro y un pH más alto), para el crecimiento bacteriano. Tras la difusión de *L. monocytogenes* dentro del hospedero, la producción local de hemolisina asociada con el crecimiento bacteriano adicional también se ha relacionado con la formación de focos infecciosos que aparecen en el bazo y el hígado durante las etapas posteriores de la infección (Ray, 2008; Ryser, 1991).

Modos de transmisión

Listeria monocytogenes se distribuye ampliamente en el medio ambiente y se ha aislado de una variedad de fuentes incluyendo el suelo, vegetación, material fecal, aguas residuales y agua. Por lo tanto los seres humanos pueden entrar en contacto con este patógeno a través de una variedad de fuentes, incluyendo los animales, carne, leche, productos lácteos, mariscos y plantas, así como los insectos, el aire, el polvo, la suciedad y las heces, de otros seres humanos.

Aunque el origen y el modo de transmisión de todas las formas de infección de *L. monocytogenes* es compleja, se ha hecho un intento para rastrear las distintas vías de infección. Estudios comparativos revelan que no hay diferencia biológica y bioquímica entre las propiedades de *L. monocytogenes* de cepas aisladas de fuentes de humanos y animales. Por lo tanto, la listeriosis tradicionalmente ha sido reconocida como una zoonosis, una enfermedad infecciosa de los animales que es transmisible a los seres humanos (Doyle *et al.*, 2001; Jay *et al.*, 2005).



De acuerdo a Ralovich (Ryser, 1991) del 24.8-76.2 % de todas las infecciones por listeria, pueden resultar de contacto humano a humano. Así, la propagación directa o indirecta de *L. monocytogenes* entre los seres humanos parece ser una posible vía de infección, particularmente en los casos de listeriosis neonatal.

La transmisión de la listeriosis alimentaria fue indicada pronto en la bibliografía médica pero fue demostrada por primera vez en 1981 durante un brote en Canadá con el uso simultáneo de un estudio de control de los casos y la tipificación de las cepas. Desde 1981, las investigaciones epidemiológicas han indicado repetidamente que el consumo de alimento contaminado es el vehículo principal de la transmisión de la listeriosis. El alimento ha sido identificado como el vehículo de varios brotes importantes de listeriosis investigados desde 1981 (Doyle *et al*, 2001; Jay *et al*, 2005).

Dosis infecciosa

La dosis infecciosa de *L. monocytogenes* depende de varios factores, que incluyen el estado inmunológico del hospedero. La exposición a determinados alimentos. La aparición y el curso de la infección dependen perfectamente de los factores de virulencia y de la dosis infecciosa. Los datos publicados indican que las cantidades de *L. monocytogenes* en el alimento contaminado responsable de casos esporádicos de origen alimentario eran más de 100 UFC/g. Sin embargo, debido a que las técnicas de recuento no son confiables del todo y a que el tiempo transcurrido en el consumo y el análisis del alimento contaminado puede permitir la multiplicación o la muerte de las listerias, es posible que los resultados no siempre sean indicativos de la cantidad de listerias ingeridas. Por consiguiente, estos datos no excluyen la posibilidad de que dosis más bajas sean infecciosas (Doyle *et al*, 2001).

Características de la enfermedad

La listeriosis es una enfermedad de origen alimentario atípica de interés principal para la salud pública a causa de la gravedad de la enfermedad.

La enfermedad afecta principalmente a segmentos específicos de la población cuya vulnerabilidad es mayor como personas inmunocomprometidas y mujeres embarazadas. El cuadro clínico de la listeriosis es grave debido al daño que puede provocar a nivel del



sistema nervioso central (Doyle *et al*, 2001; Jay *et al*, 2005; Uta Gasanov *et al*, 2005). Los síntomas de la listeriosis incluyen dolor abdominal, vómito, diarrea y fiebre. También puede provocar septicemia, encefalitis, infecciones intrauterinas o cervicales en mujeres embarazadas, lo cual puede dar lugar al aborto espontáneo o al nacimiento de un bebe muerto o meningitis (meningoencefalitis) en recién nacidos.

El porcentaje general de los casos de muerte correspondiente a la listeriosis sistémica o invasora suele ser de un 20 a un 30% aproximadamente tanto en los casos epidémicos como en los esporádicos. El pronóstico de la listeriosis depende del tipo de infección y de las enfermedades subyacentes. La mortalidad suele ser más elevada (38 a 40%) en las personas mayores inmunocomprometidas y en los enfermos que padecen infecciones del sistema nervioso central (Doyle *et al*, 2001; Ray, 2008).

2.3 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), consiste en un proceso de síntesis del ADN, el cual es repetitivo a través de la extensión del cebador de una región específica del ácido nucleico, permitiendo la amplificación del ADN.

El procedimiento consiste en: Desnaturalización del ADN molde, el cual se debe encontrar en cadena sencilla y esta condición ocurre con el objetivo específico de que en el paso subsecuente los cebadores hibriden con sus secuencias complementarias. Los cebadores se extienden, con la conversión del ADN molde de cadena sencilla a doble cadena, y la doble cadena de ADN recién sintetizada se debe desnaturalizar, para empezar el proceso de nuevo (McPherson & Møller, 2006).

Estos procesos están programados en la máquina de PCR (termociclador) de modo que cada reacción procede a través de cada paso de una manera ordenada. Se detalla un poco más a continuación.

La desnaturalización del ADN ocurre cuando la reacción se calienta a 92-96°C. El tiempo requerido para la desnaturalización del ADN depende de la secuencia y longitud del ADN molde.



Después de la desnaturalización, los cebadores y oligonucleótidos, se hibridan con sus secuencias complementarias del ADN molde de cadena sencilla, para lo que se debe bajar la temperatura a 50-55°C, dependiendo de la secuencia de los cebadores y la especificidad que se requiera.

El último paso es la extensión del cebador del oligonucleótido por una ADN polimerasa termoestable, esta porción del ciclo se lleva a cabo a 72°C. El tiempo necesario para copiar la plantilla completamente depende de la longitud del producto de PCR.

La fuerza principal de la PCR es su capacidad de detectar una cantidad extremadamente pequeña de la secuencia de ácido nucleico diana, incluso en la presencia de un exceso de otros ácidos nucleicos (Dieffenbach & Dieksler, 2003).

2.3.1. PCR en tiempo real.

Este método de detección está basado en la utilización de reporteros fluorescentes y es caracterizado por su excelente sensibilidad y por su amplio rango de detección.

La cantidad de ADN amplificado por PCR se correlaciona con un aumento de una señal fluorescente que resulta de una interacción entre un material fluorescente el cual está presente en el medio de reacción y el ADN molde presente en el medio. Gráficamente la emisión de fluorescencia de una reacción en cada ciclo genera una curva de amplificación. La cantidad de ADN inicial se estima entonces mediante la determinación del ciclo para el que la fluorescencia supera un umbral dado (Dorak, 2006) .

Principalmente, se utilizan dos químicas para la detección de PCR en tiempo real, la utilización de agentes intercalantes, como SYBR Green I y la hidrólisis (TaqMan).

El ensayo **TaqMan** utiliza una sonda de hidrólisis que aprovecha la actividad 5'exonucleasa de la Taq polimerasa para cortar una sonda de hibridación marcada durante la fase de extensión de PCR.



El ensayo fluorogénico 5' nucleasa utiliza una sonda de oligonucleótido que está diseñado para hibridarse a una secuencia específica que se encuentre entre los cebadores de PCR. La sonda se marca con un fluorocromo reportero (normalmente 6 carboxifluoresceína) 6-FAM en el extremo 5' y un fluorocromo apagador (6-carboxi-tetrametil-rodamina) TAMRA en el extremo 3'. Cuando la sonda está intacta, el reportero está en estrecha proximidad al apagador y la señal fluorescente es baja ya que la energía del reportero se transfiere al apagador por el fenómeno de transferencia de energía resonante fluorescente (FRET). Durante la amplificación por PCR, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena en su acción de síntesis, la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, de esta manera se libera el fluoróforo reportero en el medio de reacción. Cuando la molécula reportera se separa del apagador se genera la fluorescencia, esta fluorescencia emitida por el reportero es captada por el detector. La síntesis de la hebra de ADN continúa hasta que el ciclo de amplificación se completa. Debido a que las moléculas indicadoras se separan de las sondas durante cada ciclo de amplificación, la intensidad de fluorescencia del sistema global aumenta proporcionalmente a la cantidad de ADN amplificado (Dieffenbach & Dieksler, 2003), (Figura 4).

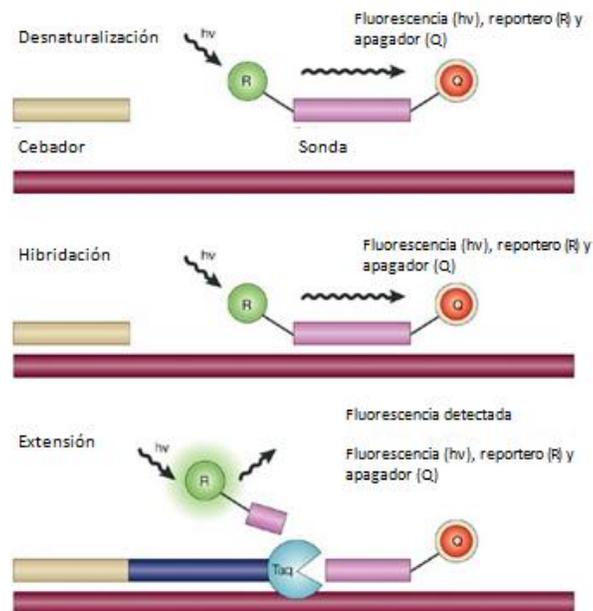


Figura 4. Modelo de la química de TaqMan



La principal ventaja de la química TaqMan consiste en que la señal fluorescente se genera sólo cuando hay hibridación específica de la sonda con el ADN molde. Otra ventaja es que las sondas pueden marcarse con diferentes moléculas reporteras, espectralmente distintas, lo que permite la amplificación de ADN molde múltiples dentro de un solo tubo (múltiple PCR en tiempo real) (Dieffenbach & Dieksler, 2003; Dorak, 2006).

2.4. Detección de *Listeria monocytogenes* por PCR en tiempo real

La detección y el aislamiento de *L. monocytogenes* en alimentos generalmente se hace por métodos convencionales los cuales consisten en cultivar al microorganismo en medios de cultivo selectivos seguido de pruebas serológicas y/o bioquímicas para la determinación de especies.

En la industria alimentaria y en los laboratorios de salud pública en el mundo, es importante encontrar un método que permita la detección e identificación de microorganismos patógenos de manera confiable, rápida, eficiente y automatizada.

Las tecnologías de la PCR y de la PCR en tiempo real se han convertido en poderosas herramientas de diagnóstico para el análisis de microorganismos en los alimentos y pueden cumplir con los requerimientos de la industria.

La validación de la PCR en tiempo real y la de los métodos basados en la PCR para la detección de patógenos en los alimentos, es esencial para que estas nuevas tecnologías sean adaptadas por la industria alimentaria como métodos oficiales de análisis.

Varios artículos han publicado la detección de *L. monocytogenes* por PCR en tiempo real, incluyendo en la metodología un paso de pre-enriquecimiento de *L. monocytogenes*, donde se utilizan cebadores dirigidos a proteínas de invasión y a factores de virulencia. Entre estos genes blanco se encuentran *iap*, *prfA* y *hly* (Hitchins, 2013; Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2004; Rossmanith *et al.*, 2006) los cuales pertenecen a la isla de patogenicidad de *Listeria*. Otro gen blanco que ha sido utilizado es el *ssrA*, el cual codifica para un ARN de transferencia-mensajero.



En la figura 5, se describe la estructura y organización genética del locus central de virulencia de *Listeria monocytogenes* y de la regulación que ejerce la proteína PrfA. El gen *prfA* codifica para esta última la cual activa la transcripción de los genes de LPI-1 (Kreft *et al.*, 2001; Rossmann *et al.*, 2006). La isla 1 de patogenicidad de *Listeria* (*Listeria pathogenicity island 1, LPI-1*) o grupo de genes de virulencia (virulence gene cluster, *vgc*) se encuentran en una región cromosómica de 9 kb y contiene a la mayoría de los genes de virulencia que están implicados en las diferentes etapas del ciclo infeccioso de *L. monocytogenes*.

Este locus cromosómico comprende los siguientes genes:

- 1) *hly*, este gen codifica para la listeriolisina O (LLO), esta toxina es necesaria para que *L. monocytogenes* salga de la vacuola de fagocitosis dentro de la célula hospedera, con el subsecuente crecimiento intracelular. La LLO reconoce el colesterol de la membrana del fagolisosoma, forma poros y favorece su lisis, lo que provoca la emigración de *L. monocytogenes* al citosol de la célula infectada.
- 2) *plcA* y *plcB*, que codifican dos fosfolipasas C con diferentes especificidades de sustrato (PlcA tiene como sustrato específico al fosfatidilinositol y PlcB es una lecitinasa que tiene un rango más amplio de sustratos, dado que hidroliza a la fosfatidilcolina, a la fosfatidilserina y a la fosfatidiletanolamina) y que cooperan con la LLO en la liberación de la bacteria de las vacuolas fagocíticas.
- 3) *mpl*, que codifica una metaloproteasa implicada en la maduración de pro-PlcB;
- 4) *actA*, que codifica a una proteína de superficie, ActA, la cual interviene en el ensamblaje direccional de monómeros de actina de la célula hospedera en uno de los polos de la bacteria, permitiendo el movimiento intracelular de las bacterias.
- 5) *prfA*, que codifica la proteína PrfA (regulador positivo factor A). Esta proteína activa la transcripción de los genes de LPI-1, incluyendo el propio.

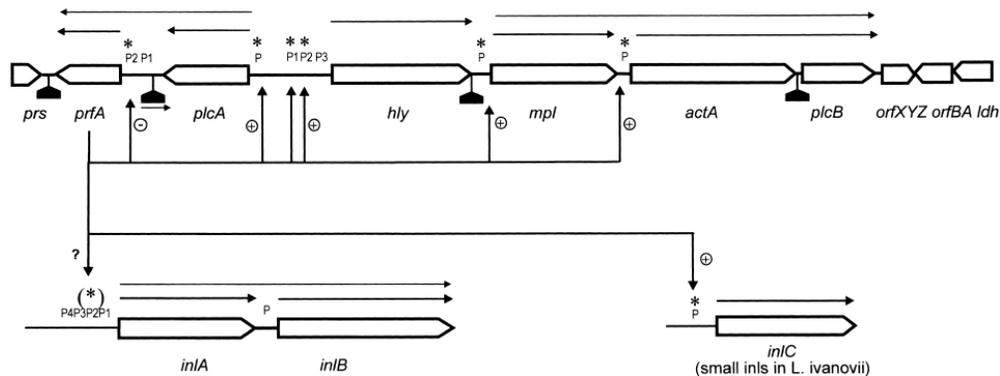


Figura 5. Estructura y organización genética del locus central de virulencia de *Listeria monocytogenes* y de la regulación que ejerce PrfA. *prfA*, codifica para el regulador positivo factor A; *plcA*, codifica para la fosfolipasa C; *hly*, codifica para la listeriolisina O; *mpl*, codifica para una metaloproteasa; *actA*, codifica una proteína de superficie que participa en la polimerización de la actina; *plcB*, codifica para la fosfolipasa C.

El gen *iap* (proteína asociada con la invasión) codifica para la proteína p60 de especies de *Listeria*. Ésta es una proteína esencial con actividad bacteriolítica probablemente implicada en la hidrólisis de mureína en el proceso de invasión. El gen *iap* se ha utilizado para la detección de *L. monocytogenes* y *Listeria* spp.

La comparación del gen *iap* de *L. monocytogenes* con otras especies de *Listeria* muestra que hay regiones variables que son específicas para cada especie de este género.

Por otra parte, el gen *ssrA* que también se ha utilizado para la detección de *L. monocytogenes* codifica para el ARNtm (ARN transferencia-mensajero) el cual ha sido identificado en todas las bacterias. En contraste con el ARN ribosomal 16S, el ARNtm es codificado por un solo gen y contiene regiones que aportan información taxonómica. La función del RNAtm es liberar a ribosomas que tienen mensajeros “atorados” en su sitio catalítico, de tal forma que quedan disponibles para traducir otra molécula de ARNm (Keiler, 2000; O’Grady *et al.*, 2008).



3. Justificación

Debido a que la materia prima con la que se elabora el queso Cotija es leche cruda y a que no existe un tratamiento térmico durante el proceso, surge la necesidad de buscar microorganismos que puedan poner en riesgo la salud de quien lo consume.

Dado que se está buscando la Denominación de Origen del es necesario demostrar la inocuidad del queso Cotija artesanal madurado, con lo que se apoya la manufactura de este tipo de producto lácteo en la región.

Además se aportará información que será de utilidad a otros productores de quesos madurados elaborados con leche no pasteurizada, a nivel nacional.

Se buscará la presencia de *Listeria monocytogenes* debido a que es un microorganismo patógeno que puede estar presente en quesos y representar un riesgo a la salud del consumidor.

El alcance de este proyecto involucra la evaluación de 95 muestras de queso, por lo que es de mucha utilidad contar con una metodología que permita el análisis de un gran número de muestras en poco tiempo.



4. Hipótesis

El queso Cotija estará libre de *L. monocytogenes* debido a que las condiciones fisicoquímicas del producto (principalmente a_w) no permitirán su crecimiento, además de que se utilizan buenas prácticas higiénicas en su manufactura y ganado sano.

5. Objetivos

Identificar la presencia de *Listeria monocytogenes* en una muestra representativa de queso Cotija.

5.1 Objetivos particulares

- Buscar el juego de cebadores y sonda específicos para *Listeria monocytogenes*, mediante investigación bibliográfica y experimentalmente.
- Implementar la metodología de extracción de ADN con una cepa pura de *Listeria monocytogenes* y en queso Cotija inoculado intencionalmente con dicho patógeno.
- Implementar una metodología de análisis que permita detectar desde 1 a 10 UFC de *L. monocytogenes*/g de queso.
- Analizar 95 muestras de queso Cotija artesanal, obtenidas en la zona productora.



6. Metodología

En la Figura 6 se muestra el diagrama general de experimentación que se llevó a cabo para la detección de *L. monocytogenes* en el queso Cotija artesanal madurado.

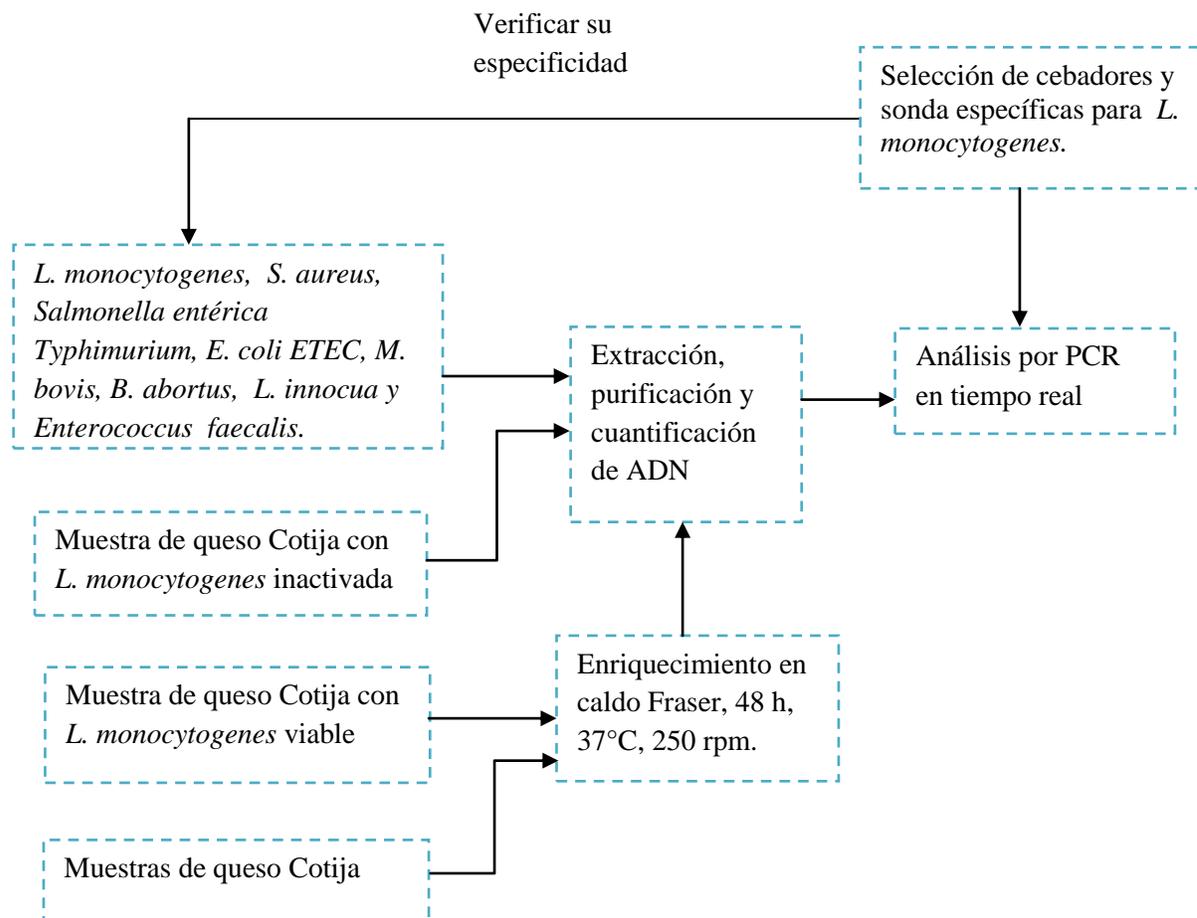


Figura 6. Diagrama general de experimentación



6.1 Material biológico

Los microorganismos puros que se utilizaron como control se obtuvieron del cepario de la Facultad de Química a excepción de la cepa de *Enterococcus faecalis*, que se obtuvo de la colección de bacterias aisladas del queso Cotija del laboratorio 312 del Conjunto E de la Facultad de Química, se cultivaron en sus medios y condiciones óptimas de crecimiento de acuerdo a la Tabla 2.

Tabla 2. Medios y condiciones de reacción para cada microorganismo

Microorganismos	Medio de Cultivo	Condiciones de cultivo
<i>Listeria monocytogenes</i>	Caldo Fraser	48 h , 37°C, 250rpm
<i>Salmonella enterica Typhimurium</i>	Agua peptonada	24 h, 37°C, 250rpm
<i>Staphylococcus aureus</i>	Caldo nutritivo	48 h, 37°C, 250rpm
<i>Escherichia coli ETEC</i>	Caldo BHI	24 h, 37°C, sin agitación
<i>Mycobacterium bovis</i>	Caldo Dubos	7 semanas, 37°C, sin agitación
<i>Brucella abortus</i>	Caldo Brucella	1 semana, 37°C, sin agitación
<i>Listeria innocua</i>	Caldo Fraser	48 h, 37°C, 250rpm
<i>Enterococcus faecalis</i>	Medio MRS	16 h, 37°C, 250rpm,

6.2 Selección de blanco de amplificación

A partir de una revisión bibliográfica, se seleccionaron probables genes blanco para la detección específica de *Listeria monocytogenes*.

Posteriormente se verificó la especificidad de los cebadores diseñados mediante el algoritmo “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) de la base de datos disponible en el portal del “National Center for Biotechnological Information” (NCBI). Dicha especificidad se utilizó como criterio de selección.



6.3 Obtención del paquete celular de los microorganismos puros que se utilizaron como control

Para la obtención del paquete celular de cada uno de los microorganismos. El procedimiento experimental empleado se describe a continuación.

Los microorganismos se cultivaron en sus medios y condiciones óptimas de crecimiento mencionadas en la Tabla 2. Posteriormente éstos se inactivaron por calor a 80°C, 20 min. Los cultivos desactivados se transfirieron a tubos Falcon estériles y se centrifugaron a 10,000 xg durante 10 min a 4°C. Las fases acuosas (medios de cultivo), se eliminaron. Los paquetes celulares se lavaron con 500 µL de solución salina estéril pH 7 (0.85% NaCl) y se centrifugaron nuevamente bajo las mismas condiciones. Las fases acuosas se eliminaron. Los paquetes celulares recuperados se conservaron a -20°C hasta la posterior extracción de ADN.

6.4 Recuperación del paquete celular a partir del queso Cotija

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

Posteriormente se empleó el siguiente procedimiento experimental: En condiciones asépticas, se pesaron 25 g de queso Cotija dentro de una bolsa para el equipo Stomacher (Seward), se adicionaron 225 mL de citrato de sodio (al 2% pH 8) y 1 mL de neutrasas (Novo Nordisk), lo anterior con el fin de romper la red proteínica del queso. Posteriormente se incubó 1 h a 45°C. Para llevar a cabo una ruptura mecánica de la matriz del queso, se homogenizó en el Stomacher 5 minutos a velocidad alta, se vertieron 40 mL del contenido de la bolsa a un tubo Falcon estéril y se centrifugó a 1500 xg durante 5 min a 4°C, para lograr separar las fracciones proteínica y grasa de las células de los microorganismos presentes en el queso. Posteriormente se tomaron 2.5 mL de la fase intermedia (microorganismos presentes en el queso resuspendidas en citrato de sodio), atravesando la capa de grasa y cuidando de no mezclar las fases y se inocularon 25 mL de caldo Fraser. Este paso se realizó por duplicado para cada muestra de queso Cotija. Se incubó a 48 h, 37°C, 250 rpm. Se inactivó por calor a 80°C por 20 min, después se centrifugó a 10,000 xg durante 10 min a 4°C para obtener el paquete celular, posteriormente se resuspendió el paquete en 300 µL de solución salina pH 7 (0.85% NaCl) estéril y se transfirió a un



microtubo de 2 mL estéril, se lavó el tubo Falcon con 200 μ L de la solución salina estéril y se transfirió al mismo microtubo para tener un volumen final de 500 μ L, se centrifugó a 10,000 xg durante 10 min a 4°C, y se eliminó el sobrenadante, se realizaron tres lavados al paquete celular con 500 μ L de solución salina estéril, el paquete celular recuperado se conservó a -20°C hasta la posterior extracción de ADN (ver protocolo correspondiente).

6.5 Recuperación del paquete celular a partir del queso Cotija inoculado con una cantidad desconocida de *L. monocytogenes*

Para verificar que el método de extracción y purificación de ADN obtenido a partir del queso Cotija era adecuado, se realizaron pruebas donde intencionalmente se inoculó un queso Cotija con *Listeria monocytogenes*. El procedimiento experimental empleado se describe a continuación:

La muestra de queso Cotija se descongeló en refrigeración a 4°C por no más de 18 horas según lo establecido en la norma NOM-110-SSA1-1994 antes de ser utilizada.

En condiciones asépticas, se pesaron 25 g de queso Cotija dentro de una bolsa para el equipo Stomacher (Seward), se adicionaron 225 mL de citrato de sodio (al 2 % pH 8) y 1 mL de neutrasas (Novo Nordisk), lo anterior con el fin de romper la red proteínica del queso. Posteriormente se incubó 1 h a 45°C. Se adicionaron 5 mL de solución salina estéril pH 7 (0.85 % NaCl) con paquete celular de *L. monocytogenes* resuspendido a la bolsa que contenía el queso Cotija y el citrato de sodio. El paquete celular se obtuvo cultivando a *Listeria monocytogenes* en caldo Fraser durante 48 horas, 37°C, 250 rpm. Se inactivó el microorganismo por calor a 80°C, 20 min y se transfirió el cultivo desactivado a un tubo Falcon estéril, se centrifugó a 10,000 xg durante 10 min a 4°C. Posteriormente se eliminó la fase acuosa (medio de cultivo), se lavó el pellet celular con 500 μ L de solución salina estéril, se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones, se eliminó la fase acuosa y se resuspendió el paquete celular en 5 mL de solución salina estéril. Para llevar a cabo una ruptura mecánica de la matriz del queso, se homogenizó el paquete celular obtenido en el Stomacher 5 minutos a velocidad alta. Se vertieron 225 mL del contenido de la bolsa a 5 tubos Falcon estériles y se centrifugaron a 1500 xg durante 10 min a 4°C. Esto con el fin de



separar las fracciones proteínica, y grasa, de las células de los microorganismos presentes en el queso. Posteriormente de cada tubo Falcon se tomaron 30 mL de la fase intermedia (microorganismos presentes en el queso resuspendidas en citrato de sodio) atravesando la capa de grasa y cuidando de no mezclar las fases, y se transfirieron a otros tubos Falcon estériles. Los cuales se centrifugaron a 10,000 xg durante 10 min a 4°C para obtener el paquete celular. Estos paquetes se re-suspendieron en 300 µL de solución salina estéril y se transfirieron a un microtubo de 2 mL estéril. Los tubos Falcon se lavaron con 100 µL de la solución salina estéril y se transfirieron al mismo microtubo para tener un volumen final de 2 mL. Se centrifugó a 10,000 xg durante 10 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante.

Finalmente, se realizaron tres lavados al paquete celular con 500 µL de solución salina estéril, y el paquete celular recuperado se conservó a -20°C hasta la posterior extracción de ADN (punto 6.7).

6.6 Limite de detección del método de enriquecimiento y PCR tiempo real

Con el fin de determinar cuál era la mínima cantidad de *Listeria monocytogenes* que podía ser detectada por la metodología propuesta, se decidió inocular una muestra de queso Cotija con una cantidad de unidades formadoras de colonia (UFC) conocida y viable. Empleando el siguiente procedimiento experimental, el cual se divide en dos etapas: La primera tuvo como objetivo contar cuantas UFC se tenían en diluciones consecutivas de la suspensión de 3 colonias cultivadas en medio sólido. A partir de un cultivo puro y fresco de *Listeria monocytogenes* se tomaron 3 colonias y se resuspendieron en 10 mL de solución salina pH 7 (0.85 % NaCl) estéril (dilución 1×10^{-1}). Se tomó 1 mL de la dilución anterior y se resuspendió en 9 mL de solución salina estéril, (dilución 1×10^{-2}). De la dilución anterior se realizaron diluciones decimales consecutivas hasta 1×10^{-7} . De las diluciones (1×10^{-5} , 1×10^{-6} y 1×10^{-7}) se tomaron 1 mL y se colocaron en una caja petri estéril. Posteriormente se vertieron 15 mL de agar BHI estéril y homogenizó (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). El procedimiento descrito se llevó a cabo por duplicado. Se incubaron las cajas petri en forma invertida por 24 h. Se realizó conteo de UFC.



En la segunda etapa se siguió el protocolo de recuperación del paquete celular a partir del queso para obtener la fase intermedia (microorganismos que se encuentran presentes en el queso resuspendidas en citrato de sodio).

Posteriormente de la dilución 1×10^{-5} se inocularon 6 tubos, de los cuales:

A) Dos tubos Falcon con 25 mL de medio de cultivo Fraser con 2.5 mL de la fase intermedia del queso, se inocularon con 1 mL de la dilución. Se inactivaron por calor a 80°C por 20 min y después se centrifugaron a 10,000 xg durante 10 min a 4°C para obtener el paquete celular el cual se conservó a -20°C para la posterior extracción de ADN y reacción de PCR en tiempo real.

B) Dos tubos Falcon con 25 mL de medio de cultivo Fraser con 2.5 mL de la fase intermedia del queso, se inocularon con 1 mL de la dilución. Se incubaron 48 h, 37°C , 250 rpm posteriormente se inactivaron por calor a 80°C por 20 min y después se centrifugaron a 10,000 xg durante 10 min a 4°C para obtener el paquete celular el cual se conservó a -20°C para la posterior extracción de ADN y reacción de PCR en tiempo real.

C) Dos tubos Falcon con 25 mL de medio de cultivo Fraser con 1 mL de la dilución. Se incubaron 48 h, 37°C , 250 rpm, posteriormente se inactivaron por calor a 80°C por 20 min y después se centrifugaron a 10,000 xg durante 10 min a 4°C para obtener el paquete celular el cual se conservó a -20°C para la posterior extracción de ADN y reacción de PCR en tiempo real.

De la dilución 1×10^{-6} y 1×10^{-7} se inocularon 4 tubos de los cuales; dos siguieron el protocolo A) y dos el protocolo B), previamente descrito.

6.7 Extracción de ADN

Se empleó un kit comercial de extracción y purificación de ADN (Fast ID (Genetic ID, USA)), basado en la ruptura celular con detergentes iónicos, la purificación se da por unión específica del ADN a una membrana de sílica.



El paquete celular recuperado del queso, del queso inoculado o de las cepas puras, se trató con una solución que contiene: solución de lisis (1 mL), proteinasa K (10 mg/mL) y lisozima (1 mg). Se incubó a 65 °C, 600 rpm, 30 min (Thermomixer, Eppendorf). Se añadió cloroformo en relación 1:1, se agitó vigorosamente y posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min a 4°C. Se separó la fase acuosa superior y se transfirió a un tubo de 2 mL. Se añadió buffer de unión en relación 1:1 y se transfirió a una columna que contiene la membrana de sílica, las cuales previamente se colocaron en un manifold (Quiagen) que es un colector de vacío. Se lavó la columna con buffer de lavado y posteriormente se lavó por triplicado con 400 µL de etanol al 75% y se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min a 4°C, para eliminar sustancias que pudieran inhibir la reacción de PCR y por último se eluyó el ADN con 100 µL de buffer TE 1X a 65 °C (Thermomixer, Eppendorf). El ADN obtenido se conservó a -20 °C hasta su uso.

6.8 Cuantificación de ADN en las muestras

Se realizó la medición de la concentración de ADN de cada una de las muestras [Equipo Epoch, BioTek], utilizando el formato “Take 3”, este equipo nos proporcionó concentración de ADN, absorbancia a 260 nm y 280 nm, índice de pureza, y los gráficos de absorbancia.

6.9 Condiciones de PCR punto final

Las reacciones de PCR fueron realizadas utilizando 100 ng de ADN por reacción. Se realizó la amplificación de la región V3 del gen ADNr 16S.

Para la amplificación de la región V3, se utilizaron los cebadores universales 338f y 518r mostrados en la Tabla 3.

Tabla 3. Características de los cebadores universales 338f y 518r.

Cebador	Secuencia	Posición	Región
338f	5' ACTCCTACGGGAGGCAGC 3'	338-357	V3 del gen
518r	5' ATTACCGCGGCTGCTGG 3'	518-534	ribosomal 16S

(Ampe *et al.*, 1999; Ercolin, 2004)



Los componentes de reacción se muestran en la Tabla 4.

Mezcla de reacción: 50µL

Tabla 4. Mezclas de reacción para PCR punto final.

Reactivo	Concentración final
Agua DDFE	-----
Buffer Pfu Mg ₂ SO ₄	1X
dNTP's	0.2 mM
Cebador 338f	0.5 µM
Cebador 518r	0.5 µM
Pfu polimerasa	0.5 unidades por reacción
ADN molde	100 ng

*Destilada, desionizada, filtrada y esterilizada

Los tubos de reacción se llenaron con las cantidades indicadas y se corrieron los ciclos mostrados en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones del termociclador (Marca Techgene, Techne).

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94°C	5 min
20	94°C	1 min
	65°C	1 min
10	72°C	3 min
	94°C	1 min
	55°C	1 min
1	72°C	3 min
	72°C	10 min

Tiempo aproximado 2.5 horas

(Ampe *et al.*, 1999; Ercolin, 2004)



Al final de la reacción se obtuvieron amplicones de aproximadamente 220 pb.

Todas las reacciones se corrieron en un termociclador “Techne PCR machine” (Techgene). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% (p/v) comparados frente a un marcador de peso molecular “Low Range” (Thermo Scientific). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV.

6.10 Condiciones de PCR tiempo real

Las reacciones de PCR fueron realizadas utilizando 50 ng de ADN molde por reacción.

Se hizo la mezcla de reacción con la master mix TaqMan PCR (Life Technologies) y el “Gene Expression Assay” en un volumen final de 20 μ L. Las condiciones y los componentes de reacción se encuentran detallados en las Tablas 6 y 7.

La master mix TaqMan contiene ADN polimerasa, ultra pura (UP), uracilo-ADN glicosilasa (UDG) una mezcla de dNTP’s con dTTP/dUTP, con una referencia pasiva ROX.

El “Gene Expression Assay” (Mezcla Stock) consiste en un par de cebadores no marcados para PCR y una sonda TaqMan etiquetada en el extremo 5’ con un fluoróforo (FAM o VIC) y un apagador no fluorescente en el extremo 3’.

Tabla 6. Mezcla de reacción para qPCR uniplex con “Gene Expression Assay” (Life Technologies).

Reactivo	C inicial	C final
Agua	--	--
Master mix	2X	1X
Mezcla Stock (Cebador Directo, Cebador Inverso y sonda)	20X	1X

Todas las reacciones se corrieron en el equipo de tiempo real 7500 de Applied Biosystems (ABI). Para cada muestra de queso, se hace el análisis por cuadruplicado.

**Tabla 7. Condiciones de amplificación para qPCR (Termociclador Applied Biosystems 7500).**

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	50°C	2 min
1	95°C	10 min
40 ciclos	95°C	15 s
	60°C	1 min

Tiempo aproximado 1.5 horas

6.11 Procesamiento de muestras de queso Cotija

Para realizar el análisis microbiológico a las 95 muestras de queso Cotija se realizó disminución de partícula empleando el siguiente protocolo:

Limpieza del equipo

Se lavó el procesador, tabla, cuchillos, cucharas, con agua y jabón. Se sumergieron 5 minutos, en una solución de hipoclorito al 1%. Se sacaron los materiales de la solución de hipoclorito y se les roció etanol al 70% con ayuda de un atomizador. Posteriormente el material se expuso con luz UV durante 5 minutos.

Procesamiento del queso

Se cortó la corteza del queso. Se cortó el interior del queso en pedazos más pequeños (el cuchillo que se utilizó para retirar la corteza fue diferente al que se utilizó para cortar el interior del queso). Posteriormente se homogenizó el resto del queso con un procesador de alimentos. Se procesaron de 100 g cada vez. Se vació el queso procesado en una bolsa Ziploc (se trató de tener el mínimo contacto con el queso, así que nos ayudamos con las cucharas que previamente se esterilizaron). Todo el procedimiento, se llevó a cabo dentro de la campana.

Se tomaron cinco submuestras de 25 g para su posterior análisis. Todo el material quedó resguardado, en un congelador a -70° C.



7. Resultados y discusión

Los resultados y su análisis se presentan en dos partes:

La primera etapa consiste en la prueba de especificidad de los cebadores, la confirmación de que el método de extracción de ADN es conveniente para la obtención de ADN de calidad amplificable, la sensibilidad del método y el límite de detección.

La segunda etapa consiste en el análisis a las 95 muestras del queso Cotija región de origen.

7.1 Selección de cebadores

Anteriormente se mencionó que para la detección de *Listeria monocytogenes* se buscaron cebadores que fueran específicos para esta especie. Los cebadores y sonda que se diseñaron en el grupo de trabajo para PCR en tiempo real se analizaron en el programa “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) del “National Center for Biotechnological Information” (NCBI), el cual contiene una extensa base de datos genómicos tanto de microorganismos como organismos superiores. Al introducir la secuencia de interés el programa despliega una lista de genes relacionadas con dicha secuencia, el porcentaje de identidad y el valor E (expectancia); el valor E indica la probabilidad de que el alineamiento se haya dado 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.

El resultado de expectancia para el juego de cebadores y sonda diseñados para la detección específica de *Listeria monocytogenes* fue de $8e^{-29}$ con una identidad del 100%. En la Figura 7 se muestra el BLAST correspondiente.

Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
Listeria monocytogenes strain L312, serotype 4b	<u>134</u>	134	100%	8e-29	100%
Listeria monocytogenes serotype 7 str. SLCC2482 complete	<u>134</u>	134	100%	8e-29	100%
Listeria monocytogenes strain SLCC2755, serotype 1/2b	<u>134</u>	134	100%	8e-29	100%
Listeria monocytogenes strain SLCC2540, serotype 3b	<u>134</u>	134	100%	8e-29	100%
Listeria monocytogenes strain SLCC2378, serotype 4e	<u>134</u>	134	100%	8e-29	100%
Listeria monocytogenes strain ATCC 19117, serotype 4d	<u>134</u>	134	100%	8e-29	100%
Listeria monocytogenes 07PF0776, complete genome	<u>134</u>	134	100%	8e-29	100%

Figura 7. Información obtenida del programa “BLAST” de los cebadores y sonda específicos para *L. monocytogenes*.



7.2. Calidad y cuantificación de ADN extraído.

Como se sabe, el queso representa una matriz alimenticia compleja por lo cual el método empleado para la extracción del material genético debe de ser eficiente y práctico. La evaluación del ADN extraído mediante espectrofotometría (A_{260}/A_{280}) nos da una idea sobre la calidad del ADN purificado; un valor menor a 1.8 indica una extracción deficiente debido al alto contenido de proteína. Es necesario tener la certeza de que el ADN usado está libre de estos compuestos, ya que estos pueden interferir en la PCR (Sambrook *et al.* 1989).

En la Tabla 8, se muestra un ejemplo de valores espectrofotométricos de las extracciones realizadas a cepas puras, muestras y muestras inoculadas. Así mismo, en el ANEXO 2 se muestran los datos de concentración de todas las muestras de ADN obtenido.

Tabla 8. Alguno valores espectrofotométricos obtenidos para las extracciones realizadas con el KIT de extracción y purificación de ADN FAST ID

Muestra	A 260	A 280	A 260/280	[ADN] (ng/ μ L)
Q.C. 1a	0.064	0.03	2.13	64.073
Q.C. 10a	0.006	0.001	6.00	9.78
Q.C. 20a	0.032	0.012	2.67	30.424
Q.C. 30a	0.048	0.024	2.00	48.21
Q.C. 40a	0.016	0.007	2.29	14.742
Q.C. 83b	0.011	0.005	2.20	11.10
Q.C. 91a	0.005	0.001	5.00	12.08
<i>L. monocytogenes</i>	0.035	0.017	2.06	34.71
Queso inoculado	0.023	0.012	1.92	22.89

Aquellas muestras con valores superiores a 10 ng/ μ L fueron diluidas antes de utilizarse en la reacción de PCR.

Para complementar el análisis de la calidad de ADN el equipo nos proporciona un gráfico del barrido de absorbancia (Abs) de 220 a 320 nm. El gráfico nos indica en que nm hay mayor absorbancia, las absorbancias que más nos interesan son las de 260nm (nucleótidos) y 280nm (proteínas) que nos ayuda a observar el índice de pureza a partir del valor de la



relación Abs260/Abs280. En la Figura 8 se muestra un ejemplo de la gráfica de absorbancia de uno de los ADN analizados.

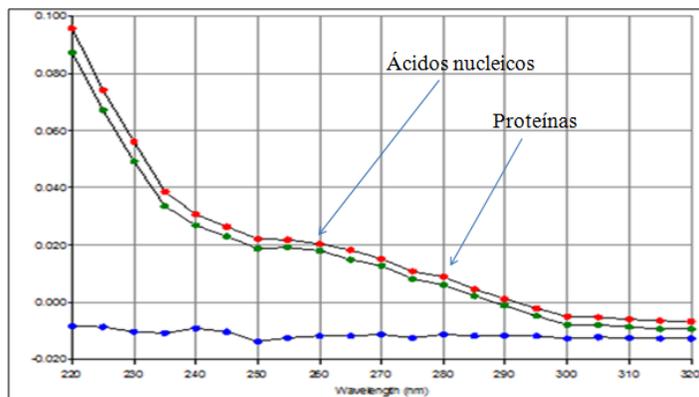


Figura 8. Gráfico de absorbancia del ADN; Las línea con puntos azules es el blanco (Agua DDFE) y las líneas con puntos verde y rojos muestra la Absorbancia a diferentes nm del ADN analizado, las absorbancias que más nos interesan son las de 260nm (nucleótidos) y 280nm (proteínas) que nos ayuda a observar el índice de pureza. Como se puede observar hay mayor absorbancia a 260nm que a 280nm.

Los cocientes A_{260}/A_{280} mayores a 2 que se reportan, pueden deberse a errores en la cuantificación espectrofotométrica. Debido a que al ser utilizados como molde de reacción, funcionaron adecuadamente para la amplificación del gen r16S.

7.3. Visualización de los productos de PCR

En el siguiente apartado se describen los resultados obtenidos utilizando la técnica de PCR para cepas puras y muestras de queso Cotija. Se utilizaron blancos para asegurar que los reactivos no se encontraban contaminados con ADN del microorganismo a detectar.

Interpretación de resultados del PCR en tiempo real. En las Figuras 9 y 10 se muestran cinéticas de amplificación típicas.

En el PCR en tiempo real, la amplificación de cualquier ADN molde es definida por 4 fases: 1.-Línea base, 2.- Fase exponencial; 3.-Fase lineal y 4.-Fase plana. La línea base contiene toda la amplificación que está por debajo del nivel de detección del equipo de tiempo real. En la fase exponencial está compuesta de las primeras señales detectables



donde la amplificación se está llevando a cabo en su velocidad máxima exponencial. En la fase lineal, la eficiencia de la amplificación comienza a disminuir. En la fase plana, es donde la amplificación rápidamente cesa para el resto de los ciclos del experimento (Dorak, 2006). Los datos con los que se trabajan, se adquieren cuando la amplificación está en la fase exponencial. Esto está determinado por la identificación del número de ciclo al cual la intensidad de emisión del fluoróforo estadísticamente diferente con respecto al ruido de fondo (background). Este número de ciclo se llama ciclo umbral (Ct: thresholdcycle). El Ct está determinado en la fase exponencial de la reacción y es más confiable que las mediciones en el punto final convencionales. El Ct es inversamente proporcional al número de copias del ADN blanco: a mayor concentración de blanco, menor Ct.

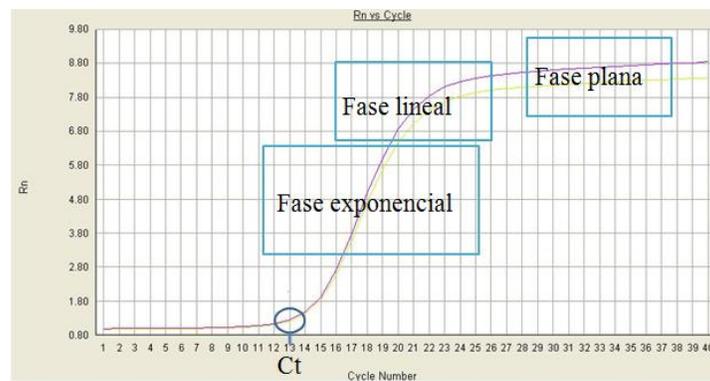


Figura 9. Gráfica de amplificación por PCR en tiempo real en escala lineal (Rn vs ciclo).

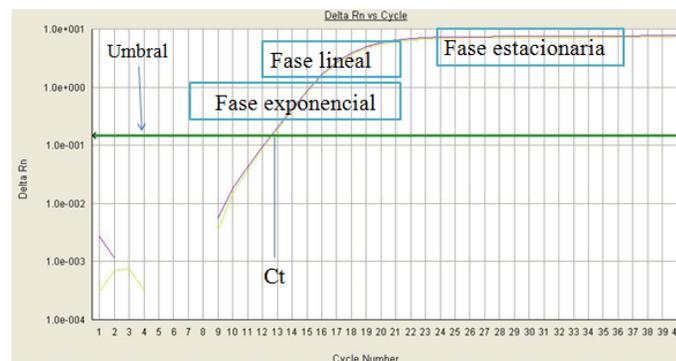


Figura 10. Gráfica de amplificación por PCR en tiempo real en escala logarítmica (Delta Rn vs ciclo).



7.3.1 Especificidad de cebadores con *L. monocytogenes* y otros patógenos.

Para determinar la especificidad de los cebadores diseñados, se realizaron pruebas con cepas puras, donde se utilizaron cepas de colección de *Listeria monocytogenes* como controles positivos. Las cepas de microorganismos que se han aislado previamente en el laboratorio del queso Cotija (*Enterococcus faecalis*) y las cepas de colección de otros patógenos que también son de interés (*Brucella abortus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* Typhimurium, *Mycobacterium bovis* y *Listeria innocua*) se utilizaron como controles negativos.

En la Figura 11 se observa que los cebadores son específicos para *L. monocytogenes* ya que para éste hay amplificación en un Ct de 12.5 y 15, y para los controles negativos o no hubo amplificación o ésta fue en ciclos mayores a 30. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Resultados de las cepas control

Microorganismo	Ct
<i>Listeria monocytogenes</i>	12.5 y 15
<i>Listeria innocua</i>	NA
<i>Staphylococcus aureus</i>	31
<i>Salmonella entérica</i> Typhimurium	34.5
<i>Brucella abortus</i>	35.5
<i>Mycobacterium bovis</i>	37
<i>Enterococcus faecalis</i>	32
<i>Escherichia coli</i>	37.5

NA: No amplificó

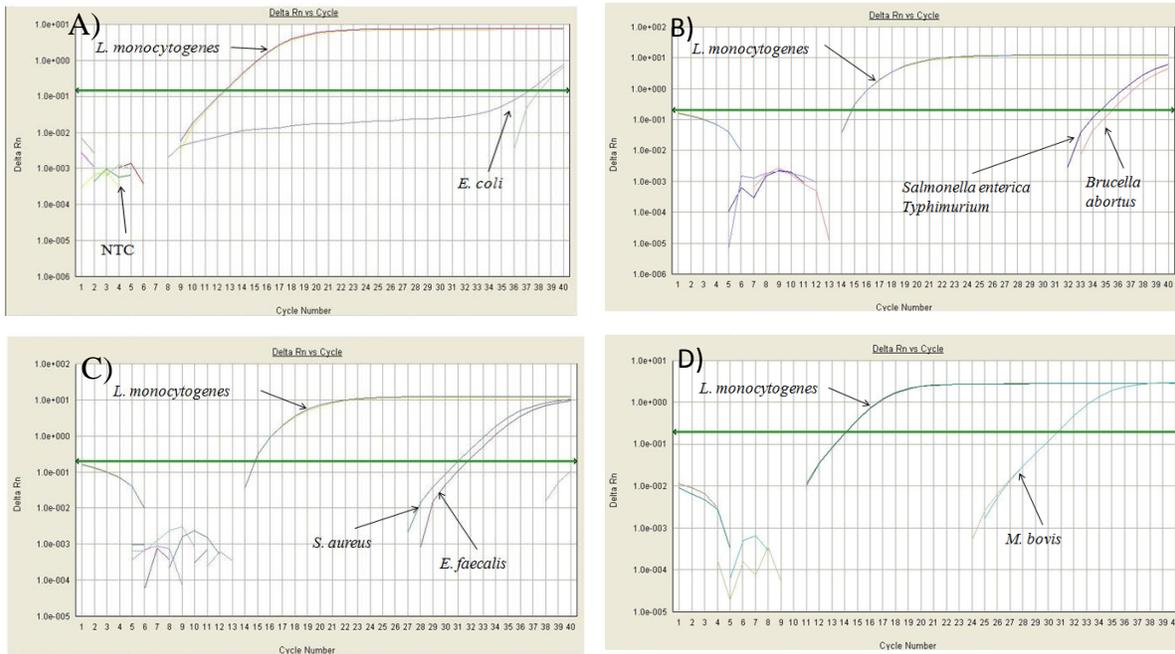


Figura 11. Gráficas de amplificación por PCR en tiempo real en escala logarítmica. A) control positivo de ADN (*L. monocytogenes*), NTC y control negativo de ADN *E. coli*. B) control positivo de ADN (*L. monocytogenes*) y controles negativos de ADN (*Salmonella enterica Typhimurium* y *Brucella abortus*). C) Control positivo de ADN (*L. monocytogenes*), y controles negativos de ADN (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*). D) Control positivo de ADN (*L. monocytogenes*) y control negativo de ADN *Mycobacterium bovis*.

Probablemente estas amplificaciones mayores a un Ct de 30 se pueden deber a una amplificación no específica ocasionada por un ADN artefacto generado después de muchos ciclos de amplificación. A éste también se le conoce como ADN quimérico (Dieffenbach & Dueksler, 2003).

7.4. Queso inoculado con *L. monocytogenes* inactivada.

La siguiente prueba se llevó a cabo para verificar que el método de extracción y purificación de ADN era adecuado para que la amplificación del gen blanco no se viera afectada por los componentes del queso. Para lo cual, se inoculó una muestra de queso Cotija (libre del patógeno de interés) con *L. monocytogenes*. Se siguió el protocolo de extracción de ADN establecido (Sección 6.5 de metodología) y se realizó la reacción de PCR por duplicado.



Como se observa en la Figura 12, el método de extracción y purificación de ADN es adecuado, la amplificación de los genes blanco no se ve afectada por los componentes del queso Cotija, ya que el ADN extraído de la cepa pura tienen un Ct de 13.75 y 14.9, cercano al Ct obtenido del queso Cotija inoculado Ct de 16.5, observamos que no hay inhibidores en la reacción de PCR en tiempo real.

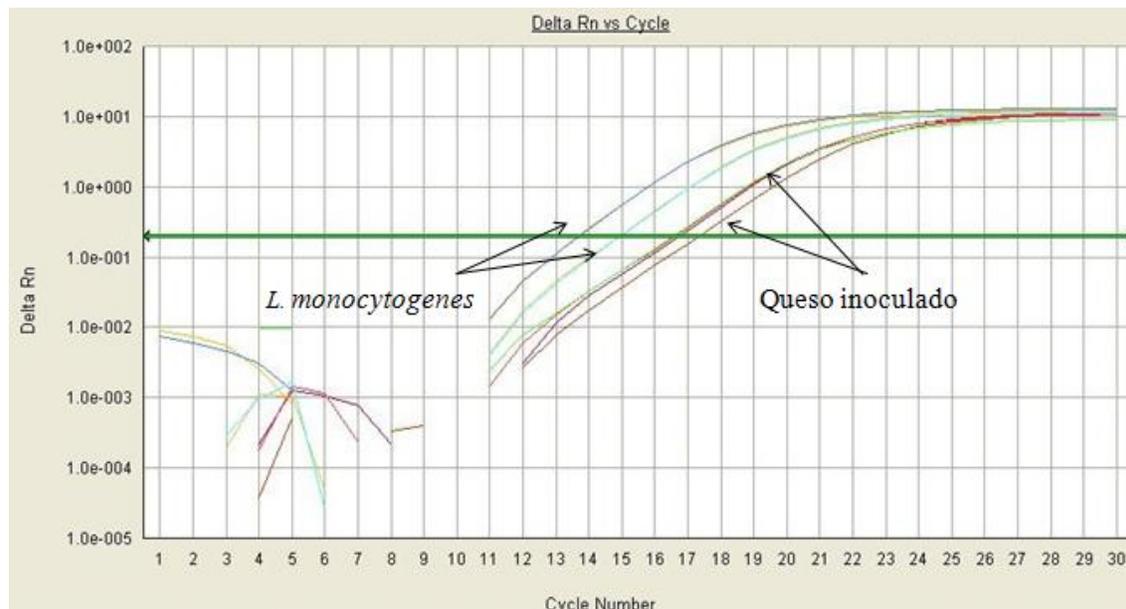


Figura 12. Gráfica de amplificación por PCR en tiempo real en escala logarítmica de ADN de *L. monocytogenes* y de ADN del queso inoculado con *L. monocytogenes*.

7.5. Queso inoculado con *L. monocytogenes* viable

Con el fin de determinar cuál era el Ct correspondiente a la mínima cantidad de UFC detectables por este método, se decidió inocular una muestra de queso Cotija con una cantidad de unidades formadoras de colonia (UFC) conocidas y viables. (Sección 6.6 de metodología) Se siguió el protocolo recuperación del paquete celular a partir de queso Cotija inoculado con una cantidad conocida de inóculo, posteriormente una etapa de enriquecimiento.



El conteo de UFC a las 24 hrs, y los Cts obtenidos en el PCR tiempo real se muestran a detalle en la Tabla 10.

Tabla 10. UFC y Cts de los quesos inoculados con *L. monocytogenes* viable.

Diluciones	1×10^{-5}	1×10^{-6}	1×10^{-7}
UFC (conteo a las 24 hrs)	204	24	3
Ct queso Cotija, inoculado (con <i>L. monocytogenes</i>), enriquecido.	13.06	13.38	14
Ct queso Cotija, inoculado (con <i>L. monocytogenes</i>) sin enriquecer.	22.5	23.5	24.5
Ct <i>L. monocytogenes</i> cepa pura enriquecida	11		

Como se puede observar en la Tabla 10 y en la Figura 13, comparando los Cts de amplificación obtenidos, el paso de enriquecimiento es indispensable para detectar a *L. monocytogenes* viable.

Independientemente del orden de magnitud de las UFC inoculadas, éstas aumentan en número con la consecuente disminución de Ct, hasta un valor similar al de la cepa pura (Ct 11).

La mínima cantidad de bacterias cuantificadas (3 UFC) correspondió a la dilución 1×10^{-7} y para estas su valor de Ct fue 24.5 (Tabla 10), por lo cual se consideró como negativa una amplificación mayor a este Ct.

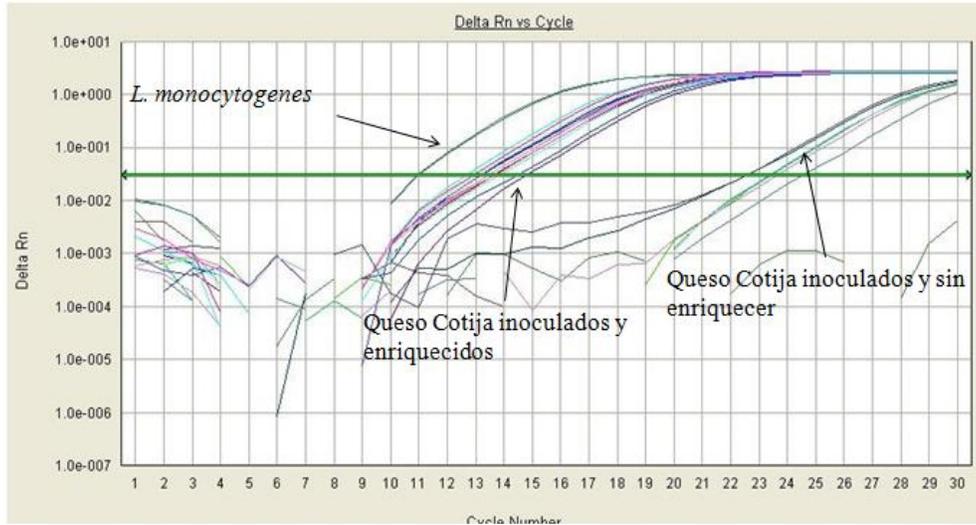


Figura 13. Gráfica de amplificación por PCR en tiempo real en escala logarítmica de ADN de *L. monocytogenes*, ADN del queso Cotija inoculado y enriquecido, ADN del queso Cotija inoculado sin enriquecer y ADN de queso Cotija.

7.6. Análisis de muestras de queso Cotija Región de Origen.

7.6.1. Análisis visual de las muestras de queso Cotija.

A las 95 muestras de queso Cotija que se colectaron de la Región de Origen, primero se analizaron visualmente, esto quiere decir comprobar la presencia de materia extraña, un color diferente al característico.

En la Tabla 11 se resume el análisis visual a las muestras de queso Cotija. Es importante mencionar que para este análisis se considera la parte interna del queso, que es la parte que se ingiere. El análisis se encuentra más detallado en el ANEXO 3.

Con los resultados mostrados en la Tabla 11 se puede decir que la mayoría de los productores llevan a cabo buenas prácticas de manufactura ya que de las 95 muestras sólo 14 tienen materia extraña o un color diferente al característico, lo que representa el 14.7%.



Tabla 11. Análisis visual de las muestras de queso Cotija.

Muestras de queso Cotija que tenían materia extraña.	Q. C. 8 cabello
	Q.C. 9 hilo negro
	Q.C. 20 cabello
	Q.C. 26 hilo negro
	Q.C. 34 astillas
	Q.C. 37 mosquito, cabello, fibra de escobillón
	Q.C 39 cabello
	Q.C. 86 cabello
Muestras de queso Cotija que tenían manchas en el interior	Q.C. 20 manchas rosas
	Q.C. 38 manchas negras
	Q.C. 55 ligera mancha café
	Q.C. 63 manchas amarillas (color mostaza)
	Q.C. 69 mancha café
	Q.C. 72 manchas verdes
	Q.C. 80 algunas partes manchas naranjas

En la Figura 14 se observan algunas fotos que fueron tomadas a las muestras que tenían materia extraña o alguna mancha.

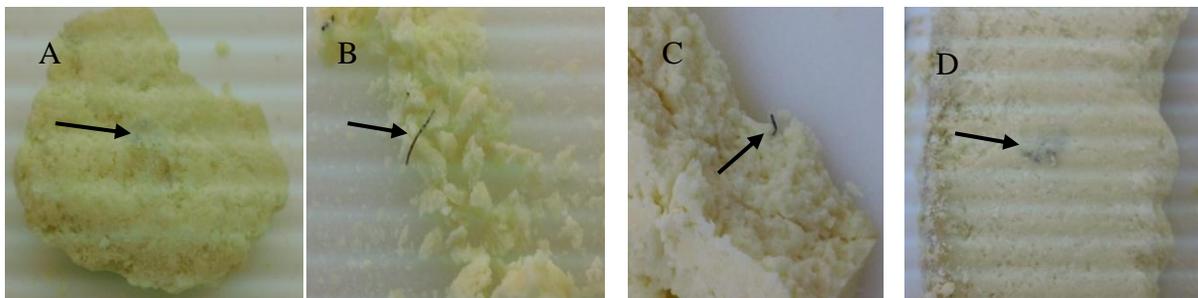


Figura 14. Muestras de queso Cotija con materia extraña y manchas; A mancha verde; B hilo negro; C fibra de escobillón; D mancha negra.



7.6.2 Análisis de presencia o ausencia de *L. monocytogenes* en las muestras de queso Cotija.

Para analizar la presencia o ausencia de *L. monocytogenes* en el queso Cotija se llevó a cabo el método de extracción de ADN a partir de la muestra de queso homogenizada. Es importante mencionar que para cada muestra de queso, éste se siembra en dos tubos separados con medio de enriquecimiento. De cada uno de éstos se hace una extracción de ADN, y de cada extracción se hace la reacción de PCR por duplicado. De tal forma que de cada queso se hace el análisis por cuadruplicado.

El ADN extraído de las muestras de queso Cotija se cuantificó y se verificó su calidad como se menciona en el punto 7.2.

7.6.2.1 Amplificación de la región V3 del gen ribosomal 16S por punto final a partir del ADN extraído de las muestras de queso Cotija

Para comprobar la calidad de amplificación del ADN obtenido, se realizó la amplificación de la región V3 del gen ribosomal 16S, el cual es un gen universal ya que se encuentra conservado entre todas las especies bacterianas; se seleccionaron al azar 25 extracciones de ADN de un total de 190.

Las muestras que se analizaron por PCR punto final fueron: 1b, 17b, 20b, 23a, 26b, 30a, 34a, 38a, 41a, 43a, 43b, 45a, 52a, 54b, 60a, 63a, 67a, 70a, 75b, 80a, 81b, 85a, 87a, 92b, 95a.

En las Figuras 15, 16 y 17 se muestran las electroforesis del ADN amplificado en gel de agarosa.

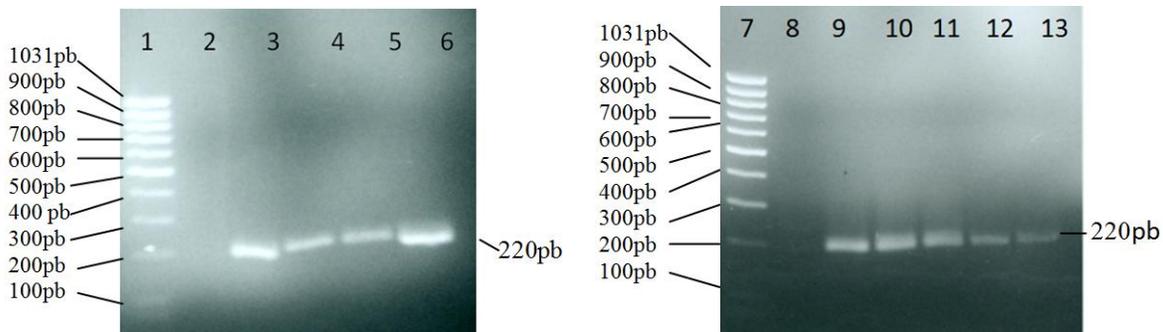


Figura 15. Amplicón de la región V3 del gen ribosomal 16S a partir del ADN extraído de las muestras de queso Cotija. Electroforesis de ADN amplificado en gel de agarosa al 2%. Los carriles 1 y 7 es el marcador de bajo rango (Thermo Scientific), carriles 2 y 8 blanco, carril 3 ADN Q.C. 1b, carril 4 ADN Q.C. 17b, carril 5 ADN Q.C. 20b, Carril 6 ADN *L. monocytogenes*, carril 9 ADN Q.C. 26b, carril 10 ADN Q.C.41a, carril 11 ADN Q.C. 12a, carril 12 *L. innocua*, carril 13 ADN Q.C. *L. monocytogenes*; tamaño de amplicón 220pb.

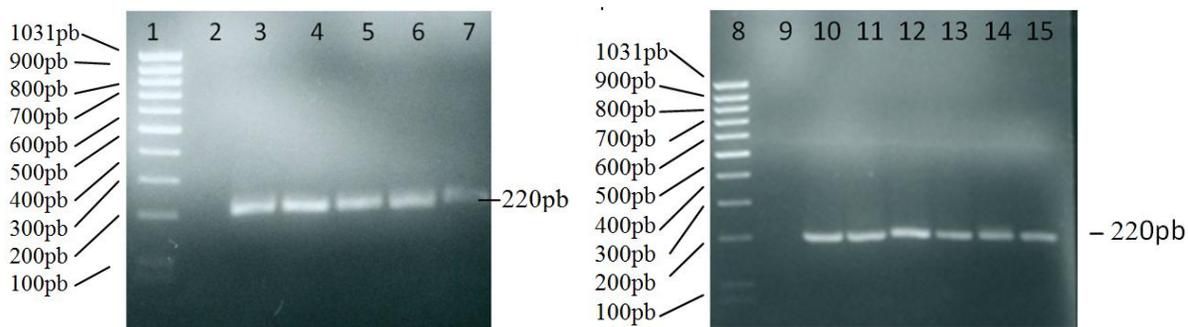


Figura 16. Amplicón de la región V3 del gen ribosomal 16S a partir del ADN extraído de las muestras de queso Cotija. Electroforesis de ADN amplificado en gel de agarosa al 2%. Los carriles 1 y 8 es el marcador de bajo rango (Thermo Scientific), carriles 2 y 9 blanco, carril 3 ADN Q.C. 23a, carril 4 ADN Q.C.30a, carril 5 ADN Q.C. 34a, carril 6 ADN Q.C. 38a, carril 7 ADN *L. monocytogenes*, carril 10 ADN Q.C. 43b, carril 11 ADN Q.C.45a, carril 12 ADN Q.C. 52a, Carril 13 ADN Q.C. 54b, carril 14 ADN Q.C. 60a, carril 15 ADN de *L. innocua*; tamaño de amplicón 220pb.

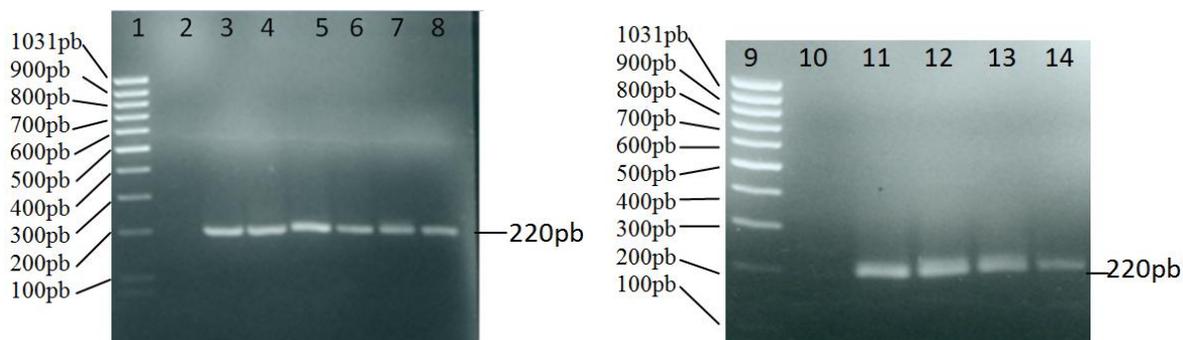


Figura 17. Amplicón de la región V3 del gen ribosomal 16S a partir del ADN extraído de las muestras de queso Cotija. Electroforesis de ADN amplificado en gel de agarosa al 2%. Los carriles 1 y 9 es el marcador de bajo rango (Thermo Scientific), carriles 2 y 10 blanco, carril 3 ADN Q.C. 63a, carril 4 ADN Q.C.67a, carril 5 ADN Q.C. 70a, Carril 6 ADN Q.C. 75b, carril 7 ADN Q.C. 80a, carril 8 ADN Q.C. 81b, carril 11 ADN Q.C. 85a, carril 12 ADN Q.C. 87a, carril 13 ADN Q.C. 92b, carril 14 ADN Q.C. 95a, tamaño de amplicón 220pb.

En todos los casos fue posible obtener el amplicón de 220 pb característico de dicha región, con lo que se demuestra que en el medio de enriquecimiento se ha obtenido el crecimiento de biomasa (ya que no es un medio selectivo) y que el ADN extraído de ésta tiene la capacidad para ser amplificado, por lo tanto no presenta inhibidores de la reacción de PCR a pesar de que en algunos de los casos la relación A_{260}/A_{280} tenía un valor fuera del rango óptimo.

7.6.2.2 Análisis de las muestras por PCR en tiempo real del gen específico para *L. monocytogenes*.

Listeria monocytogenes es un patógeno importante transmitido por los alimentos y su presencia es ampliamente analizada en alimentos.

En la identificación tradicional participan los métodos de cultivo basados en el enriquecimiento selectivo seguido de la caracterización de *Listeria* spp., basado en la morfología de colonia, la fermentación de azúcares y las propiedades hemolíticas. Estos



métodos son ampliamente utilizados, pero tienen el inconveniente de que son laboriosos, por lo que la identificación toma varios días.

Como resultado de pruebas más rápidas se desarrollaron métodos basándose en reacciones con anticuerpos (ELISA) o técnicas de hibridación molecular (PCR o ADN). Si bien estas pruebas poseen la misma sensibilidad, son más rápidas.

En este proyecto se decidió trabajar con la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). En el procedimiento experimental se incluyó un enriquecimiento de la muestra para garantizar la detección de *L. monocytogenes* en caso de que las células viables se encontraran en bajas concentraciones.

Es importante mencionar que las enfermedades transmitidas por el consumo de quesos madurados son escasas, la razón puede deberse a que la microbiota presente en la leche cruda compite con las bacterias patógenas reduciendo la biodisponibilidad de metabolitos o bien inhibiendo su actividad mediante la acción de las bacteriocinas que son capaces de sintetizar las bacterias lácticas. Asociado a una disminución del a_w y aumento en la acidez del medio.

En el caso del queso Cotija se ha reportado que la microbiota del queso Cotija cambia durante su maduración y que después de 3 meses no se encuentran levaduras y los coliformes están en cuentas aceptables, además que predominan las bacterias lácticas pertenecientes al género de enterococos (Bravo, 2008).

Se han encontrado *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* y se ha hallado que pueden sintetizar compuestos antibacterianos, además se ha comprobado su actividad antibacteriana contra *L. monocytogenes* (Olvera García, 2010).

Los quesos madurados poseen características poco favorables para el desarrollo de bacterias patógenas; algunos de los factores que influyen en la presencia y sobrevivencia de patógenos en el queso son: la acidez del producto, el contenido de sal, el agua a_w y lo que limita el número de microorganismos que son capaces de sobrevivir a las operaciones del proceso.



Conforme a la novena edición del manual de Bergey's de Bacteriología sistemática, *L. monocytogenes* puede crecer en un rango de pH de 5.6 a 9.6 (Ryser, 1991), si se tomara en cuenta solo el pH en el queso Cotija se podría decir que sí podría crecer, ya que el queso Cotija tiene un pH 4.8 a 5.2 (Hernández, 2007).

El queso Cotija posee de 2.5 a 3 % de sal (Hernández, 2007), por lo que la presencia de *L. monocytogenes* no se descartaría ya que de acuerdo con el manual de Bergey, puede crecer en caldo nutritivo suplementado con 10% NaCl, estudios por Brzin demostraron que *L. monocytogenes* se somete a varios cambios morfológicos cuando se encuentra a altas concentraciones de NaCl. A una concentración de 8-9% encontraron que la multiplicación de células fue inhibida (Ryser, 1991).

El queso Cotija tiene un porcentaje de acidez de 0.2 a 0.32% (ácido láctico) (Hernández, 2007), se ha encontrado que la acidez en el medio puede inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes*. De acuerdo a Ahamand y Marth (Ryser, 1991), realizaron un estudio de *L. monocytogenes* a diferentes concentraciones de ácido láctico 0.1%, 0.3% y 0.5% y en un rango 7 a 35°C. Los resultados mostraron que con 0.1% de ácido láctico, *L. monocytogenes* puede crecer excepto en la temperatura de 7°C y en las concentraciones de 0.3% y 0.5% donde *L. monocytogenes* es parcialmente inactivada durante una incubación prolongada.

El requisito de humedad para el crecimiento microbiano se expresa mejor en términos de actividad acuosa, que se define como la relación de la presión de vapor de agua de un alimento a la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura. Como varias especies bacterianas *L. monocytogenes* crece óptimamente a un a_w 0.97 pero no es capaz de crecer a un a_w menor a 0.91 (Ryser, 1991).

De acuerdo a lo anteriormente expuesto de haber contaminación con *L. monocytogenes* en el queso Cotija, ésta podría sobrevivir hasta el momento en que, por efecto de la pérdida de humedad durante la maduración, el valor de a_w disminuyera de 0.9.

Como se observa en las tablas 13, 14, 15, 16, 17 y en las figuras 18, 19, 20, 21 y 22 las 95 muestras de queso están libres de *Listeria monocytogenes*.



Tabla 13. Resultados del análisis de la presencia/ ausencia de *L. monocytogenes* a las muestras de queso Cotija (1-20) por PCR en tiempo real.

Muestra	Promedio
Q.C. 1	NA
Q.C. 2	NA
Q.C. 3	NA
Q.C. 4	NA
Q.C.5	NA
Q.C. 6	NA
Q.C. 7	NA
Q.C. 8	NA
Q.C. 9	NA
Q.C. 10	NA
Q.C. 11	NA
Q.C. 12	NA
Q.C. 13	NA
Q.C. 14	NA
Q.C. 15	28
Q.C. 16	NA
Q.C. 17	NA
Q.C. 18	NA
Q.C. 19	NA
Q.C. 20	NA

Promedio de las 4 replicas

NA= No amplificó

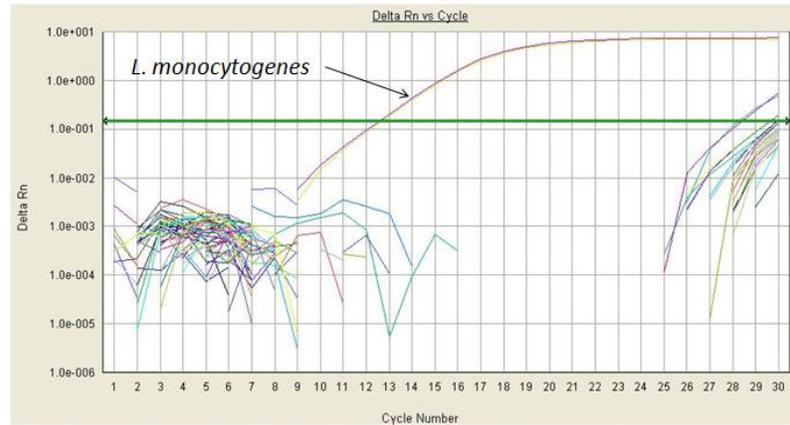


Figura 18. Gráfica de amplificación por PCR en tiempo real en escala logarítmica de ADN de *L. monocytogenes* y ADN de muestras de queso Cotija 1-20.



Tabla 14. Resultados del análisis de la presencia/ausencia de *L. monocytogenes* a las muestras de queso Cotija (20-40) por PCR en tiempo real.

Muestra	Promedio
Q.C. 21	NA
Q.C. 22	NA
Q.C. 23	NA
Q.C. 24	NA
Q.C. 25	NA
Q.C. 26	NA
Q.C. 27	NA
Q.C. 28	NA
Q.C. 29	NA
Q.C. 30	NA
Q.C. 31	NA
Q.C. 32	NA
Q.C. 33	NA
Q.C. 34	NA
Q.C. 35	NA
Q.C. 36	NA
Q.C. 37	NA
Q.C. 38	NA
Q.C. 39	NA
Q.C. 40	NA
Q.C. 41	NA
Q.C. 42	NA
Q.C. 43	NA

Promedio de las 4 replicas.

NA: No amplificó

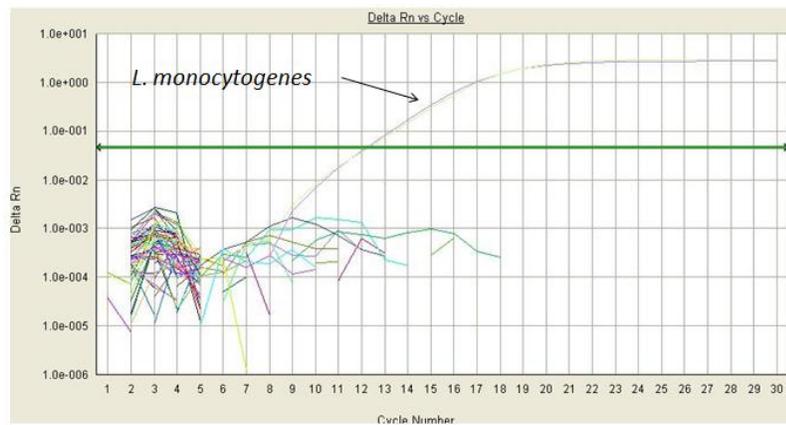


Figura 19. Gráfica de amplificación por PCR en tiempo real en escala logarítmica del ADN de *L. monocytogenes* y ADN de las muestras de queso Cotija (21-43).



Tabla 15. Resultados del análisis de la presencia/ausencia de *L. monocytogenes* a las muestras de queso Cotija (43-60) por PCR en tiempo real.

Muestra	Promedio
Q. C. 44	NA
Q. C 45	NA
Q. C 46	NA
Q. C. 47	NA
Q. C. 48	NA
Q.C 49	NA
Q.C 50	NA
Q.C 51	NA
Q.C. 52	NA
Q.C. 53	NA
Q.C. 54	NA
Q.C. 55	NA
Q.C. 56	NA
Q.C. 57	NA
Q.C. 58	NA
Q.C. 59	NA
Q.C. 60	NA

Promedio de las 4 replicas

NA: No amplificó

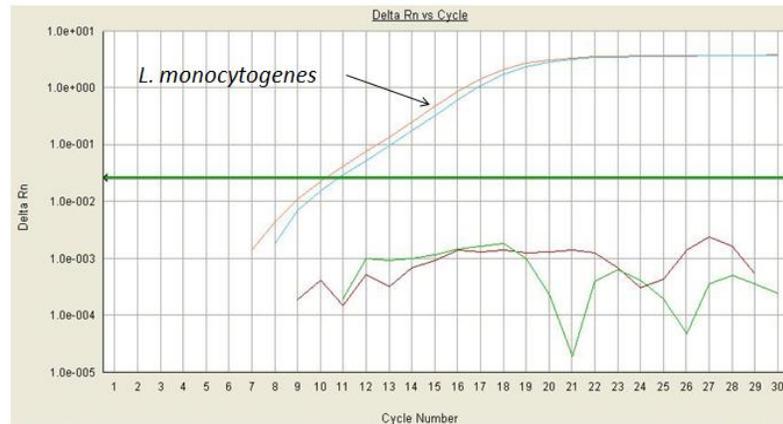


Figura 20. Gráfica de amplificación de PCR en tiempo real en escala logarítmica del ADN de *L. monocytogenes* y ADN de las muestras de queso Cotija (44-60).



Tabla 16. Resultados del análisis de la presencia/ausencia de *L. monocytogenes* a las muestras de queso Cotija (61-80) por PCR en tiempo real.

Muestra	Promedio
Q.C. 61	NA
Q.C. 62	NA
Q.C. 63	NA
Q.C. 64	NA
Q.C. 65	NA
Q.C. 66	NA
Q.C. 67	NA
Q.C. 68	NA
Q.C. 69	NA
Q.C. 70	NA
Q.C. 71	NA
Q.C. 72	NA
Q.C.73	NA
Q.C.74	NA
Q.C. 75	NA
Q.C. 76	NA
Q.C. 77	NA
Q.C. 78	NA
Q.C. 79	NA
Q.C. 80	NA

Promedio de las 4 replicas

NA: No amplificó

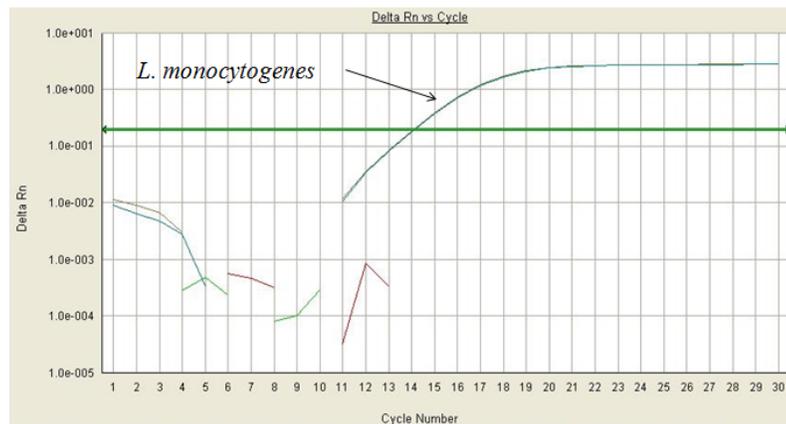


Figura 21. Gráfica de amplificación por PCR en tiempo real en escala logarítmica del ADN de *L. monocytogenes* y ADN de las muestras de queso Cotija (61-80).



Tabla 17. Resultados del análisis de la presencia/ausencia de *L. monocytogenes* a las muestras de queso Cotija (81-95) por PCR en tiempo real.

Muestra	Promedio
Q.C. 81	NA
Q.C. 82	NA
Q.C. 83	NA
Q.C. 84	NA
Q.C. 85	NA
Q.C. 86	NA
Q.C. 87	NA
Q.C. 88	NA
Q.C. 89	NA
Q.C. 90	NA
Q.C. 91	NA
Q.C. 92	NA
Q.C. 93	NA
Q.C. 94	NA
Q.C. 95	NA

Promedio de las cuatro replicas.

NA: No amplificó

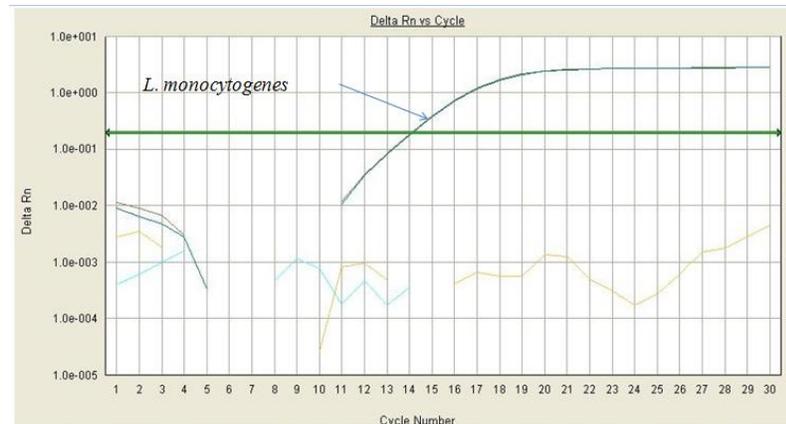


Figura 22. Gráfica de amplificación por PCR en tiempo real a escala logarítmica del ADN de *L. monocytogenes* y ADN de las muestras de queso Cotija (81-95)

De acuerdo a los resultados obtenidos y considerando que el ganado está sano y que se tienen un mínimo de condiciones higiénicas durante la elaboración, así como la suma de los factores fisicoquímicos, y la competencia microbiana; se observa que todo esto en conjunto contribuye a que *L. monocytogenes* no se encuentre presente en el queso Cotija.



8. Conclusiones

Se diseñaron los cebadores y sonda para la detección específica de *L. monocytogenes*.

Se demostró que la metodología de análisis, que involucra el enriquecimiento de la muestra, la extracción de ADN y la PCR en tiempo real, es adecuada para la detección de *L. monocytogenes* en un queso de maduración espontánea.

Todas las muestras de queso Cotija analizadas están libres de *L. monocytogenes*.

9. Perspectivas.

Realizar cinéticas de crecimiento de *L. monocytogenes*, en la matriz alimentaria. Inocular con una cierta cantidad de UFC de *L. monocytogenes* y evaluar su crecimiento a 1 mes, 2 meses y 3 meses de maduración.

Realizar cinéticas de crecimiento de *L. monocytogenes* en competencia con *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, para verificar si es inhibido por crecimiento o si es inhibido por los compuestos antibacterianos que estos producen.



10. Bibliografía

Ampe F., Ben Omar N., Moizan C., Wachter C., Guyot J.P. (1999) *Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations*. Appl Environ Microbiol (65) 5464-5473.

Álvarez, et. al. (2005). *Reglas de uso. Marca colectiva Queso Cotija Región de Origen*. México: El colegio de Michoacán.

Basic Local Alignment Search Tool de la NCBI (National Center for Biotechnological Information). Disponible en: HYPERLINK "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>" (Último acceso el 25 de Septiembre del 2012).

Bravo, A. (2008). *Estudio de las poblaciones microbianas de interés biotecnológico aisladas del queso Cotija*. México. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

Dieffenbach, C. W., & Dueksler, G. S. (2003). *PCR Primer: A Laboratory manual* (2° ed.). New York: Cold Spring Harbor. pp.10-15.

Dorak, Tevkif M. 2007. *An Introduction to real time PCR*. En *Dorak Tevkif Real Time PCR*. UK: Taylor & Francis Group, pp. 1-37-233.

Doyle Michael P. et al. (2001). *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers* (2° ed.) Washington D. C: ASM Press. pp. 383-403

Hernández. (2007). *Queso Cotija: Estudio del análisis fisicoquímico, proximal y actividad antioxidante*. México. Tesis de licenciatura Facultad de Química, UNAM.

Hitchins Anthony D & Jinneman Karen (2011). *Detection and Enumeration of Listeria monocytogenes*. En: *Bacteriological Analytical Manual*. Disponible en: HYPERLINK "<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm279532.htm>" (Último acceso 1 de Marzo del 2013).

Jay, J. et al. (2005). *Modern Food Microbiology*. (7° ed.) New York: Board. Pp. 591-612



Keiler, K.C., Shapiro, L., Williams, K.P. (2000). *tmRNAs that encode proteolysis- inducing tags are found in all known bacterial genomes: a two-piece functions in Caulobacter*. PNAS 97, 7778-7783

Keiler, Kenneth C. (2007). *Physiology of tmRNA: what gets tagged and why?*. Current Opinion in Microbiology, 10:169–175

Kreft Jürgen, Vázquez-Boland José A. (2001) *Regulation of virulence genes in Listeria*. Int. J. Med. Microbiol. 291, 145-157

Muyzer G. (1999). *DGGE/TGGE a method for indentifying genes from natural ecosystems*. Curr Opin Microbiol 2:317-322

NMX-F-735- COFOCALEC-2011 SISTEMA PRODUCTO LECHE-ALIMENTOS- LÁCTEOS- ALIMENTO LÁCTEO REGIONAL-QUESO COTIJA-ARTESANAL MADURADO-DENOMINACIÓN, ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-110-SSA1-1994. BIENES Y SERVICIOS. PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-121-SSA1-1994. BIENES Y SERVICIOS. QUESOS: FRESCOS, MADURADOS Y PROCESADOS. ESPECIFICACIONES SANITARIAS.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-143-SSA1-1995, BIENES Y SERVICIOS. METODO DE PRUEBA MICROBIOLOGICO PARA ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*.

O'Grady, J., Sedano-Balbas, S., Maher, M., Smith, T., Barry, T., (2008). *Rapid real-time PCR detection of Listeria monocytogenes in enriched food samples based on the ssrA gene, a novel diagnostic target*. Food Microbiol. 25, 75–84.

O'Grady, J., Ruttledge M., Sedano-Balbas, S., Maher, M., Smith, T., Barry, T. (2009). *Rapid detection of Listeria monocytogenes in food using cultura enrichment combined with real-time PCR*. Food Microbiol. 26, 4-7.



- Olvera García, M. E. (2010). *Efecto del medio de cultivo en la producción de compuestos antibacterianos por Enterococcus sp.* México. Tesis de licenciatura Facultad de Química, UNAM.
- Ray Bibek, & Bitunia Arun (2008). *Fundamental Food Microbiology*. (4° ed) New York: Taylor & Francis Group. pp. 288-294
- Rossmannith P., Krassnig M., Wagner M., Ingeborg H. (2006). *Detection of Listeria monocytogenes in food using a combined enrichment/real-time PCR method targeting the prfA gene*. Research in Microbiology 157; 763–771
- Ryser, E. T., & Marth, E. H. (1991). *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. New York: Marcel Dekker, Inc. pp. 11-16,27,28, 67-76, 97-99
- Rodríguez-Lázaro, D., Hernández M., Scotti M., Esteve T., Vázquez Boland J. A., and Pla M. 2004. *Quantitative detection of Listeria monocytogenes and Listeria innocua by real-time PCR: assessment of hly, iap, and lin02483 targets and AmpliFluor technology*. Appl. Environ. Microbiol. 70:1366–1377
- Rodríguez-Lázaro, D., Pla M., Scotti M., Monzo H., and Vázquez Boland J. A. 2005. *A Novel Real-Time PCR for Listeria monocytogenes That Monitors Analytical Performance via an Internal Amplification Control*. Environ. Microbiol. 71: 9008-9012
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual* (2° ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Uta Gasanov, D. H. (2005). *Methods for the isolation and identification of Listeria spp.* FEMS Microbiology Reviews (29), 851–875.
- Zúñiga. (2009). *Descripción e Identificación de la Comunidad Bacteriana Presente en el Queso Cotija por Métodos Moleculares*. México: Posgrado de Ciencias Bioquímicas. UNAM.



ANEXO 1

Fundamento del Caldo Fraser. Es un medio de enriquecimiento que contiene peptonas, extracto de carne y extracto de levadura las cuales proporcionan nitrógeno, vitaminas y minerales. Fosfato de sodio y fosfato de potasio que son agentes amortiguadores. La diferenciación es ayudada por el contenido de citrato de amonio férrico en el medio. Dado que todas las especies de *Listeria* hidrolizan la esculina, la adición de iones férricos al medio detectará la reacción. Un ennegrecimiento del medio por cultivos que hidrolizaron esculina de bacterias es el resultado de la formación de 6,7-dihidroxycoumarina que reacciona con los iones férricos. La selectividad se proporciona mediante la presencia de cloruro de litio, ácido nalidíxico y acriflavina en la fórmula. La alta tolerancia a la sal de *Listeria* se utiliza como un medio para inhibir el crecimiento de enterococos.



ANEXO 2

Tabla 17. Valores espectrofotométricos obtenidos para las extracciones realizadas con el KIT de extracción y purificación de ADN FAST ID.

Muestra	A 260	A 280	A 260/280	[ADN] (ng/ μ L)
Q.C. 1a	0.064	0.03	2.13	64.07
Q.C. 1b	0.037	0.018	2.06	37.12
Q.C. 2a	0.01	0.004	2.50	10.95
Q.C. 2b	0.008	0.003	2.67	12.90
Q.C. 3a	0.009	0.004	2.25	11.91
Q.C. 3b	0.005	0.002	2.50	10.48
Q.C. 4a	0.011	0.004	2.75	10.58
Q.C. 4b	0.015	0.007	2.14	15.35
Q.C. 5a	0.051	0.025	2.04	51.33
Q.C. 5b	0.038	0.018	2.11	37.77
Q.C. 6a	0.016	0.003	5.33	15.88
Q.C. 6b	0.014	0.003	4.67	15.98
Q.C. 7a	0.016	0.007	2.29	16.50
Q.C. 7b	0.013	0.004	3.25	12.67
Q.C. 8a	0.007	0.002	3.50	7.47
Q.C. 8b	0.012	0.004	3.00	11.64
Q.C. 9a	0.003	0.001	3.00	9.37
Q.C. 9b	0.008	0.002	4.00	8.07
Q.C. 10a	0.006	0.001	6.00	9.78
Q.C. 10b	0.01	0.002	5.00	9.74
Q.C. 11a	0.031	0.012	2.58	31.04
Q.C. 11b	0.106	0.052	2.04	105.64
Q.C. 12a	0.008	0.002	4.00	8.30
Q.C. 12b	0.016	0.005	3.20	16.28
Q.C. 13a	0.005	0.001	5.00	4.90
Q.C. 13b	0.016	0.005	3.20	15.99
Q.C. 14a	0.035	0.016	2.19	35.38
Q.C. 14b	0.15	0.075	2.00	149.85
Q.C. 15a	0.027	0.007	3.86	26.54
Q.C. 15b	0.005	0.002	2.50	11.40
Q.C. 16a	0.042	0.016	2.63	41.51
Q.C. 16b	0.106	0.053	2.00	106.43
Q.C. 17a	0.008	0.006	1.33	9.83
Q.C. 17b	0.027	0.008	3.38	26.70
Q.C. 18a	0.012	0.003	4.00	12.11
Q.C. 18b	0.054	0.016	3.38	53.89



Muestra	A 260	A 280	A 260/280	[ADN] (ng/ μ L)
Q.C. 19a	0.013	0.004	3.25	13.18
Q.C. 19b	0.032	0.012	2.67	32.47
Q.C. 20a	0.032	0.012	2.67	30.42
Q.C. 20b	0.066	0.023	2.87	66.32
Q.C. 21a	0.032	0.012	2.67	31.87
Q.C. 21b	0.004	0.001	4.00	9.68
Q.C. 22a	0.015	0.005	3.00	14.88
Q.C. 22b	0.012	0.003	4.00	12.28
Q.C. 23a	0.056	0.024	2.33	50.17
Q.C. 23b	0.052	0.026	2.00	51.86
Q.C. 24a	0.006	0.002	3.00	9.88
Q.C. 24b	0.007	0.003	2.33	10.61
Q.C. 25a	0.005	0.002	2.50	11.86
Q.C. 25b	0.006	0.002	3.00	9.14
Q.C. 26a	0.002	0.001	2.00	10.05
Q.C. 26b	0.009	0.002	4.50	9.57
Q.C. 27a	0.008	0.002	4.00	9.50
Q.C. 27b	0.006	0.002	3.00	10.67
Q.C. 28a	0.015	0.007	2.14	15.24
Q.C. 28b	0.019	0.009	2.11	18.20
Q.C. 29a	0.026	0.013	2.00	22.57
Q.C. 29b	0.003	0.001	3.00	12.62
Q.C. 30a	0.048	0.024	2.00	48.21
Q.C. 30b	0.103	0.052	1.98	48.05
Q.C. 31a	0.009	0.003	3.00	9.55
Q.C. 31b	0.017	0.004	4.25	16.27
Q.C. 32a	0.012	0.004	3.00	11.83
Q.C. 32b	0.008	0.002	4.00	9.87
Q.C. 33a	0.006	0.002	3.00	9.80
Q.C. 33b	0.012	0.004	3.00	11.95
Q.C. 34a	0.075	0.037	2.03	74.31
Q.C. 34b	0.092	0.046	2.00	90.97
Q.C. 35a	0.003	0.001	3.00	9.58
Q.C. 35b	0.004	0.002	2.00	9.80
Q.C. 36a	0.04	0.016	2.50	39.81
Q.C. 36b	0.061	0.029	2.10	59.79



Muestra	A 260	A 280	A 260/280	[ADN] (ng/μL)
Q.C. 37a	0.008	0.003	2.67	9.52
Q.C. 37b	0.01	0.003	3.33	9.63
Q.C. 38a	0.104	0.052	2.00	103.78
Q.C. 38b	0.055	0.026	2.12	55.61
Q.C. 39a	0.024	0.007	3.43	23.52
Q.C. 39b	0.004	0.002	2.00	8.88
Q.C. 40a	0.016	0.007	2.29	14.74
Q.C. 40b	0.005	0.002	2.50	9.67
Q.C. 41a	0.042	0.011	3.82	40.99
Q.C. 41b	0.02	0.011	1.82	15.16
Q.C. 42a	0.009	0.002	4.50	10.04
Q.C. 42b	0.018	0.005	3.60	15.11
Q.C. 43a	0.003	0.001	3.00	9.55
Q.C. 43b	0.09	0.045	2.00	10.97
Q.C. 44a	0.01	0.003	3.33	9.52
Q.C. 44b	0.032	0.012	2.67	9.74
Q.C. 45a	0.074	0.037	2.00	10.46
Q.C. 45b	0.008	0.003	2.67	13.10
Q.C. 46a	0.003	0.001	3.00	12.89
Q.C. 46b	0.014	0.011	1.27	13.10
Q.C. 47a	0.011	0.003	3.67	11.98
Q.C. 47b	0.004	0.001	4.00	9.25
Q.C. 48a	0.012	0.004	3.00	12.07
Q.C. 48b	0.009	0.003	3.00	9.75
Q.C. 49a	0.02	0.006	3.33	19.58
Q.C. 49b	0.01	0.003	3.33	9.90
Q.C. 50a	0.009	0.003	3.00	8.96
Q.C. 50b	0.018	0.017	1.06	18.62
Q.C. 51a	0.01	0.004	2.50	12.07
Q.C. 51b	0.014	0.007	2.00	13.94
Q.C. 52a	0.054	0.026	2.08	54.40
Q.C. 52b	0.067	0.032	2.09	67.29
Q.C. 53a	0.012	0.004	3.00	11.86
Q.C. 53b	0.12	0.06	2.00	120.26
Q.C. 54a	0.021	0.015	1.40	20.94
Q.C. 54b	0.123	0.062	1.98	121.78



Muestra	A 260	A 280	A 260/280	[ADN] (ng/μL)
Q.C. 55a	0.01	0.005	2.00	10.12
Q.C. 55b	0.009	0.003	3.00	11.55
Q.C. 56a	0.006	0.002	3.00	9.92
Q.C. 56b	0.017	0.005	3.40	16.77
Q.C. 57a	0.015	0.005	3.00	14.17
Q.C. 57b	0.016	0.009	1.78	16.13
Q.C. 58a	0.031	0.011	2.82	31.86
Q.C. 58b	0.092	0.049	1.88	87.19
Q.C. 59a	0.013	0.004	3.25	15.60
Q.C. 59b	0.045	0.022	2.05	9.52
Q.C. 60a	0.005	0.002	2.50	11.28
Q.C. 60b	0.015	0.005	3.00	13.88
Q.C. 61a	0.042	0.011	3.82	15.00
Q.C. 61b	0.018	0.005	3.60	15.00
Q.C. 62a	0.005	0.001	5	12.00
Q.C. 62b	0.004	0.001	4	17.00
Q.C. 63a	0.036	0.017	2.12	35.90
Q.C. 63b	0.046	0.021	2.19	45.67
Q.C. 64a	0.048	0.017	2.82	48.18
Q.C. 64b	0.049	0.017	2.88	49.13
Q.C. 65a	0.024	0.01	2.40	24.39
Q.C. 65b	0.016	0.006	2.67	15.81
Q.C. 66a	0.023	0.01	2.30	23.08
Q.C. 66b	0.025	0.01	2.50	24.78
Q.C. 67a	0.039	0.014	2.79	38.79
Q.C. 67b	0.039	0.014	2.79	38.79
Q.C. 68a	0.025	0.011	2.27	24.62
Q.C. 68b	0.025	0.011	2.27	24.62
Q.C. 69a	0.03	0.016	1.88	30.22
Q.C. 69b	0.03	0.016	1.88	30.22
Q.C. 70a	0.099	0.048	2.06	98.78
Q.C. 70b	0.099	0.048	2.06	98.73
Q.C. 71a	0.024	0.01	2.40	24.39
Q.C. 71b	0.016	0.006	2.67	15.82
Q.C. 72a	0.011	0.01	1.10	10.67
Q.C. 72b	0.01	0.004	2.50	10.20



Muestra	A 260	A 280	A 260/280	[ADN] (ng/μL)
Q.C. 73a	0.016	0.004	4.00	16.12
Q.C. 73b	0.016	0.004	4.00	16.11
Q.C. 74a	0.016	0.006	2.67	15.94
Q.C. 74b	0.014	0.005	2.80	14.24
Q.C. 75a	0.007	0.002	3.50	6.81
Q.C. 75b	0.006	0.002	3.00	6.41
Q.C. 76a	0.048	0.017	2.82	48.19
Q.C. 76b	0.049	0.017	2.88	49.14
Q.C. 77a	0.021	0.007	3.00	21.32
Q.C. 77b	0.015	0.008	1.88	14.71
Q.C. 78a	0.025	0.011	2.27	24.62
Q.C. 78b	0.025	0.011	2.27	24.70
Q.C. 79a	0.039	0.014	2.79	38.78
Q.C. 79b	0.039	0.014	2.79	38.00
Q.C. 80a	0.016	0.004	4.00	16.12
Q.C. 80b	0.016	0.004	4.00	16.11
Q.C. 81a	0.012	0.004	3.00	11.62
Q.C. 81b	0.023	0.009	2.56	23.46
Q.C. 82a	0.053	0.017	3.12	53.19
Q.C. 82b	0.009	0.003	3.00	12.75
Q.C. 83a	0.011	0.005	2.20	11.17
Q.C. 83b	0.011	0.005	2.20	11.10
Q.C. 84a	0.083	0.041	2.02	82.97
Q.C. 84b	0.066	0.031	2.13	66.11
Q.C. 85a	0.009	0.003	3.00	11.14
Q.C. 85b	0.006	0.002	3.00	16.10
Q.C. 86a	0.011	0.004	2.75	10.97
Q.C. 86b	0.008	0.003	2.67	18.68
Q.C. 87a	0.016	0.005	3.20	16.49
Q.C. 87b	0.012	0.006	2.00	12.33
Q.C. 88a	0.007	0.002	3.50	7.21
Q.C. 88b	0.007	0.002	3.50	7.53
Q.C. 89a	0.008	0.002	4.00	10.60
Q.C. 89b	0.011	0.004	2.75	10.21
Q.C. 90a	0.016	0.005	3.20	16.08
Q.C. 90b	0.009	0.002	4.50	13.67



Muestra	A 260	A 280	A 260/280	[ADN] (ng/ μ L)
Q.C. 91a	0.005	0.001	5.00	12.08
Q.C. 91b	0.005	0.001	5.00	10.08
Q.C. 92a	0.014	0.003	4.67	14.68
Q.C. 92b	0.014	0.003	4.67	14.34
Q.C. 93a	0.04	0.02	2.00	39.63
Q.C. 93b	0.04	0.02	2.00	12.34
Q.C. 94a	0.013	0.003	4.33	13.32
Q.C. 94b	0.013	0.003	4.33	14.59
Q.C. 95a	0.009	0.002	4.50	11.65
Q.C. 95b	0.056	0.035	1.60	56.25



ANEXO 3

Tabla 18. Análisis visual de las muestras de queso Cotija

Muestra	Aspecto corteza	Aspecto interior
Q.C. 1	Verdosa	Bien
Q.C. 2	Bien	Bien
Q.C. 3	Bien	Bien
Q.C. 4	Bien	Bien
Q.C.5	Bien	Bien
Q.C. 6	Bien	Bien
Q.C. 7	Bien	Bien
Q.C. 8	Bien	Cabello
Q.C. 9	Bien	Bien
Q.C. 10	Bien	Bien
Q.C. 11	Bien	Hilo verde
Q.C. 12	Bien	Bien
Q.C. 13	Bien	Bien
Q.C. 14	Bien	Bien
Q.C. 15	Bien	Bien
Q.C. 16	Bien	Manchas naranjas
Q.C. 17	Bien	Bien
Q.C. 18	Verdosa	Bien
Q.C. 19	Verdosa	Bien
Q.C. 20	Manchas rosas	Cabello, Manchas rosas
Q.C. 21	Bien	Bien
Q.C. 22	Bien	Bien
Q.C 23	Bien	Bien
Q.C 24	Bien	Bien
Q.C. 25	Puntos negros y materia tipo madera	Bien
Q.C. 26	Bien	Hilo negro
Q.C. 27	Bien	Bien
Q.C. 28	Bien	Bien
Q.C. 29	Bien	Bien
Q.C. 30	Bien	Consistencia pastosa
Q.C. 31	Bien	Bien
Q.C 32	Bien	Bien
Q.C. 33	Bien	Bien
Q.C 34	Bien	Astillas
Q.C 35	Verdosa	Bien



Muestra	Aspecto corteza	Aspecto interior
Q.C. 36	Puntos Verdes	Bien
Q.C. 37	Bien	Cabello, Mosquito, Fibra de Escobillón
Q.C. 38	Restos de envoltura	Manchas negras
Q.C. 39	Un cabello	Un cabello
Q.C. 40	Bien	Bien
Q.C. 41	Verdosa	Bien
Q.C. 42	Bien	Bien
Q.C. 43	Color naranja	Bien
Q. C. 44	Bien	Bien
Q. C 45	Bien	Bien
Q. C 46	Ligeramente verdosa	Bien
Q. C. 47	Bien	Bien
Q. C. 48	Bien	Bien
Q.C. 49	Bien	Bien
Q.C. 50	Bien	Bien
Q.C. 51	Puntos negros	Bien
Q.C. 52	Ligeramente verdosa	Bien
Q.C. 53	Bien, Residuos de papel de estraza	Bien
Q.C. 54	Ligeramente verdosa	Bien
Q.C. 55	Bien	Bien
Q.C. 56	Bien	Bien
Q.C. 57	Bien	Bien
Q.C. 58	Ligeramente Verdosa	Bien
Q.C. 59	Bien, mancha negra	Bien
Q.C. 60	Bien	Bien
Q.C. 61	Bien	Bien
Q.C. 62	Ligeramente verdosa	Bien
Q.C. 63	Bien	Manchas Amarillas (Color Mostaza)
Q.C. 64	Bien, Mancha negra	Bien



Muestra	Aspecto corteza	Aspecto interior
Q.C. 65	Manchas naranjas	Bien
Q.C. 66	Bien	Bien
Q.C. 67	Bien	Bien
Q.C. 68	Bien	Bien
Q.C. 69	Hongo blanco	Mancha café
Q.C. 70	Mancha amarilla	Bien
Q.C. 71	Bien	Bien
Q.C. 72	Bien	Manchas verdes
Q.C.73	Hongo Blanco	Bien
Q.C.74	Bien	Bien
Q.C. 75	Bien	Bien
Q.C. 76	Bien	Bien
Q.C. 77	Bien	Bien
Q.C. 78	Bien	Bien
Q.C. 79	Bien	Bien
Q.C. 80	Bien	Manchas naranjas
Q.C. 81	Bien	Bien
Q.C. 82	Bien	Bien
Q.C. 83	Bien	Bien
Q.C. 84	Bien	Bien
Q.C. 85	Bien	Bien
Q.C. 86	Hongo verde, blanco y amarillos	Manchas amarillas y cabello
Q.C. 87	Bien	Hongos Blancos
Q.C. 88	Bien	Bien
Q.C. 89	Hongos verdes y blancos	Hongos verdes y blancos
Q.C. 90	Bien	Bien
Q.C. 91	Bien	Bien
Q.C. 92	Bien	Bien
Q.C. 93	Bien	Bien
Q.C. 94	Bien	Bien
Q.C. 95	Bien	Bien