



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Detección de cepas patogénicas de *Escherichia coli* en queso Cotija artesanal madurado producido en la región de origen, mediante la técnica de PCR tiempo real.”

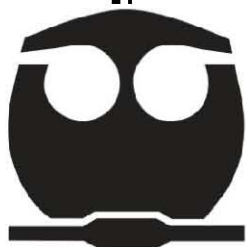
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

HERMANN EFRAÍN MEJÍA BUENFIL



México, D.F.

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: AURORA IRMA ORTEGÓN ÁVILA. _____

VOCAL: GLORIA DÍAZ RUIZ. _____

SECRETARIO: MARICARMEN QUIRASCO BARUCH. _____

1°. SUPLENTE: MARTHA GILES GÓMEZ. _____

2°. SUPLENTE: NORMA ANGÉLICA CAMACHO DE LA ROSA. _____

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología, Edificio de Alimentos y Química Ambiental del Conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

ESTA TESIS FUE FINANCIADA POR EL PROYECTO: SAGARPA-2010-147449.
“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: HERMANN EFRAÍN MEJÍA BUENFIL. _____

“NO OS DEJÉIS CORROMPER POR UN ESCEPTICISMO ESTÉRIL Y DEPRIMENTE; NO OS DESALENTÉIS ANTE LA TRISTEZA DE CIERTAS HORAS QUE PASAN SOBRE LAS NACIONES. VIVID EN LA SERENA PAZ DE LOS LABORATORIOS Y DE LAS BIBLIOTECAS. PREGUNTAOS PRIMERO: ¿QUÉ HE HECHO POR INSTRUIRME? Y DESPUÉS, A MEDIDA QUE VAYÁIS PROGRESANDO: ¿QUÉ HE HECHO POR MI PATRIA? HASTA QUE LLEGUE EL DÍA EN QUE PODÁIS TENER LA ÍNTIMA SATISFACCIÓN DE PENSAR EN QUE HABÉIS CONTRIBUIDO DE ALGUNA MANERA AL PROGRESO Y AL BIENESTAR DE LA HUMANIDAD.”

-LOUIS PASTEUR-

Índice General.

	Pág.
Índice de Figuras.	7
Índice de Tablas.	12
1. Resumen.	14
2. Introducción.	16
2.1. Objetivo General.	16
2.2. Objetivos Particulares.	17
2.3. Hipótesis.	17
3. Marco Teórico.	18
3.1. El queso Cotija.	18
3.1.1. Especificaciones y Materias Primas.	19
3.1.2. Elaboración del queso Cotija Región de Origen.	20
3.2. <i>Escherichia coli</i> .	23
3.2.1. <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC).	25
3.2.2. <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC).	27
3.2.2.1. <i>E. coli</i> O157:H7.	28
3.2.3. <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC).	29
3.2.3. <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (EIEC).	30
3.2.3. <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC).	31
3.3. Métodos tradicionales y métodos moleculares.	32

	Pág.
3.4. La Reacción de PCR.	34
3.3.1. PCR punto final.	34
3.3.2. PCR tiempo real.	35
3.4. Actividad acuosa (a_w).	36
4. Diagrama Experimental.	38
5. Metodología.	39
5.1. Unidades de ensayo.	39
5.2. Cepas.	39
5.3. Homogenización de las unidades de ensayo.	40
5.4. Medición de la a_w .	43
5.5. Enriquecimiento.	44
5.6. Obtención del paquete celular.	44
5.7. Extracción y medición de concentración de ADN.	45
5.8. Medición de la de la calidad del ADN molde.	47
5.9. Elección de sondas y cebadores.	47
5.10. Especificidad de cebadores y sondas.	47
5.11. Inoculación intencionada de queso.	48
5.12. Análisis de las unidades de ensayo de queso Cotija artesanal madurado.	48

	Pág.
6. Resultados y Análisis.	50
6.1. Inspección ocular de las unidades de ensayo.	50
6.2. Actividad acuosa (a_w).	51
6.3. Evaluación de la calidad del ADN molde.	51
6.4. Sondas y cebadores para la detección de ETEC y EHEC (O157:H7)	53
6.5. Especificidad de sondas y cebadores.	55
6.6. Inoculación intencionada de queso.	60
6.7. Análisis de las unidades de ensayo de queso Cotija artesanal madurado.	63
7. Conclusiones.	75
Bibliografía.	76
Anexos.	82

Índice de Figuras.

Figura		Pág.
1	Mapa de la zona geográfica del Patrimonio Cultural de la Sierra de JALMICH. Región de origen del queso Cotija artesanal madurado.	18
2	Proceso de elaboración del queso Cotija artesanal madurado.	23
3	Remoción de la corteza del queso.	41
4	Reducción de pedazos de las unidades de ensayo con un cuchillo diferente.	41
5	Reducción del tamaño de partícula de las unidades de ensayo.	42
6	Almacenamiento en bolsa Ziploc® para congelación etiquetada con el número de la unidad de ensayo.	43
Gráfica 1	Porcentaje de defectos en el interior de las unidades de ensayo.	50
7	Gel de agarosa al 2% de la región V3 del gen ribosomal 16S teñido con bromuro de etidio.	53
8a	Gráfica de amplificación de qPCR de los controles positivos de ETEC y la unidad de ensayo inoculada.	61
8b	Gráfica de amplificación de qPCR de los controles positivos de EHEC y la unidad de ensayo inoculada.	62
9a	Gráfica de amplificación de qPCR de los controles positivos de ETEC y la unidad de ensayo no inoculado.	62

Figura		Pág.
9b	Gráfica de amplificación de qPCR de los controles positivos de EHEC y la unidad de ensayo de queso no inoculado.	63
10a	Gráfica de amplificación de qPCR de los controles positivos de ETEC y de la unidad de ensayo número 1 del queso Cotija artesanal madurado.	64
10b	Gráfica de amplificación de qPCR de los controles positivos de EHEC y de la unidad de ensayo número 1 del queso Cotija artesanal madurado.	64
F1	Gel de agarosa al 2% de la región V3 del gen ribosomal 16S teñido con bromuro de etidio, unidades de ensayo 1-10.	95
F2	Gel de agarosa al 2% de la región V3 del gen ribosomal 16S teñido con bromuro de etidio, unidades de ensayo 20-95.	96
F3	Gel de agarosa al 2% de la región V3 del gen ribosomal 16S teñido con bromuro de etidio, repetición.	97
G1	Gráfica de amplificación de qPCR de los genes específicos <i>GE ETEC 1</i> y <i>GE ETEC 2</i> de ETEC (controles positivos).	98
G2	Gráfica de amplificación de qPCR de los genes específicos <i>GE ETEC 1</i> y <i>GE ETEC 2</i> de ETEC y los controles negativos de ETEC.	98
G3	Gráfica de amplificación de qPCR de los genes específicos <i>GE EHEC 1</i> y <i>GE EHEC 2</i> de EHEC (controles positivos).	99

Figura		Pág.
G4	Gráfica de amplificación de qPCR de los genes específicos <i>GE EHEC 1</i> y <i>GE EHEC 2</i> y los controles negativos de EHEC.	99
H1	Gráfica de amplificación de qPCR de los genes específicos <i>GE ETEC 1</i> y <i>GE ETEC 2</i> y las unidades de ensayos 1-10 de ETEC.	100
H2	Gráfica de amplificación de qPCR de los específicos <i>GE ETEC 1</i> y <i>GE ETEC 2</i> y las unidades de ensayos 11-20 de ETEC.	100
H3	Gráfica de amplificación de qPCR de los genes específicos <i>GE ETEC 1</i> y <i>GE ETEC 2</i> y las unidades de ensayos 21-30 de ETEC.	101
H4	Gráfica de amplificación de qPCR de los genes específicos <i>GE ETEC 1</i> y <i>GE ETEC 2</i> y las unidades de ensayos 31-40 de ETEC.	101
H5	Gráfica de amplificación de qPCR de los genes específicos <i>GE ETEC 1</i> y <i>GE ETEC 2</i> y las unidades de ensayos 41-50 de ETEC.	102
H6	Gráfica de amplificación de qPCR de los genes específicos <i>GE ETEC 1</i> y <i>GE ETEC 2</i> y las unidades de ensayos 51-60 de ETEC.	102
H7	Gráfica de amplificación de qPCR de los genes específicos <i>GE ETEC 1</i> y <i>GE ETEC 2</i> y las unidades de ensayos 61-70 de ETEC.	103

Figura		Pág.
H8	Gráfica de amplificación de qPCR de los genes específicos <i>GE ETEC 1</i> y <i>GE ETEC 2</i> y las unidades de ensayos 71-84 de ETEC.	103
H9	Gráfica de amplificación de qPCR de los genes específicos <i>GE ETEC 1</i> y <i>GE ETEC 2</i> y las unidades de ensayos 85-95 de ETEC.	104
H10	Gráfica de amplificación de qPCR de los genes específicos <i>GE EHEC 1</i> y <i>GE EHEC 2</i> y las unidades de ensayos 1-10 de EHEC.	104
H11	Gráfica de amplificación de qPCR de los genes específicos <i>GE EHEC 1</i> y <i>GE EHEC 2</i> y las unidades de ensayos 11-20 de EHEC.	105
H12	Gráfica de amplificación de qPCR de los genes específicos <i>GE EHEC 1</i> y <i>GE EHEC 2</i> y las unidades de ensayos 21-30 de EHEC.	105
H13	Gráfica de amplificación de qPCR de los genes específicos <i>GE EHEC 1</i> y <i>GE EHEC 2</i> y las unidades de ensayos 31-40 de EHEC.	106
H14	Gráfica de amplificación de qPCR de los genes específicos <i>GE EHEC 1</i> y <i>GE EHEC 2</i> y las unidades de ensayos 41-50 de EHEC.	106

Figura		Pág.
H15	Gráfica de amplificación de qPCR de los genes específicos <i>GE EHEC 1</i> y <i>GE EHEC 2</i> y las unidades de ensayos 51-60 de EHEC.	107
H16	Gráfica de amplificación de qPCR de los genes específicos <i>GE EHEC 1</i> y <i>GE EHEC 2</i> y las unidades de ensayos 61-70 de EHEC.	107
H17	Gráfica de amplificación de qPCR de los genes específicos <i>GE EHEC 1</i> y <i>GE EHEC 2</i> y las unidades de ensayos 71-84 de EHEC.	108
H18	Gráfica de amplificación de qPCR de los genes específicos <i>GE EHEC 1</i> y <i>GE EHEC 2</i> y las unidades de ensayo 85-95 de EHEC.	108

Índice Tablas.

Tabla		Pág.
1	Serotipos y serogrupos más comunes de <i>E. coli</i> causantes de diarrea.	24
2	Algunas cepas de <i>E. coli</i> enterotoxigénica productoras de enterotoxinas termolábiles y termorresistentes.	26
3	Origen de las cepas utilizadas.	39
4	Ejemplo de las cconcentraciones promedio de ADN obtenido del enriquecimiento de cepas puras y de 12 quesos elegidos al azar.	52
5a	Genes encontrados en la bibliografía para la elección de sondas y cebadores para ETEC	54
5b	Genes encontrados en la bibliografía para la elección de sondas y cebadores para EHEC.	54
6	Resultados del análisis por BLAST de los genes específicos para el análisis de ETEC y EHEC por qPCR	55
7a	Ciclos umbral promedio y desviación estándar del control positivo para ETEC	56
7b	Ciclos umbral promedio y desviación estándar del control positivo para EHEC	56
8a	Ciclos umbral promedio y desviación estándar de los controles negativos para ETEC	58
8b	Ciclos umbral promedio y desviación estándar de los controles negativos para EHEC	59

Tabla		Pág.
9	Concentraciones promedio de ADN obtenido de la inoculación de la unidad de ensayo de queso Cotija artesanal madurado.	60
10a	Ciclos umbral promedio y desviación estándar de las 95 unidades de ensayo para los genes específicos de ETEC.	65
10b	Ciclos umbral promedio y desviación estándar de las 95 unidades de ensayo para los genes específicos de EHEC.	67
11	Resultados del análisis de las unidades de ensayo de queso Cotija	71
B1	Concentración de reactivos para la reacción de PCR punto final	84
B2	Condiciones de reacción de PCR punto final.	84
C1	Concentración de reactivos para las reacciones de PCR tiempo real para la reacción dúplex de los genes específicos <i>GE ETEC 1</i> y <i>GE ETEC 2</i> para ETEC.	85
C2	Concentración de reactivos para las reacciones de PCR tiempo real para la reacción dúplex de los genes específicos <i>GE EHEC 1</i> y <i>GE EHEC 2</i> para EHEC.	85
C3	Condiciones de reacción de PCR tiempo real	85
D1	a_w promedio y desviación estándar de las unidades de ensayo de queso Cotija artesanal madurado.	86
E1	Concentraciones promedio, desviación estándar y relación A_{260}/A_{280} de ADN de queso inoculado, inoculado no incubado, no inoculado y unidades de ensayo de queso Cotija	89

1. Resumen.

El queso Cotija artesanal madurado, se produce desde hace más de 400 años en una región en la sierra que separa los estados de Jalisco y Michoacán. Tiene gran aceptación por parte de gente de la región, y su consumo tanto a nivel nacional como internacional va en aumento.

Durante el proceso de elaboración, la leche no tiene un proceso térmico (pasteurización) que elimine microorganismos patógenos, es por esto que la Comisión Federal de Prevención de Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) se ha preocupado por la inocuidad del producto dada la carga de microorganismos patógenos que podría llegar a contener.

Este proyecto tiene como objetivo determinar que el producto no es un riesgo para la salud del consumidor, desde el punto de vista de presencia de microorganismos patógenos; particularmente, por ausencia de enteropatógenos.

Lo anterior se determinará mediante el análisis de una unidad de ensayo representativa de queso Cotija artesanal madurado que fue producida en la región de origen en el año de 2011, mediante la técnica de PCR tiempo real. Este proyecto se enfocará específicamente a identificar dos serotipos del microorganismo *Escherichia coli*, la *E. coli* enterotoxigénica y la *E. coli* enterohemorrágica; de este último serotipo en especial, la cepa O157:H7, la cual ha sido causa de importantes brotes de diarrea hemorrágica en Europa y Estados Unidos, además de otros síntomas los cuales pueden llegar a causar la muerte.

Dada la cantidad de unidades de ensayo a analizar, se utilizará la química TaqMan® en reacción dúplex, es decir, se buscarán dos genes específicos de ambos serotipos.

Es importante resaltar que este es un estudio de tamizaje, ya que para determinar con total y absoluta seguridad la presencia de estos microorganismos, en forma viable, se necesitan otros estudios como los tradicionales dependientes de cultivo y los inmunológicos, los cuales estarán a cargo de otros laboratorios participantes en este proyecto.

2. Introducción.

El presente trabajo, forma parte del proyecto denominado "***Determinación de la inocuidad microbiana del queso Cotija artesanal madurado que se produce en la zona geográfica de origen***" con la clave SAGARPA-2010-147449, el cual busca determinar la ausencia de diferentes patógenos, entre ellos, las cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) y enterohemorrágica (EHEC), específicamente la serovariedad O157:H7. Al ser un proyecto en el que se analizarán una gran cantidad de unidades de ensayo y para lograr la especificidad de análisis deseada, se utilizará la técnica de análisis de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) tiempo real en reacción dúplex, mediante la química TaqMan®.

El objetivo de este proyecto es que si bien el producto se elabora con las normas de higiene necesarias y a que se madura; la materia prima del queso Cotija artesanal, no se somete a tratamiento térmico previo a la elaboración del queso, por lo que la Comisión Federal de Prevención de Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) solicitó la comprobación de la inocuidad de este producto mexicano, por lo que se determinará la ausencia de varios patógenos, entre ellos las serovariedades mencionadas de *E. coli*.

2.1. Objetivo General.

El objetivo de este trabajo es detectar los grupos patogénicos de *Escherichia coli* enterotoxigénica y enterohemorrágica mediante la técnica PCR tiempo real

(qPCR), en una unidad de ensayo representativa de queso Cotija Región de Origen.

2.2. Objetivos Particulares.

Se establecerán las condiciones para detectar específicamente, por reacción de amplificación dúplex en tiempo real, a:

- *E. coli* enterotoxigénica, usando dos genes específicos (*GE ETEC 1* y *GE ETEC 2*) como blancos de amplificación.
- *E. coli* enterohemorrágica O157:H7, utilizando como genes blanco dos genes específicos (*GE EHEC 1* y *GE EHEC 2*).

Además, verificar el protocolo de análisis con quesos inoculados intencionalmente con las cepas de *E. coli* de interés.

Analizar unidades de ensayo de queso Cotija artesanal madurado, colectado directamente de los productores en la temporada 2011, por qPCR.

Confirmar la presencia y cuantificar *E. coli* y el grupo total coliforme, por un método rápido de cultivo aplicado en aquellas unidades de ensayo que hayan dado señal de amplificación en qPCR.

2.3. Hipótesis

El cumplimiento con el proceso de maduración y con las buenas prácticas de manufactura en la elaboración del queso Cotija artesanal madurado, disminuirá la probabilidad de encontrar cepas de EHEC y ETEC en el producto.

3. Marco Teórico.

3.1 El queso Cotija.

El queso Cotija artesanal madurado, es un producto mexicano obtenido de la cuajada de la leche bronca de vaca de raza cebú o criolla. Se produce en la región ubicada en las inmediaciones serranas de los estados de Jalisco y Michoacán (sierra de Jalmich), que se encuentra en jurisdicción de los municipios de Santa María del Oro, en Jalisco, sur de Tocumbo y de Cotija, en Michoacán principalmente (Figura 1), y se elabora únicamente durante la temporada de lluvia entre junio y octubre, y cuenta con una maduración mínima de 3 meses (Álvarez, 2005; Pomeón, 2007).

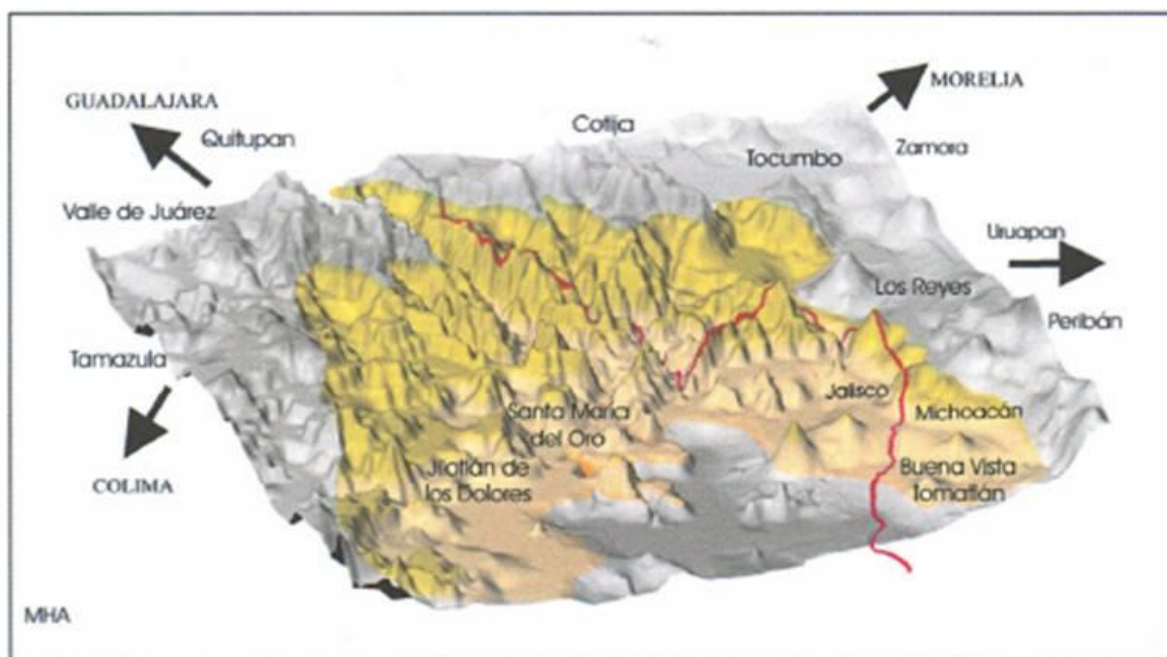


Figura 1. Mapa de la zona geográfica del Patrimonio Cultural de la Sierra de JALMICH. Región de origen del queso Cotija artesanal madurado (NMX-F-735-COFOCALEC-2011).

Al elaborarse con una leche sin tratamiento térmico previo (pasteurización), ésta puede contener microorganismos patógenos tales como: *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*.

3.1.1. Especificaciones y materias primas.

Según la NMX-F-735-COFOCALEC-2011 y las Reglas de Uso Marca Colectiva Queso Cotija Región de Origen ®, las únicas materias primas permitidas para que el queso Cotija pueda denominarse como tal, son:

Ganado: Debe de ser alimentado en libre pastoreo, únicamente con vegetación natural y/o inducida de la región, además de cumplir con las disposiciones zoonosanitarias establecidas en las Normas Oficiales Mexicanas: NOM-031-ZOO-1995, NOM-041-ZOO-1995 y las sanitarias establecidas en la NOM-0243-SSA1-2010.

Leche: Producida en la zona geográfica durante la temporada de lluvias y obtenida en un solo ordeño, del día y deberá cumplir con las especificaciones establecidas para la clase A de la Norma Mexicana NMX-700-COFOCALEC-2004.

Sal: Deberá ser de mar, libre de toda materia extraña y compuestos químicos, obtenida por método tradicional para que tenga la consistencia necesaria para su incorporación durante el salado.

Cuajo: Deberá ser natural, elaborado higiénicamente por los mismos productores de queso, a partir de cuajo de rumiantes jóvenes, o en su defecto de podrá utilizar cuajo comercial de origen animal, no microbiano, es decir, que su composición corresponda a la mezcla enzimática proveniente del extracto enzimático del estómago de rumiantes.

3.1.2. Elaboración del Queso Cotija Región de Origen.

El proceso de elaboración, se especifica en la Norma Mexicana NMX-F-735-COFOCALEC-2011 y las Reglas de Uso Marca Colectiva Queso Cotija Región de Origen®, dicho proceso de elaboración debe reunir las siguientes operaciones (Figura 2):

Preparación de la leche: La leche ordeñada en ese día, se debe filtrar por un lienzo limpio para retirar toda materia extraña y se vacía en un recipiente de acero inoxidable, dejándola en reposo hasta que la temperatura de la misma sea de 30 a 33 °C.

Adición de cuajo: Éste se adiciona diluido según las instrucciones del proveedor en caso de ser comercial, distribuyéndolo eficientemente en toda la leche. En este punto puede adicionarse parte de la sal, según sea la costumbre del productor.

Corte de cuaja y desuerado: Una vez que se forma la cuajada, ésta se corta en trozos de 1 cm³, aproximadamente, con los utensilios adecuados (cuchillo, pala o liras). Estos trozos ya cortados se dejan reposar para que el suero se separe; este suero es eliminado por drenado o decantación.

Amasado y salado: La cuajada ya separada del suero se transporta a una mesa de trabajo en la misma tina de cuajado se mezcla manualmente con la sal en una proporción del 5 al 10% en relación con los litros de leche utilizados. Esta operación, entre otros factores, se considera como punto crítico para determinar la textura final del producto.

El salado de la cuajada debe realizarse dentro de las 9 horas posteriores al inicio del ordeño.

Moldeado y prensado de la cuajada: La cuajada salada y amasada, se vacía al molde, el cual es compuesto por un aro, forrado en su interior de dos mantas de ixtle, con la que se envuelve la cuajada para darle la forma cilíndrica e imprimir el dibujo característico de la corteza a las piezas de queso de alrededor de 20 Kg.

Durante 18 a 24 horas, la pasta fajada es prensada, asegurándose de voltear la pieza sobre su cara al término del periodo de prensado; sin embargo, la NMX-F-735-COFOCALEC-2011, indica que el volteado de la pieza es a la mitad del periodo de prensado.

El queso debe marcarse en esta etapa con los datos del productor además de la fecha de elaboración de tal forma que permitan su identificación correcta.

Oreado: La pieza de queso se mantiene fajada para que no pierda la forma cilíndrica tradicional del queso *Cotija Región de Origen*, aplicando la fuerza suficiente con el aro que permita seguir desuerando durante al menos quince días o hasta que la pieza éste firme y pueda ser manipulada sin el fajo.

Desfajado y Maduración: Cuando la consistencia es la adecuada se retira el fajo, pero se continua volteándolo diariamente, alternando la cara expuesta al medio, durante los primeros tres meses de vida del producto.

Para la maduración, el queso debe mantenerse dentro de la zona geográfica un tiempo mínimo de 3 meses, en un lugar destinado para el efecto, el cual debe de estar limpio y bien adecuado para mantener las condiciones higiénicas. En caso de ser necesario, el queso podrá ser trasladado a un lugar, dentro de la zona geográfica, que cuente con condiciones controladas que garanticen la calidad del queso.

Las condiciones ambientales necesarias para la maduración del queso durante los primero tres meses son:

- Temperatura: < 28 °C
- Humedad relativa: 80 – 95 %

Durante este proceso, el queso debe mantenerse protegido del sol y de la lluvia, así como cualquier agente contaminante, para lo cual, cada tres o cuatro días la superficie del queso se limpia o “soba” manualmente con un lienzo limpio suave pero que no desprenda hilos y/o materia extraña que dañen la calidad del producto, además de voltear la pieza para favorecer la difusión de solutos y la adecuada formación de la corteza.

En caso de que la maduración del queso sea mayor a tres meses, se requerirán condiciones controladas de temperatura y humedad relativa que garanticen su calidad.

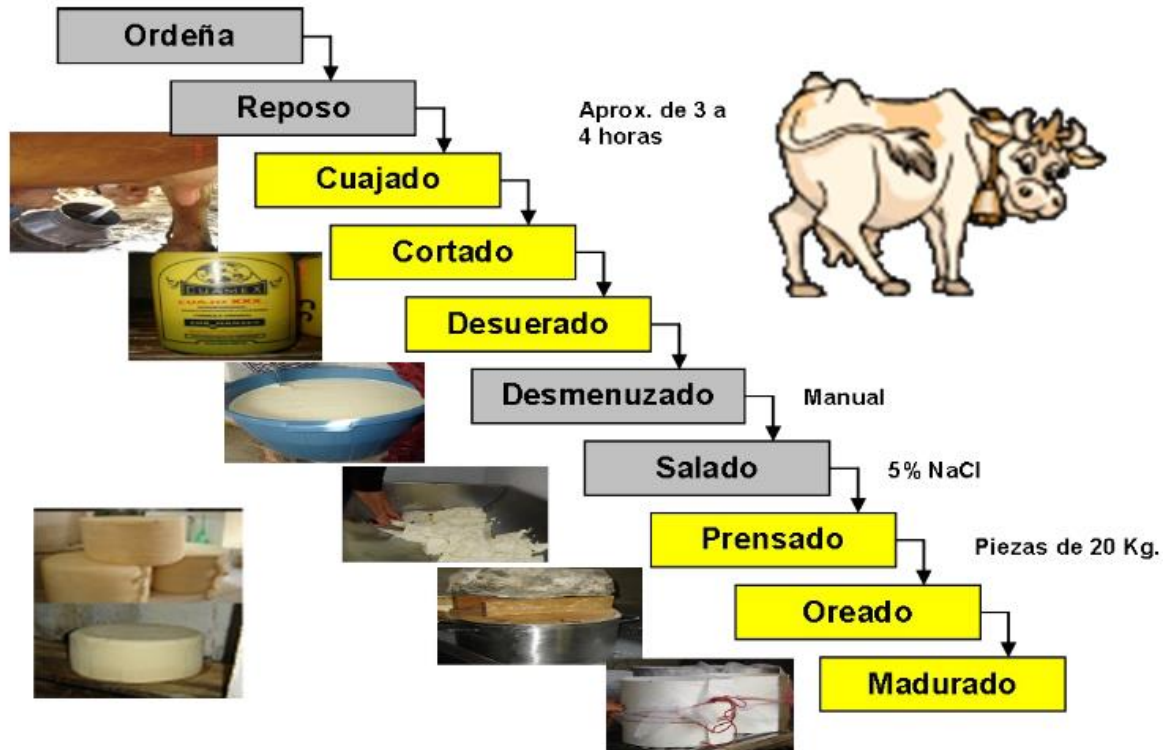


Figura 2. Proceso de elaboración del queso Cotija artesanal madurado; en gris, los puntos donde se puede contaminar el producto (García, 2011).

3.2. *Escherichia coli*.

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, con capacidad de movilidad mediante flagelos peritricos.

En la Tabla 1, se muestran los serogrupos y serovariedades de *E. coli* que más frecuentemente causan diarrea.

Tabla 1. Serotipos y serogrupos más comunes de *Escherichia coli* causantes de diarrea (Rodríguez, 2002).

ETEC	EIEC	EPEC	EAEC	STEC				
O6:H-	O28ac:H-	O18	O3:H2	O1:MN	O23:H7	O85:H10	O117:H7	O165:H-
O6:H16	O29:H-	O26:H-	O15:H18	O1:H1	O23:H16	O85:H23	O117:H7:K1	O165:H10
O8:H-	O112ac:H-	O26:H11	O44:H18	O1:H2	O25:H-	O86:H10	O117:H14	O165:H19
O11:H27	O124:H-	O55:H-	O77:H18	O1:H20	O25:H11	O88:H-	O117:H19	O165:H25
O15:H11	O124:H7	O55:H6	O86:H-	O1:HNT	O26:H-	O91:H-	O118:H16	O166:H15
O20:H-	O124:H30	O55:H7	O111:H21	O2:H1	O26:H2	O91:H10	O118:H30	O166:H28
O25:H-	O135:H-	O86:H-	O127:H2	O2:H2:K1	O26:H8	O91:H14	O119:H-	O168:H-
O27:H-	O143:H-	O86:H34	ONT:H10	O2:H6	O26:H11	O91:H21	O119:H5	O169:H-
O27:H7	O144:H-	O111:H-		O2:H7	O26:H21	O98:H-	O120:H19	O171:H2
O27:H20	O152:H-	O111ab:H2		O2:H27	O26:H32	O98:H-	O121:H-	O172:H-
O80	O167:H5	O119:H6		O4:H40	O27:H-	O98:H8	O121:H8	OX3:H2
O85:H7		O125ac:H21		O5:H-	O39:H4	103:H-	O126:H-	ONT:H21
O114:H21		O126:H-		O5:H16	O39:H8	O103:H2	O126:H2	ONT:H25
O115:H21		O126:H2		O6:H-	O45:H-	O103:H4	O126:H8	ONT:H28
O126:H9		O126:H27		O6:H1	O45:H2	O103:H6	O126:H21	ONT:H47
O128ac:H27		O127:H21		O6:H29	O45:H7	O103:H25	O126:H27	OR:H-
O139		O128ab:H2		O8:H-	O50:H-	O104:H7	O128:H12	OR:H20
O148:H28		O128:H12		O8:H14	O55:H-	O109:H2	O137:H41	OR:H21
O149:H4		O142:H6		O8:H21	O55:H6	O110:H-	O141:H-	
O149:H10		O158:H23		O9ab:H-	O55:H7	O110:H19	O144:H-	
O153:H45				O11:H49	O55:H10	O111ab:H-	O145:H-	
O159:H-				O14:H-	O55:H7	O111:H2	O145:H16	
O159:H4				O15:H-	O60:H-	O111:H7	O145:H25	
O159:H20				O15:H27	O65:H16	O111ab:H8	O145:H28	
O166:H27				O16:H-	O70:H11	O111:H34	O146:H-	
O167:H5				O16:H6	O73:H34	O111:HNT	O146:H21	
O169:H41				O17:H18	O75:H-	O112:H21	O146:H28	
O173:H-				O18:H-	O75:H5	O113:H2	O150:H10	
				O18:H7	O76:H19	O113:H4	O153:H2	
				O20:H7	O79:H7	O113:H53	O153:H25	
				O21:H5	O80:H-	O114:H4	O154:H-	
				O22:H-	O82:H-	O114:H48	O157:H-	
				O22:H1	O82:H8	O115:H18	O157:H7	
				O22:H8	O83:H1	O116:H19	O161:H-	
				O22:H40	O84:H2	O117:H-	O163:H19	

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénica.
 EIEC: *E. coli* enteroinvasiva.
 EPEC: *E. coli* enteropatógena.
 EAEC: *E. coli* enteroagregativa.

STEC: *E. coli* productora de toxina de Shiga o enterohemorrágica.
 NT: No Tipificable.
 R: Rugosa.

Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* no causan diarrea, las cepas que sí la causan se dividen en serogrupos importantes: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteropatógena (EPEC), enteroinvasiva (EIEC) y, enteroagregativa (EAEC). A continuación se describirán las serovariedades ETEC y EHEC (Rodríguez, 2002).

Se ha determinado que *E. coli* puede crecer en medios con 6% de cloruro de sodio (NaCl), por lo que, al contrario que *Salmonella spp.*, tolera mejor el NaCl y el NaNO₃; sin embargo, se ha visto que *E. coli* O157:H7 llega a crecer a una baja velocidad en caldos adicionados con 6.5% de NaCl, y no crece a una concentración de 8.5% (Dos Santos., 2007).

3.2.1. *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC).

Fue descrita por primera vez a finales de la década de 1960 y principios de 1970 en Calcuta por Gorbach Sacks *et. al.*, donde se destacó por su asociación a diarreas (Miguel, 2006).

Este serogrupo de *E. coli*, coloniza la mucosa del intestino mediante pili y fimbrias, los cuales tienen diversas formas de antígenos factores de colonización (CFA, por sus siglas en inglés). Su principal mecanismo de patogenicidad es la producción de enterotoxinas, llamadas toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST), este grupo tiene la capacidad de producir únicamente alguna de ellas o ambas como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Algunas cepas de *E. coli* enterotoxigénica productoras de enterotoxinas termolábiles y termorresistentes (Deng, M.Y., *et al.*, 1996).

Serovariedad	LT*	ST**
O2:NM	X	
O6:H-	X	
O7:NM	X	
O25:NM	X	
O45:H-	X	
O78:H11	X	X
O78:H12		X
O107:H11	X	
O138:NM	X	
O149:H10	X	
O149:NM	X	
O153:H-	X	
O159:H-	X	
sin serotipificar	X	

*LT – Toxina Termolábil.

**ST – Toxina Termoestable.

Estas toxinas actúan sobre la membrana celular; la LT aumenta los niveles de AMPc, mientras que las ST hacen lo propio con los niveles de GMPc, lo que provoca la lisis de la célula liberando iones y agua.

Este grupo presenta un riesgo especial para los niños menores de 2 años, en particular durante los primeros seis meses de vida, siendo la causa del 10-30% de casos de diarrea en México. Se ha encontrado en niños de edad escolar y adultos, sin embargo en este grupo llega a ser asintomático y poco frecuente o simplemente presentando la llamada “diarrea del viajero”.

La enfermedad producida por ETEC tiene un periodo de incubación de 14 a 50 h y el cuadro clínico que provoca, se caracteriza por diarrea aguda; sin sangre, sin moco y sin pus y en pocos casos llega a provocar fiebre y vómito. Aunque la

diarrea producida por las ETEC llega a ser leve y autolimitada puede llegar a tener consecuencias graves.

La principal fuente de contaminación de agua y alimentos es por material fecal, y la dosis infectiva es de 10^8 UFC (Rodríguez, 2002).

3.2.2. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC).

El cuadro llamado Colitis Hemorrágica (CH) descrito por Riley y quien lo relacionó a las EHEC, se caracteriza por dolor abdominal, diarrea acuosa sanguinolenta y poco o nada de fiebre; este cuadro es provocado por la ingestión de carne cruda o mal cocida (Rodríguez, 2002).

Su importancia como problema de salud fue reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1982 después de un brote en Estados Unidos de América por consumo de carne de hamburguesa cruda o mal cocida. Este serogrupo es productor de una citotoxina la cual tiene acción sobre células Vero, por lo que se le denominó Verotoxigénica (VT), la cual es muy parecida a la toxina de Shiga, producida por *Shigella dysenteriae*, por lo cual es llamada como “Shiga-like toxin” o toxina-semejante-a-Shiga (SLT) o simplemente “Shiga toxin” o toxina Shiga (STX), por lo anterior, las cepas de *E. coli* productoras de esta toxina también se les conoce como *E. coli* Verotoxigénica (VTEC) o Shiga toxin *E. coli* (STEC) por sus siglas en inglés (Rodríguez, 2002; OMS, 2011).

Este grupo puede crecer a temperaturas que oscilan entre los 7 y 50 °C, con una temperatura óptima de 37 °C; algunas EHEC pueden proliferar en alimentos ácidos, hasta un pH de 4,4, y en alimentos con una actividad acuosa (a_w) mínima

de 0,95; puede ser destruida cocinando los alimentos hasta que todas sus partes alcancen una temperatura de 70 °C o más (OMS, 2011).

Además de la toxina, las EHEC tienen otros mecanismos de patogenicidad como el fenómeno de adherencia y esfacelación (A/E), y presentan el gen cromosomal *eae* que codifica para la proteína de membrana externa (OMP) llamada intimina, cuya expresión es regulada por genes plasmídicos. Otro factor de patogenicidad es el plásmido pO157, que codifica para la enterohemolisina (Rodríguez, 2002).

El serotipo O157:H7 es el más importante dentro de las EHEC por su impacto en la salud pública, sin embargo hay también otros serotipos frecuentemente implicados en brotes y casos esporádicos (OMS, 2011).

3.2.2.1 *E. coli* O157:H7.

Karmali, en 1983, asoció esta cepa del serogrupo de las EHEC a casos aislados de Síndrome Urémico Hemolítico (SUH); dicho síndrome, se caracteriza por daño renal agudo, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática, precedida por diarrea con sangre.

E. coli O157:H7 no fermenta el D-sorbitol ni la ramnosa y no produce β -glucuronidasa.

Produce principalmente SUH y CH y se puede encontrar en bovinos, cabras, borregos y con menos frecuencia en cerdos y pollos; su principal reservorio es el intestino de ganado bovino.

También se ha logrado recuperar de frutas y vegetales como lechuga, rábanos, alfalfa; además de productos industrializados como mayonesa y jugos de naranja y manzana no pasteurizados (Rodríguez, 2002).

Se transmite al hombre principalmente por el consumo de alimentos contaminados, como productos de carne picada cruda o poco cocida y leche cruda. La contaminación fecal del agua y de otros alimentos, así como la contaminación cruzada durante la preparación de éstos, también es causa de infecciones (OMS, 2011).

En el año de 2011, el Instituto Roberto Koch, reporto un brote de este serogrupo en Alemania, donde se presentaron dos o más de los síntomas antes descritos (OPS, 2011).

3.2.3. *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

EPEC fue el primer grupo que se identificó serológicamente y se asoció con casos de diarrea en infantes, siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad.

El proceso de adherencia se da entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal por medio de pili o fimbrias rizadas llamadas Bfp (bundle-forming pilus), seguida de la destrucción de la microvellosidad y polimerización de actina, lo que lleva a la alteración del citoesqueleto en el sitio de unión de la bacteria.

Debido al aumento de los niveles de calcio intracelular y de proteína cinasa C, ha sido denominado adherencia y esfacelamiento (A/ E).

La información genética para la adherencia por medio del pili, está codificada en un plásmido de 50-70MDa denominado EAF (EPEC adherence factor) y de algunos genes cromosomales.

Además, es necesaria la síntesis de una proteína de membrana externa de 94 KDa llamada intimina, codificada por el gene cromosomal *eae* y que sirve como señal en A/E.

El principal reservorio de este serogrupo son niños y adultos con o sin síntomas, sin embargo afecta principalmente a niños en el rango de seis meses a dos años. También puede aislarse en adultos enfermos y sanos, principalmente cuando hay un factor predisponente como diabetes.

La forma de transmisión de la enfermedad es fecal-oral, por manos contaminadas de manipuladores de alimentos. Los reservorios de EPEC pueden ser niños y adultos con o sin síntomas.

EPEC puede ocasionar brotes o casos aislados de diarrea. El cuadro clínico que produce se manifiesta con diarrea aguda, vómito y fiebre baja. El diagnóstico de EPEC incluye ensayos in vitro en cultivos celulares y métodos moleculares (Rodríguez, 2002).

3.2.4. *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC).

Este serogrupo y *Shigella spp.* están relacionados tanto genética como bioquímicamente, ya que ambos son carboxilasa negativo, no móviles y lactasa negativo.

El mecanismo de patogenicidad de EIEC es mediante la invasión del epitelio del colón, para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las

vellosidades el de la mucosa, para lo que requiere mucinasas y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, donde se multiplica y se disemina a las células sanas adyacentes.

Los genes necesarios para la invasión se encuentran en un plásmido de 140 MDa llamado pInV, que codifica para proteínas, como por ejemplo las Ipa y otras que están involucradas en el proceso de patogénesis.

Los síntomas característicos en personas infectadas por EIEC son diarrea acuosa, con sangre y moco, pero algunos casos sólo presentan diarrea, ésta en ocasiones es indistinguible de la que produce ETEC, ya que produce una o varias enterotoxinas importantes en la producción de diarrea.

Las cepas EIEC se asocian más con brotes que con casos aislados, en los cuales la transmisión puede ser de persona a persona, por ingestión de alimentos y agua contaminada, convirtiéndose en un patógeno importante en niños mayores de seis meses (Rodríguez, 2002).

3.2.2. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC).

Se aisló por primera vez de pacientes con diarrea, y se encontró que serológicamente no correspondían al grupo EPEC, pero eran negativas a la prueba de EAF.

En estudios posteriores, se encontró un fenotipo de adherencia agregativa, la cual se caracteriza por la autoaglutinación de las bacterias unas con otras y que además es inespecífica, ya que las bacterias se agregan tanto a las células Hep-2 como a la superficie del cubreobjetos libre de estas células.

La adherencia a células Hep-2 y la hemaglutinación de eritrocitos humanos se debe a la presencia de una fimbria o adhesina flexible llamada fimbria I de adherencia agregativa (AAF/I), codificada por el gen *aggA* que se encuentra en un plásmido de 60 MDa.

También se ha descrito la fimbria AAF/II inmunológicamente diferente a AAF/I y que está codificada por el gen *aafA*; sin embargo, no todas las EAEC presentan estas fimbrias.

En el mecanismo de patogenicidad de EAEC están implicadas la bacteria y diversas moléculas que ella produce; también se sabe que las cepas EAEC tienen la capacidad de incrementar en la mucosa la producción y secreción de moco que atrapa a las bacterias que se autoaglutinan en una fina película en el epitelio intestinal.

El sitio blanco de daño de EAEC puede ser la mucosa del intestino grueso y delgado, con un periodo de incubación de menos de ocho horas y puede durar hasta 18 o 20 días. Esta bacteria puede causar brotes o casos aislados de diarrea persistente

Se manifiesta con diarrea líquida, de color verde, con moco, sin sangre y en algunos casos puede ser severa, requiriendo de rehidratación intravenosa (Rodríguez, 2002).

3.3. Métodos tradicionales y métodos moleculares.

Para la identificación de los agentes etiológicos responsables de un proceso infeccioso, se han utilizado, desde los inicios de la microbiología clínica, los llamado métodos tradicionales, sin embargo, se han empezado a utilizar métodos

moleculares que han hecho que esta identificación sea mucho más rápida y precisa.

Los métodos tradicionales, se basan en la identificación fenotípica de los microorganismos, sin embargo, estos métodos muestran algunas limitaciones para algunos tipos de microorganismos y son mucho más fáciles de implementar dada la simplicidad de su implementación y su bajo costo.

Los métodos moleculares permiten disminuir algunas de estas limitaciones, aunque su implementación no es universal. Esto se debe en principio a un costo más elevado y al grado de especialización necesarios para su implementación.

Como se mencionó anteriormente, los métodos tradicionales se basan en la identificación fenotípica, es decir, en las características observables como lo son la morfología, el desarrollo y las propiedades bioquímicas y metabólicas de los microorganismos.

Cuando es factible, el cultivo en medios sólidos, semisólidos y líquidos es el método de diagnóstico de elección, ya que permite el aislamiento del microorganismo, la identificación, observar la sensibilidad ante diversos agentes antimicrobianos y facilita la correcta aplicación de marcadores epidemiológicos.

En algunos casos, la poca o nula concordancia entre las características fenotípicas observadas en el aislamiento y las correspondientes con el género, especie o cepa, hacen que los métodos tradicionales realicen esta identificación bacteriana más probable más no la definitiva. Para minimizar estos problemas presentados por los métodos fenotípicos se han impuesto los métodos moleculares o genotípicos como procedimientos alternativos o complementarios.

Al igual que una amplia gama de genes han sido utilizados como blancos moleculares, se han generado diversas técnicas. En este escrito se hablará específicamente de la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR por sus siglas en inglés (Bou *et al*, 2011).

3.4. La reacción de PCR.

El concepto de PCR fue descrito por primera vez en 1974 por Panet y Khorana, sin embargo debe su nombre al Dr. Kary Mullis y sus colegas, quienes desarrollaron el protocolo en un periodo de 4 meses en 1983 en la Corporación Cetus (Maurer, 2006).

Este método tiene como objetivo obtener un gran número de copias de un fragmento en específico de ADN. A continuación se da una breve explicación de dos técnicas de PCR:

3.4.1. PCR punto final.

Se basa en la amplificación cíclica de ácidos nucleicos por medio de un par de cebadores para la detección del gen blanco, la reacción es optimizada según la secuencia a amplificar. Con unidades de ensayo enriquecidas, los análisis por PCR pueden detectar, entre otros, 10^1 UFC/g de EHEC O157:H7 en carne y 1 UFC/mL de ETEC en leche. Sin embargo otros estudios han encontrado límites de detección superiores.

Esta técnica se basa en la desnaturalización del ADN por medio del calor, lo que da lugar a la incorporación de las bases nitrogenadas llamadas deoxinucleosidos trifosfatos (dNTP's) mediante la acción de la enzima ADN

polimerasa en los sitios donde se hibridaron los cebadores específicos de ese fragmento original de ADN, una vez terminado el proceso cíclico de amplificación, los productos obtenidos son visualizados con luz UV en geles de agarosa sometidos a electroforesis.

La ADN polimerasa originalmente proviene de la bacteria extremófila *Thermus aquaticus*, la cual fue encontrada en los reservorios de aguas termales del parque de Yellowstone en EUA. Aunque recientemente se utilizan de otros orígenes como *Pyrococcus furiosus*. En ambos casos, actualmente las enzimas son recombinantes, producidas en *E. coli* como hospedero (Maurer, 2006).

3.4.2. PCR en tiempo real.

Avances en la química de fluorescencia y en instrumentos de detección permitieron avances en la tecnología de PCR a una más eficiente y sensible. El uso de colorantes de unión fluorescentes no específicos de la doble cadena de ADN (tales como SYBR Green o SYBR Gold), o el uso de tecnología específica de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (como el ensayo 5'-nucleasa [TaqMan], o el ensayo molecular beacon en conjunto con la actividad 3'-exonucleasa) ha resultado en ensayos de PCR con capacidad cuantitativa en tiempo real (Maurer, 2006).

Esta técnica de PCR se basa, al igual que la PCR punto final, en la desnaturalización del ADN, la hibridación de cebadores y la amplificación cíclica mediante la acción de la ADN polimerasa, la cual incorpora los dNTP. Sin embargo se diferencia en el hecho de que para la detección de una amplificación positiva, con la química de TaqMan, se utilizan sondas marcadas con fluoróforos

(los más comunes son los llamados VIC y FAM) las cuales hibridan en el fragmento de ADN entre los dos cebadores, al sintetizar la cadena complementaria y presentar la actividad de exonucleasa, esta hidroliza el fluoróforo, que al separarse del “apagador” emite fluorescencia.

Para la química de SYBRGreen, el fluoróforo se intercala entre la doble cadena una vez que la hebra complementaria ha sido sintetizada, es ahí donde el equipo detecta la fluorescencia emitida (Maurer, 2006).

3.5. Actividad acuosa (a_w).

La actividad acuosa o actividad de agua (a_w) es un concepto termodinámico definido como la relación entre la presión del vapor de agua de un sistema (P) y la presión del agua pura (P_0), este concepto está muy relacionado con la Humedad Relativa (HR).

El valor de a_w da un previo de la cantidad de agua metabólicamente disponible; las bacterias, al estar compuestas en un 80% de agua, solo pueden crecer sobre materiales que tengan la adecuada cantidad de agua libre disponible tanto para que los nutrientes puedan entrar como los desechos puedan salir de la célula.

Los valores mínimos de a_w para diferentes microorganismos son:

- Bacterias: $0.92 < a_w > 0.90$
- Levaduras: $0.83 < a_w > 0.85$
- Hongos filamentosos: $0.75 < a_w > 0.80$

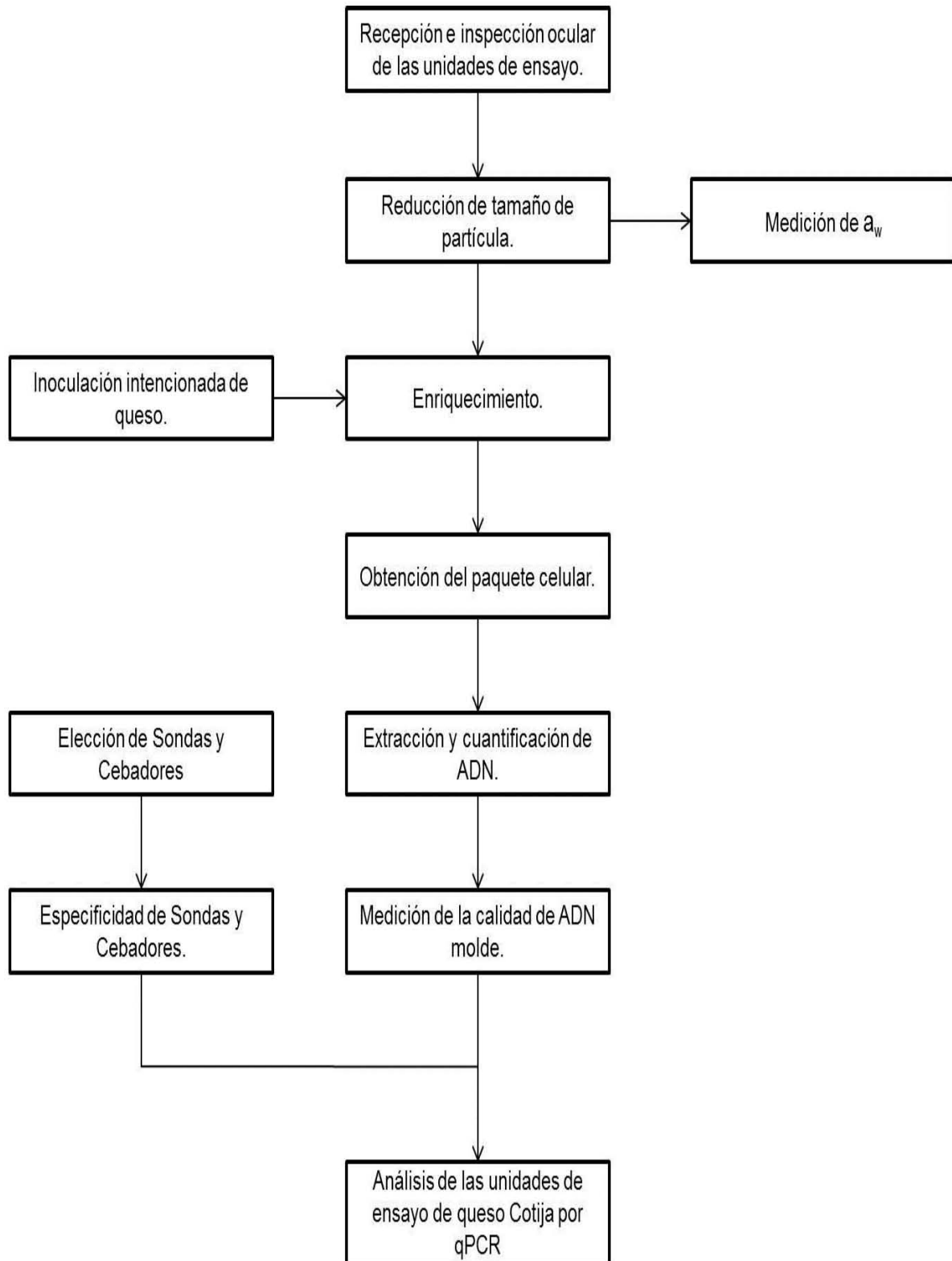
- Levaduras osmofílicas: $0.60 < a_w$

Para el caso específico de *E. coli*, el a_w para su óptimo crecimiento es de aproximadamente 0.995 (Garzón *et al*, 2007; García, 2011).

El crecimiento a una a_w baja es caracterizado por una fase lag de crecimiento larga, una velocidad de crecimiento lenta y una baja producción de biomasa.

En el queso Cotija artesanal madurado, el factor principal que afecta la a_w es la cantidad de sal añadida, sin embargo, la evaporación del agua de la superficie también contribuye a su disminución (García, 2011).

4. Diagrama Experimental



5. Metodología.

5.1. Unidades de ensayo.

Se recibieron 95 unidades de ensayo de Queso Cotija artesanal madurado, provenientes de la Región de Origen, las cuales fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), quien las recolectó directamente de los productores de la zona geográfica de origen. Cada unidad de ensayo consistió en 1 Kg de Queso Cotija artesanal madurado contenido en bolsas Ziploc®.

5.2. Cepas.

La Tabla 3 muestra el origen de las cepas utilizadas en este estudio.

Tabla 3. Origen de las cepas utilizadas.

	Origen			
	Ceparío F.Q.	Laboratorio 312	INIFAP	Comercial
Microorganismo	<i>E. coli</i> enterotoxigénica	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>E. coli</i> DH5α
	<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium			
	<i>Salmonella enterica</i> Enteritidis	<i>Brucella abortus</i> *		
	<i>Listeria monocytogenes</i>			
	<i>Staphylococcus aureus</i>			

* Cepa donada por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Se utilizó la cepa comercial *E. coli* DH5 α (F⁻ 80d/*lacZ*M Δ 15 (*lacZ*YA-argF) U169 *endA1 rec A1 hsdR17 (r_k- m_k+) deoR thi-1 supE44 λ -gyrA96 relA1)* utilizada en el laboratorio para clonación (Peña, C. 2009).

Las cepas puras fueron reactivadas en caldo cerebro-corazón y se incubaron a 37 °C por 24 horas.

5.3. Homogenización de la unidad de ensayo.

Para la homogenización de la unidad de ensayo del queso Cotija artesanal madurado, se siguió la siguiente metodología:

Una vez recibida la unidad de ensayo, se procedió a realizar una inspección ocular de la misma, para determinar la cantidad de materia extraña (pelos, insectos, etc.) o de manchas (de posible crecimiento microbiano) que pudieran presentarse en la superficie.

Posteriormente se redujo el tamaño de partícula de la unidad de ensayo, para lo cual se utilizaron cuchillos, tabla para cortar, cucharas metálicas y un procesador de alimentos Oster *Le Chef*, los cuales fueron lavados con agua y jabón, desinfectados con etanol al 75 % e hipoclorito de sodio al 10 % y esterilizados con luz UV durante 5 minutos por cada lado. La esterilización del material se realizó dentro de la Campana de Flujo Laminar (Industrias Adler S.A. de C.V.), este procedimiento se realizó antes de homogenizar la unidad de ensayo.

Una vez limpios, desinfectados y esterilizados los materiales necesarios, sobre la tabla, se retiró la corteza de las unidades de ensayo con uno de los

cuchillos, teniendo cuidado que la parte del cuchillo que toco la corteza no tocara la parte interna del queso (Figura 3).

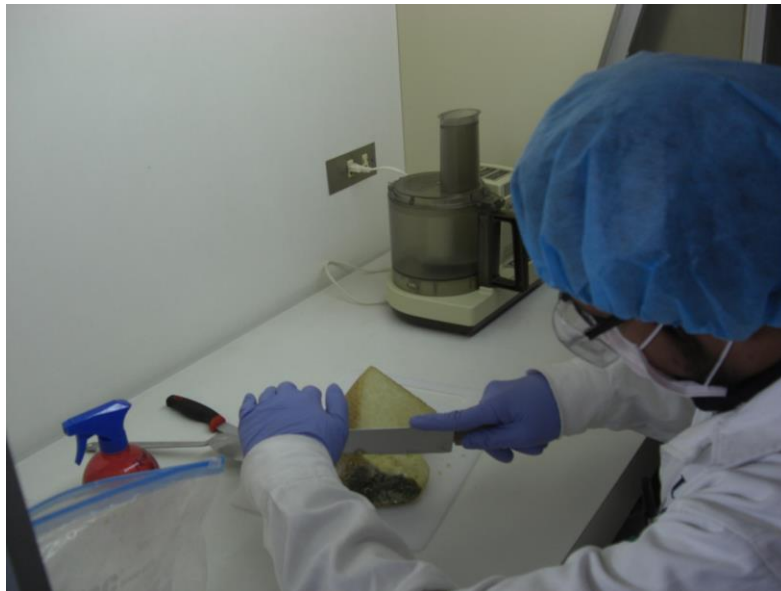


Figura 3. Remoción de la corteza del queso.

Una vez retirada la corteza, con el cuchillo restante se procede a cortar la parte interna del queso en pequeños pedazos (Figura 4).

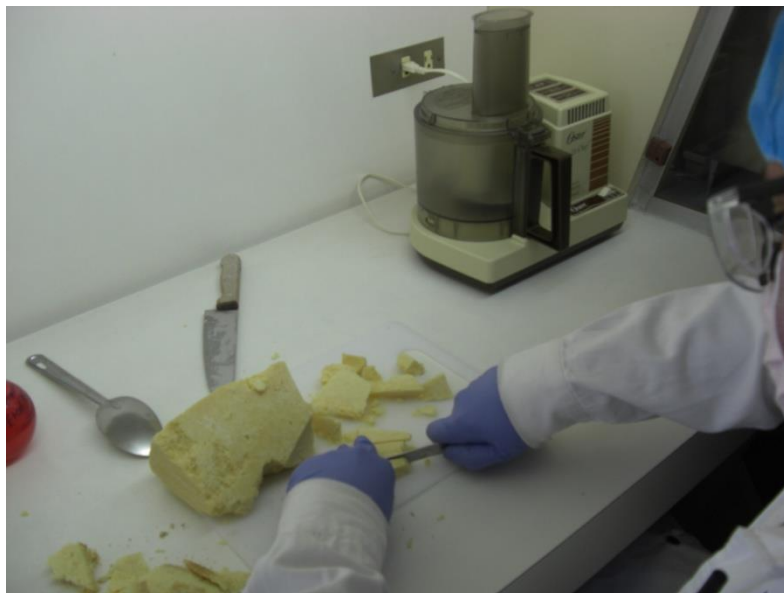


Figura 4. Reducción de pedazos de la unidad de ensayo con un cuchillo diferente.

Con la ayuda de las cucharas metálicas se pasan estos pedazos al procesador de alimentos y se reduce el tamaño de partícula de la unidad de ensayo (Figura 5).



Figura 5. Reducción de tamaño de partícula de las unidades de ensayo.

Una vez que se redujo el tamaño de partícula de toda la parte interna de la unidad de ensayo, esta se pasa a una bolsa Ziploc® grande apta para congelación etiquetada con el número de la unidad de ensayo (Figura 6). En algunos casos al cortar la parte interna del queso se encontraron materias extrañas, las cuales fueron retiradas y no procesadas.



Figura 6. Almacenamiento en bolsa Ziploc® para congelación etiquetada con el número de unidad de ensayo.

De la bolsa Ziploc® donde se guardó la unidad de ensayo homogenizada se prepararon 5 – 7 bolsas más pequeñas donde se pesaron 25 g de unidad de ensayo y todo se almacenó en un ultracongelador Revco Nuaire -86 °C Ultralow Freezer a una temperatura de -70 °C.

5.4. Medición de a_w

La Actividad acuosa (a_w) de las unidades de ensayo se midió por duplicado, según las instrucciones del fabricante del higrómetro Rotronic Instrument Corp. AwQuick con la sonda AwVC, el cual calcula el valor de la a_w basado en un modelo matemático del proceso de equilibrio (Hernández, 2012).

5.5. Enriquecimiento.

Se descongeló la bolsa que contenía 25 g de la unidad de ensayo a analizar a 4 – 8 °C por 18 horas y no más de 24 horas, según lo marcado en la NOM-110-SSA1-1994.

En la campana de flujo laminar, el contenido de la unidad de ensayo se introdujo en una bolsa para Stomacher, donde se agregaron 225 mL de citrato de sodio al 2 %, pH 8 y un 1 mL de neutrasas (NovoDisk) para ayudar a la separación de la grasa de la unidad de ensayo y se incubó por 1 hora a 45 °C.

Pasado el tiempo de incubación, se homogenizó en un Laboratory Blender Stomacher 400 (Seward) por 5 minutos a velocidad alta. Del contenido de la bolsa, se traspasaron 30 – 40 mL a un tubo Falcon estéril de 50 mL teniendo especial cuidado en que la menor cantidad de grasa posible fuera transferida al tubo, el cual fue centrifugado posteriormente a 3290 rpm a una temperatura de 4 °C por 5 minutos en una centrifuga Heraeus Biofuge primoR (Biofuga).

Del tubo centrifugado se tomaron 2.5 mL de la fase intermedia y se inocularon en un tubo Falcon con 30 mL de Caldo Cerebro-Corazón (BHI) (Difco) adicionado con 2 % de casaminoácidos (*Anexo A*) y se incubó por 24 horas a 37 °C sin agitación en la Estufa estática B.G. E71 (Erume *et al*, 2010).

5.6. Obtención del paquete celular.

Una vez transcurridas las 24 horas de incubación, el cultivo (cepas puras y unidades de ensayo enriquecidas) se inactivó en baño maría a 80 °C por 20

minutos, una vez que se enfrió, se centrifugó en la centrifuga Heraeus Biofuge primoR (Biofuga) a 8500 rpm a 4 °C por 5 minutos.

Posteriormente, por decantación se removió la fase acuosa y el paquete celular se resuspendió en 500 µL de solución salina 0.85 % pH 7 estéril y se traspasó a un microtubo estéril de 2 mL, el cual se centrifugó en la centrifuga Heraeus Biofuge primoR (Biofuga) a 8500 rpm a 4 °C por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante por decantación; el paquete celular se almacenó en congelación a -20 °C para la posterior extracción de ADN.

5.7. Extracción y medición de concentración de ADN.

El método de extracción de ADN que se utilizó, es el que fue proporcionado por el fabricante del sistema comercial FastID:

Se preparó la solución de lisis para cada paquete celular, la cual consistió en 10 mg/mL de proteinasa K, 1 mL de buffer de lisis, ambos del sistema comercial y 8.5 – 10 mg de lisozima (Research Organics) y se agitó vigorosamente en vórtex y se incubó en el Termomixer (Eppendorf) por 30 minutos a 65 °C.

Una vez que terminó la incubación, se adicionaron 750 µL de cloroformo y se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos en la centrifuga Heraeus Biofuge primoR (Biofuga).

Del sobrenadante, se traspasaron 500 – 750 µL a un microtubo de 2 mL estéril y se adicionó el buffer de unión del sistema comercial en una cantidad igual a la que se traspasó de sobrenadante y se centrifugó por 5 minutos a 10,000 rpm.

Todo el sobrenadante se pasó a las columnas de filtración del sistema comercial, las cuales se encontraban conectadas al equipo Manifold, el cual trabaja por vacío, posteriormente se hizo un lavado con 800 μ L de buffer de lavado.

Una vez que las columnas no contenían líquido, se hicieron 3 lavados adicionales con 800 μ L de etanol al 75 %, el cual se preparó con agua destilada estéril, posteriormente, las columnas se centrifugaron como se describió anteriormente para eliminar cualquier rastro de etanol de las columnas.

Una vez que las columnas se encontraban sin rastros de etanol, estas se pasaron a microtubos de 1.5 mL estériles y se adicionó el buffer TE 1X del sistema comercial en una cantidad de 100 μ L, el cual se encontraba previamente calentado a 65 °C y se incubó en el termomixer (Eppendorf) a 65 °C por 10 minutos.

Pasado el tiempo de incubación, los tubos fueron centrifugados a 10,000 rpm a 4 °C por 2 minutos para recuperar el ADN.

Para la medición de la concentración del ADN obtenido se utilizó el espectro Epoch (Biotech) en formato nanogota con el accesorio Take 3 en el cual se midió la absorción a 260 y 280 nm y la relación entre estas absorbancias (A_{260}/A_{280}), del que se obtuvieron resultados de la concentración de ADN y la pureza del mismo. Una vez que se les midió la concentración de ADN, los tubos se almacenaron en congelación (-20 °C).

5.8. Medición de la calidad del ADN molde.

La calidad del ADN molde se midió a través de la electroforesis en geles de agarosa grado biología molecular (BioRad) al 2 % de los productos de amplificación de la Región V3 del gen 16S ADNr obtenidos a partir de la reacción de PCR punto final, los cuales fueron teñidos con bromuro de etidio (BioRad). El marcador de peso molecular utilizado fue el MassRuler Low Range DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Scientific).

La reacción de PCR punto final se llevó a cabo en el termociclador TC-312 (Techne); las concentraciones de reactivos y condiciones utilizadas para esta reacción, se encuentran en el *Anexo B*.

Se tomaron imágenes de los geles con una cámara fotográfica instantánea y con el equipo Molecular Imager® GelDoc™ XR+ Imaging System (BioRad).

5.9. Elección de Sondas y Cebadores.

Los cebadores y sondas fueron elegidos a partir de diversos artículos publicados, y se hicieron alineamientos hechos en el Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI), y se mandaron sintetizar a la empresa Life Technologies®.

5.10. Especificidad de sondas y cebadores.

Una vez que el ADN de las cepas puras que se usaron como controles negativos (Tabla 3) fue obtenido según lo descrito en los apartados 5.5 a 5.7, se realizó un

PCR tiempo real utilizando las sondas y cebadores de los genes elegidos para ETEC y EHEC, usando como control positivo ADN de la cepa pura de cada *E. coli* de interés. Las condiciones de reacción se describen en el *Anexo C*.

5.11. Inoculación intencionada de queso.

De las cepas puras de las bacterias que se buscaron en este estudio, se hicieron diluciones seriales hasta la 10^{-8} ; de dicha dilución se inoculó, durante la etapa de enriquecimiento, un queso al azar, de entre las unidades de ensayo 1 a 10 libre de *E. coli* y se prosigió con los procedimientos de la metodología descritos en las secciones 5.5 a 5.7 y 5.12.

De las diluciones antes hechas, se inocularon las Placas Petrifilm® de 3M para el Recuento de *E. coli*/Coliformes, y se hizo también una cuenta en placa en agar BHI; las cuales se incubaron por 24 horas a 37°C.

5.12. Análisis de unidades de ensayo de queso Cotija artesanal madurado.

Después de realizar los procedimientos descritos en los puntos 5.3 y 5.5 a 5.8, se llevó a cabo el análisis de las 95 unidades de ensayo mediante la técnica de PCR tiempo real, el llenado de la placa se hizo en la Campana de PCR Purifier PCR Enclosure Modelo 3740002 (Labconco).

Las condiciones para la qPCR del análisis de ETEC y EHEC, fueron las señaladas por Life Technologies para el equipo Applied Biosystems 7500, con un volumen total de reacción de 20 μ L, las cuales se describen en el *Anexo C*.

A las unidades de ensayo que resultaron ser sospechosas de presentar las cepas de *E. coli* mediante el análisis por qPCR, se analizaron mediante placas de Petrifilm® de Alta Sensibilidad para Coliformes (3M) según las instrucciones especificadas por el proveedor.

6. Resultados y Análisis.

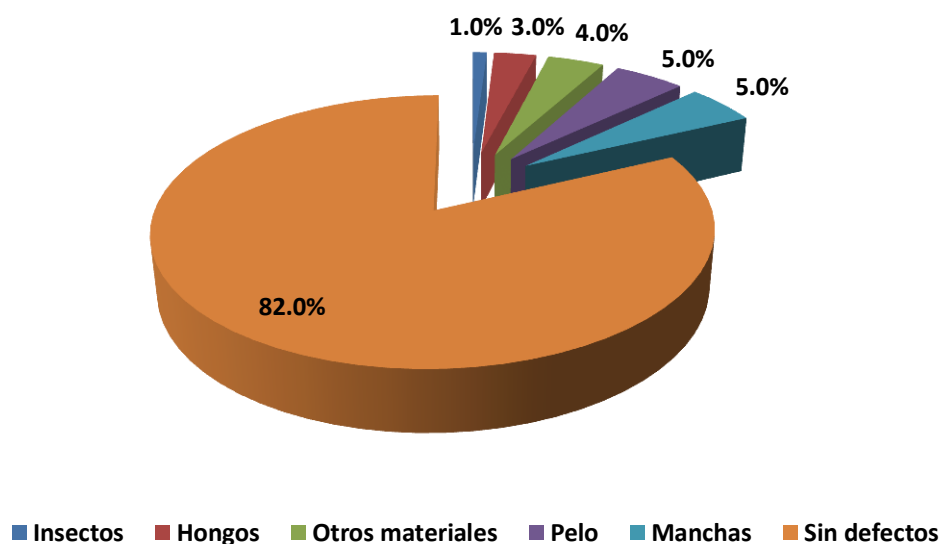
6.1. Inspección Ocular de las unidades de ensayo.

Dada la naturaleza del queso, producido artesanalmente, se decidió hacer una inspección ocular de las unidades de ensayo antes de hacer cualquier otro procedimiento.

De las 95 unidades de ensayo que se recibieron, sólo un pequeño porcentaje de ellas presentaron algún defecto (crecimiento de hongos y levaduras, insectos, pelo, otros materiales) tanto en la corteza como en el interior. Éstos indican las buenas condiciones de higiene y los cuidados que los productores tuvieron al momento de la elaboración del producto.

La Gráfica 1 muestra el porcentaje de las unidades de ensayo con defectos en la parte interior del queso tales como pelo,

Inspección ocular del interior (%)



Gráfica 1. Porcentaje de defectos en el interior de las unidades de ensayo.

6.2. Actividad acuosa (a_w).

Se midió la actividad acuosa de todas las unidades de ensayo de queso Cotija Región de Origen para discernir cuáles podrían estar contaminadas con las cepas patogénicas de *E. coli* que se buscaron en este estudio. Los resultados completos de esta medición, se pueden observar en el *Anexo D*. Se puede apreciar que la mayoría de las unidades de ensayo tienen un a_w menor a 0.90, por lo que no deberían tener el ambiente adecuado para el desarrollo de *Escherichia coli*, la cual requiere un valor de a_w aproximado a 0.99 (Garzón y Gómez, 2007; García, V., 2011).

6.3. Evaluación de la calidad del ADN molde.

Se realizó la evaluación de la calidad del ADN para evitar resultados falsos-negativos, los cuales serían causados por no haber obtenido un ADN de calidad amplificable o por interferencias causadas por inhibidores presentes en la matriz o el método de extracción, y esto indicaría que el resultado de la qPCR fuera no confiable.

Esto se evaluó midiendo la concentración por valor de absorbancia a 260nm, y la relación 260/280, la cual indica la pureza del ADN, obteniendo los resultados de la Tabla 4; los resultados completos pueden ser consultados en el *Anexo E*.

Tabla 4. Ejemplo de las concentraciones promedio de ADN obtenido del enriquecimiento de cepas puras y de 12 quesos elegidos al azar.

Unidad de ensayo	Concentración promedio de las extracciones (ng/μL)	Relación A_{260}/A_{280} promedio de las extracciones
Cepa pura ETEC	327	1.99
Cepa pura EHEC	400	1.96
12 Quesos al azar	65	2.07

Los resultados anteriores confirman que el método de extracción utilizado es adecuado para obtener ADN en cantidad y pureza adecuadas, ya que se obtiene en cantidades adecuadas para el análisis por qPCR (*Anexo C*) y principalmente por la relación A_{260}/A_{280} , la cual indica que el ADN obtenido no está contaminado con residuos celulares o solventes orgánicos utilizados en la extracción del mismo (5.7).

Además de la medición de la concentración de ADN y la relación A_{260}/A_{280} , se amplificó la región V3 del gen ribosomal 16S de 20 unidades de ensayo al azar, esta región del genoma es altamente conservada en bacterias, lo cual la hace un blanco idóneo para saber si se obtuvo ADN de calidad amplificable; de este experimento se obtuvieron los resultados de la Figura 7.

El gel de agarosa de la Figura 7, muestra que se obtiene ADN amplificable a partir de unidades de ensayo de queso Cotija artesanal madurado, lo cual refuerza a los resultados obtenidos en la PCR tiempo real. Esto es solo un ejemplo de las 20 unidades de ensayo analizadas, las demás imágenes se muestran en el *Anexo F*.

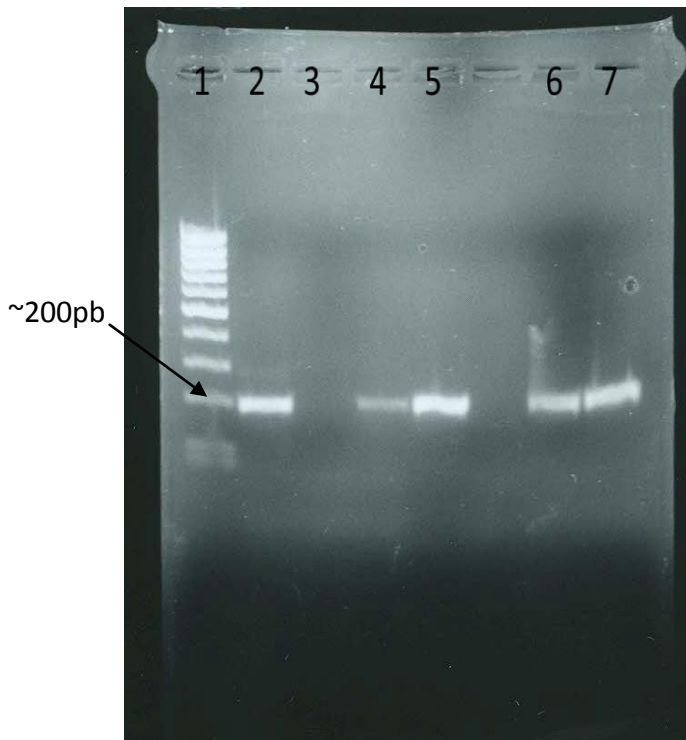


Figura 7. Amplificación de la región V3 del gen ribosomal 16S en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio.

Carriles:

- 1: Mass Ruler Ladder Low Range (Fermentas).
- 2: Control positivo, cepa pura ETEC.
- 3: Control negativo (NTC)
- 4 a 7: Amplicones obtenidos del ADN de las unidades de ensayo 1, 2, 5 y 7, respectivamente.

6.4. Cebadores y sondas para la detección de ETEC y EHEC (O157:H7)

Se buscaron de entre la bibliografía disponible referencias sobre los genes que se podían utilizar para las sondas y cebadores para el análisis de las unidades de ensayo, la Tabla 5a muestra un condensado de lo encontrado en la revisión bibliográfica hecha para ETEC, mientras que la Tabla 5b muestra lo encontrado para EHEC.

Tabla 5a. Genes encontrados en la bibliografía para la elección de sondas y cebadores para ETEC.

Gen	Codifica	Función	Referencia
<i>toxB</i> región	Unidad B de LT	Toxina termolábil	Deng, M., <i>et al</i> , 1996
<i>estB</i>	STb	Toxina termoestable	Dubreuil, J., <i>et al</i> , 1997
<i>eltB</i>	LT	Toxina termolábil	Nada, R., <i>et al</i> , 2010
<i>est</i>	ST	Toxina termoestable	
<i>estA1</i>	ST1	Toxina termoestable	Patel, C., <i>et al</i> , 2011
<i>eltB1</i>	LT1	Toxina termolábil subunidad 1	

Tabla 5b. Genes encontrados en la bibliografía para la elección de sondas y cebadores para EHEC.

Gen	Codifica	Función	Referencia
<i>vtx1</i>	Verocitotoxinas	Toxinas	EFSA, 2009
<i>vtx2</i>			
<i>Eae</i>	Intimina	Colonización del enterocito	Madic, J., <i>et al</i> , 2010
<i>eae</i>			
<i>eae</i> (variantes $\beta 1, \gamma 1, \epsilon, \gamma 2/\theta$)			Madic, J., <i>et al</i> , 2011
<i>EHEC-hlyA</i>			
<i>espP</i>	Serina		
<i>katP</i>	Catalasa peroxidasa		Møller, E., 2003
<i>rfaE</i> _{O157}	Perosaminasintetasa	Marcador genético	EFSA, 2009
			Madic, J., <i>et al</i> , 2011

Una vez hecho el análisis de lo encontrado en la bibliografía referente a los posibles genes blancos a utilizar, se seleccionaron dos de estos genes para cada microorganismo.

Para ETEC se seleccionaron los genes codificantes para ambas toxinas, ya que lo descrito en la Tabla 2 indica que no todas las cepas de ETEC producen ambas toxinas, por lo que se decidió buscar ambos genes.

En el caso de EHEC, con los genes específicos elegidos sólo es posible identificar a *E. coli* O157:H7 hasta el antígeno O157, ya que para detectar el antígeno H7 son necesarios estudios inmunológicos, los cuales no se realizaron por tratarse del desarrollo de un ensayo de tamizaje. Por lo anterior las sondas y cebadores utilizados únicamente fueron utilizados para detectar este serogrupo. En caso de tener algún resultado positivo se tendrían que realizar dichos estudios inmunológicos.

Mediante el análisis por BLAST, se encontró que las sondas y cebadores reportados en la bibliografía, son específicos para las cepas de interés de *E. coli* ya que el valor de expectancia (Valor E) y el porcentaje de máxima identidad arroja valores aceptables para dichas cepas. Los resultados de este análisis se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados del análisis por BLAST de los Genes Específicos para el análisis de ETEC y EHEC por qPCR

	gen	Valor E	Máxima identidad
ETEC	<i>GE ETEC 1</i>	0.0	100%
	<i>GE ETEC 2</i>	0.0	100%
EHEC	<i>GE EHEC 1</i>	0.0	100%
	<i>GE EHEC 2</i>	0.0	100%

6.5. Especificidad de sondas y cebadores.

Con este experimento se buscó demostrar la especificidad tanto de sondas como de cebadores para los genes blancos elegidos probándolos contra ADN de diferentes microorganismos patógenos y no patógenos. Los microorganismos patógenos, los cuales son buscados en el grupo de trabajo para la determinación

de la inocuidad del queso Cotija artesanal madurado, que se usaron como control para este experimento fueron: *Listeria monocytogenes*, *Brucella abortus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* Typhimurium y *S. enterica* Enteritidis. Los microorganismos no patógenos utilizados fueron *Enterococcus sp.*, el cual se ha observado, por otros estudios del grupo de trabajo, que es parte de la microbiota natural del queso Cotija artesanal madurado, y *Escherichia coli* DH5 α , la cual, al ser una cepa de *E. coli* utilizada en biología molecular, se esperaba que no presentara amplificación con las sondas y cebadores ya que los genes elegidos no se encuentran en su genoma.

En las Tablas 7a y 7b, se muestran los ciclos umbrales (Ct) promedio de los controles positivos de ETEC y EHEC (ADN de las cepas puras) utilizados en el análisis por qPCR, los cuales se utilizaron como base para determinar si los microorganismos utilizados como control negativo (patógenos y no patógenos) de este experimento presentaron amplificación o no.

Tabla 7a. Ciclos umbral (Ct) promedio del control positivo para ETEC.

Control	GE ETEC 1		GE ETEC 2	
	Ct promedio	Desviación estándar	Ct promedio	Desviación estándar
ETEC	11.08	0.23	NA	--

NA – No hubo amplificación.

Tabla 7b. Ciclos umbral (Ct) promedio del control positivo para EHEC.

Control	GE EHEC 1		GE EHEC 2	
	Ct promedio	Desviación estándar	Ct promedio	Desviación estándar
EHEC	12.32	0.01	12.88	0.01

Como se observa, según el análisis de qPCR realizado a los controles positivos, no hay amplificación para el *GE ETEC 2*, con lo cual se corrobora que no todas cepas de ETEC poseen los genes para las toxinas que este género produce, lo que se busca es cubrir a la mayoría de las cepas de ETEC (*ver Tablas 1 y 2*), las cuales pueden tener sólo uno de los genes o ambos.

Además se puede observar que, según los ciclos umbral promedio obtenidos, hay una amplificación específica con las sondas y cebadores elegidos para los genes *GE EHEC 1* y *GE EHEC 2*, en este caso sí hay amplificación para ambos genes. El *GE EHEC 1*, está presente en todas las cepas de EHEC, mientras que el *GE EHEC 2*, indica la presencia del serogrupo O157 y se usa como marcador genético.

Según los resultados de los ciclos umbral de la Tabla 8a se observa que los cebadores son específicos para ETEC ya que no se obtuvo un valor de ciclo umbral cercano al obtenido del control positivo lo que indica una amplificación negativa con los microorganismos patógenos y no patógenos utilizados como controles negativos.

Tabla 8a. Ciclos umbral (Ct) promedio de los controles negativos para ETEC.

Control	GE ETEC 1		GE ETEC 2	
	Ct promedio	Desviación estándar	Ct promedio	Desviación estándar
EHEC	31.43	0.82	NA	--
E. coli DH5α	NA	--	NA	--
<i>Brucella abortus</i>	NA	--	NA	--
<i>Enterococcus sp.</i>	36.75	1.05	NA	--
<i>Listeria monocytogenes</i>	28.64	2.09	NA	--
<i>Salmonella enterica</i> Enteritidis	NA	--	NA	--
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium	34.14	0.39	NA	--
<i>Staphylococcus aureus</i>	27.72	0.72	NA	--

NA – No hubo amplificación.

La Tabla 8b muestra los ciclos umbrales promedio de los genes específicos *GE EHEC 1* y *GE EHEC 2* de EHEC con los microorganismos patógenos y no patógenos utilizados como controles negativos, que se buscan en el queso Cotija artesanal madurado, obteniendo que las sondas y cebadores elegidos son específicos para los genes de interés, ya que no se presenta un valor de ciclo umbral cercano al obtenido con el control positivo.

Tabla 8b. Ciclos umbral (Ct) del análisis de los controles positivos y negativos para EHEC obtenidos por el análisis qPCR.

Control	GE EHEC 1		GE EHEC 2	
	Ct promedio	Desviación estándar	Ct promedio	Desviación estándar
ETEC	33.84	0.23	34.89	0.93
E. coli DH5α	NA	--	NA	--
<i>Brucella abortus</i>	35.35	0.08	36.01	1.16
<i>Enterococcus sp.</i>	31.02	0.69	31.36	1.57
<i>Listeria monocytogenes</i>	28.83	0.33	29.40	0.07
<i>Salmonella enterica</i> Enteritidis	NA	--	NA	--
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium	33.88	0.86	33.67	0.06
<i>Staphylococcus aureus</i>	31.11	0.06	32.41	0.42

NA – No hubo amplificación.

Después de este análisis, se determinó que el ciclo umbral (Ct) para determinar que el análisis se consideraría negativo, es de 27.6 para ETEC y 28.7 para EHEC. Las gráficas correspondientes a este experimento, pueden observarse en el *Anexo G*.

En resumen, en todos los casos donde se probó la especificidad de sondas y cebadores, ningún microorganismo, ya sea patógeno o no, presenta amplificación, lo que complementa los resultados obtenidos por el BLAST de las sondas y cebadores de ETEC y EHEC; es decir, las sondas y cebadores elegidos, son específicos para dichos genes.

6.6. Inoculación intencionada de queso.

Se realizó la inoculación de una unidad de ensayo al azar con el fin de determinar si la matriz presenta alguna interferencia, y si el método de enriquecimiento es el adecuado para este estudio.

Después de la inoculación de la unidad de ensayo de queso Cotija elegida al azar, con cepa pura, se procedió al tratamiento de enriquecimiento, el cual involucra el cultivo en caldo BHI enriquecido con casaminoácidos al 2% por 24 horas a 37°C; se extrajo el ADN y se midió su concentración, obteniendo los resultados de la Tabla 6 y se procedió a hacer el análisis por qPCR.

Tabla 9. Concentraciones promedio de ADN obtenido de la inoculación de la unidad de ensayo de queso Cotija artesanal madurado.

Unidad de ensayo	Concentración promedio de las extracciones (ng/μL)	Relación A_{260}/A_{280} promedio de las extracciones (ng/μL)
Queso inoculado con ETEC	343±21	2.011
Queso inoculado con EHEC	241±52	1.988

Las Figuras 8a y 8b, muestran las gráficas de amplificación de los controles positivos y de la unidad de ensayo inoculada con cepa pura de ETEC y EHEC, el cual aparece a ciclos tempranos después de haber hecho la extracción de ADN de un queso inoculado; sin embargo, la amplificación del mismo queso pero sin haber sido inoculado con las cepas puras (Figuras 9a y 9b) aparece a ciclos tardíos; por lo cual se considera que una amplificación a estos ciclos del análisis, son resultados negativos.

Este experimento es la base para determinar si los resultados obtenidos para confirmar que el método de enriquecimiento es adecuado para que el número de bacterias aumente de tal manera que el valor de Ct obtenido después de esta etapa sea similar al de la cepa pura del microorganismo de interés.

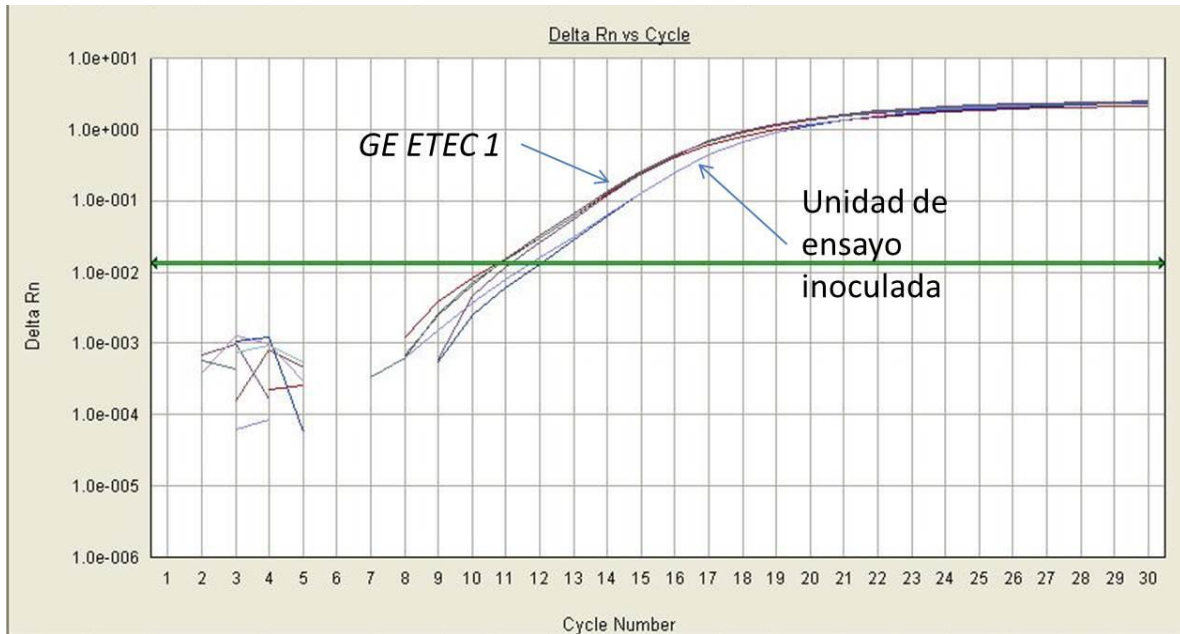


Figura 8a. Gráfica de amplificación de qPCR de los controles positivos de ETEC y de la unidad de ensayo inoculada.

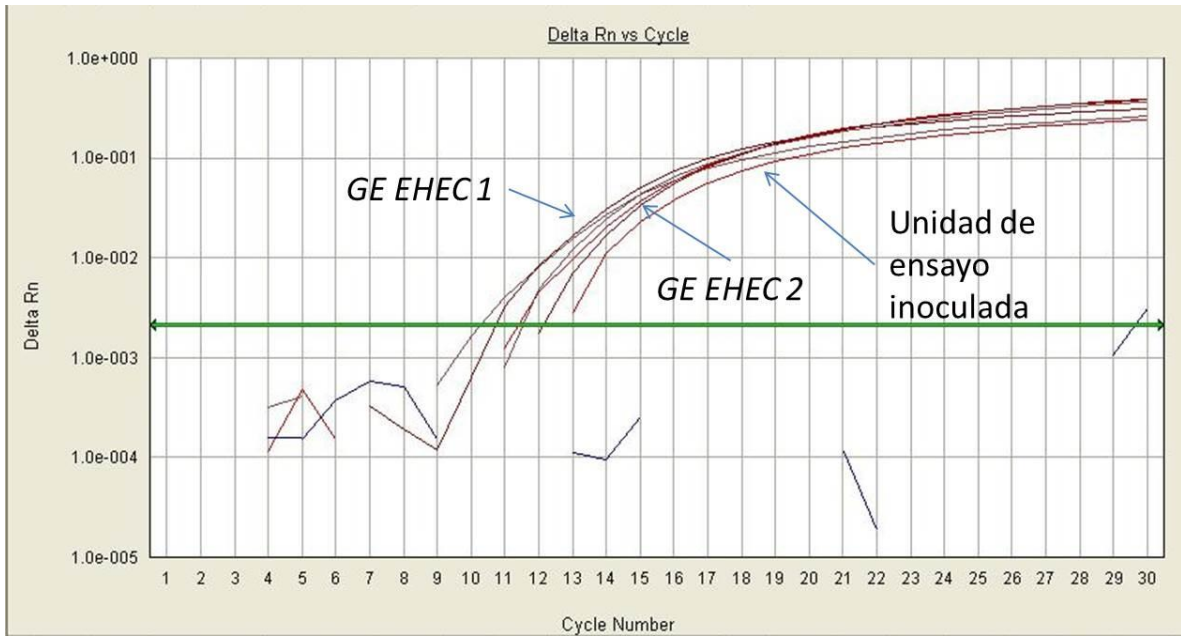


Figura 8b. Gráfica de amplificación de qPCR del control positivo de EHEC y de la unidad de ensayo inoculada.

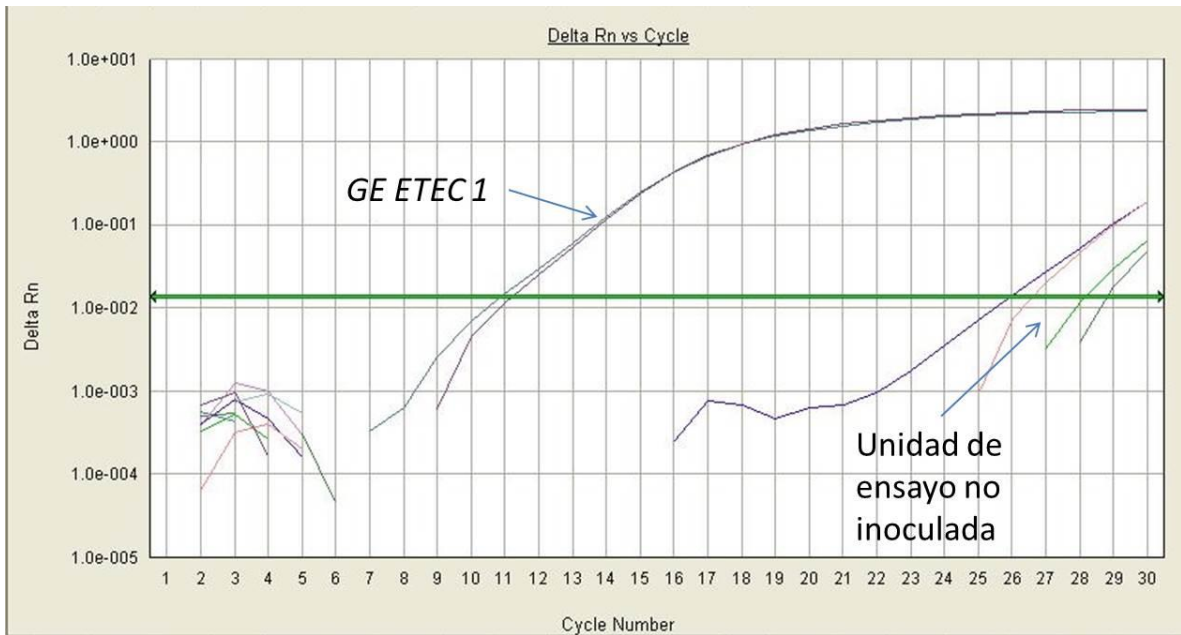


Figura 9a. Gráfica de amplificación de qPCR control positivo de ETEC y de la unidad de ensayo no inoculada.

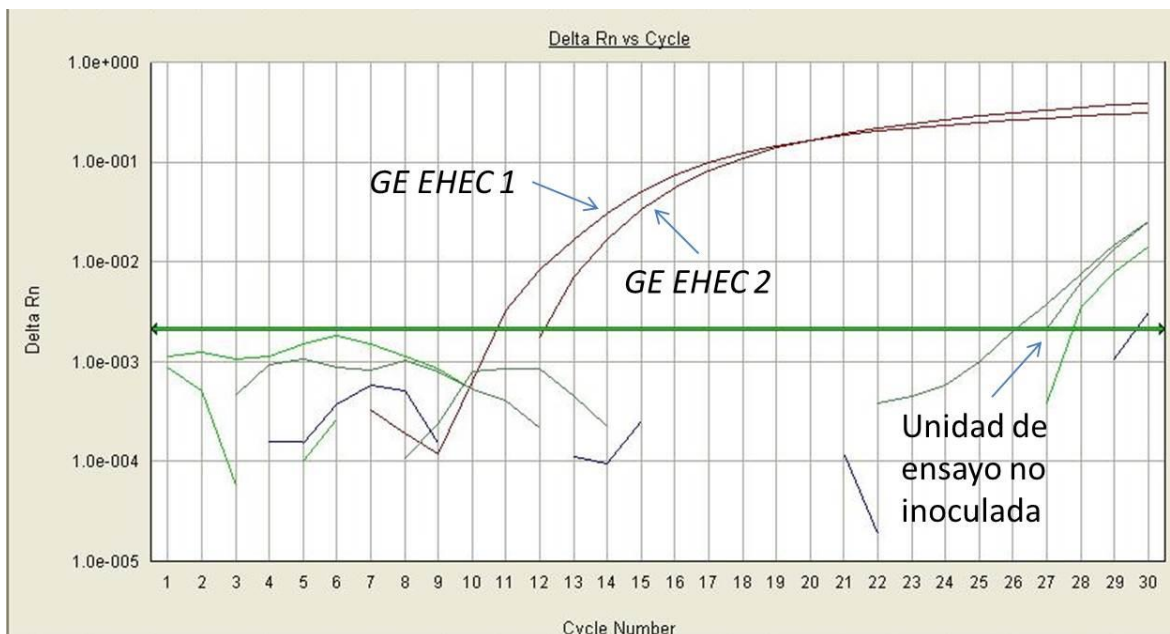


Figura 9b. Gráfica de amplificación de qPCR control positivo de EHEC y de la unidad de ensayo no inoculada.

6.7. Análisis de las unidades de ensayo de queso Cotija artesanal madurado.

Las unidades de ensayo de queso Cotija artesanal madurado, se analizaron por qPCR para la detección de cepas patogénicas de *E. coli*, esto con el fin de asegurar la calidad microbiológica del producto, la cual se ve afectada por las condiciones de higiene en la ordeña, la elaboración del producto y su maduración.

Los experimentos anteriores fueron realizados como estandarización del método de análisis de las 95 unidades de ensayo que fueron recolectadas de productores de la Región de Origen.

Como ejemplo de los resultados obtenidos, las Figuras 10a y 10b, muestran las amplificaciones obtenidas en el análisis de una de las unidades de ensayo de queso Cotija artesanal madurado. Ambas figuras muestran amplificación negativa, similar a la que se obtuvo en las 95 unidades de ensayo, lo que demuestra la

ausencia de ETEC y EHEC en las unidades de ensayo de queso Cotija artesanal madurado. El resto de las imágenes del análisis se muestran en el *Anexo H*.

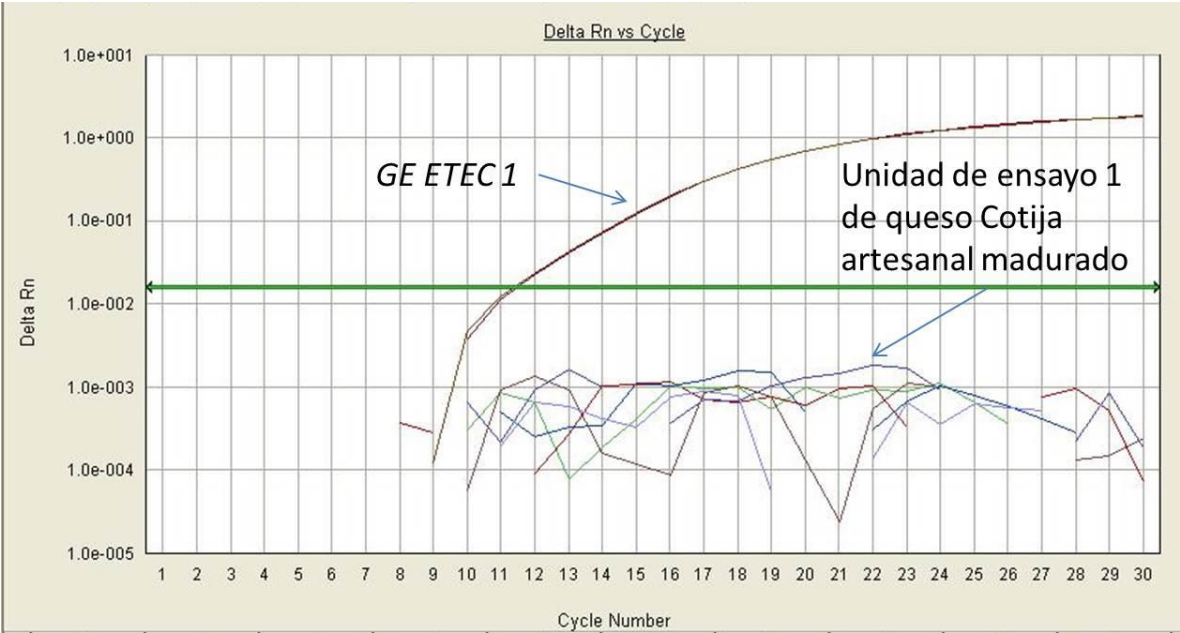


Figura 10a. Gráfica de la amplificación de qPCR de los controles positivos de ETEC y de la unidad de ensayo número 1 del queso Cotija artesanal madurado.

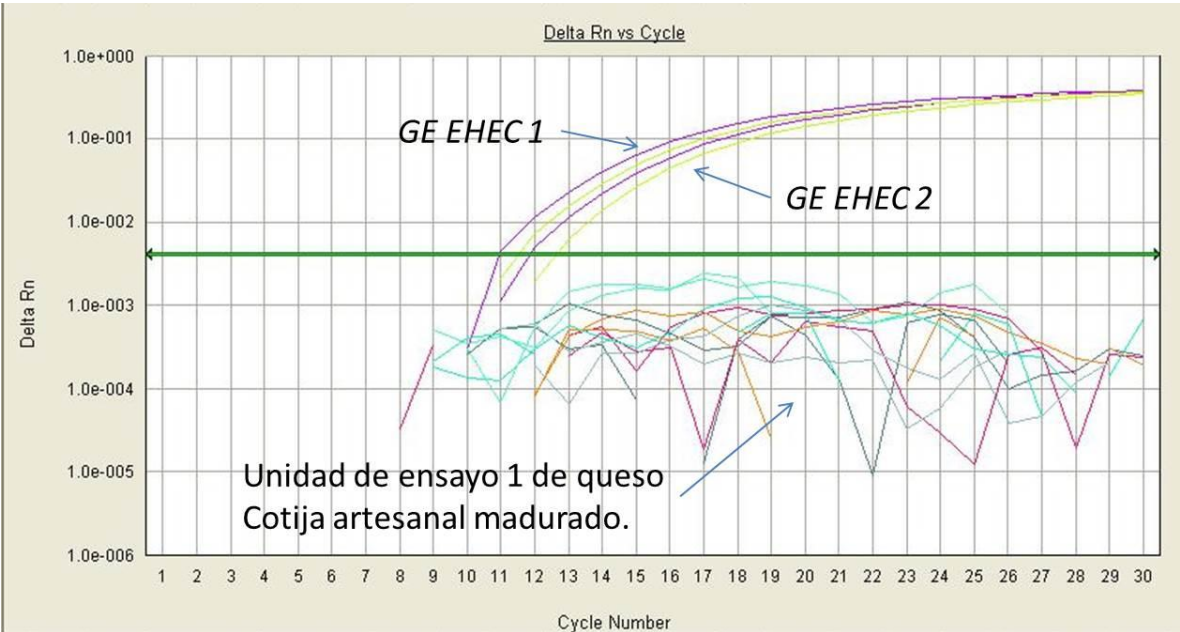


Figura 10b. Gráfica de la amplificación de qPCR de los controles positivos de EHEC y de la unidad de ensayo número 1 del queso Cotija artesanal madurado.

En las Tablas 10a y 10b muestran un resumen de los valores de Ct promedio de las 95 unidades de ensayo.

Tabla 10a. Ciclos umbral promedio y desviación estándar de las 95 unidades de ensayo para los genes específicos de ETEC obtenidos por qPCR

Unidad de ensayo	<i>GE ETEC 1</i>		<i>GE ETEC 2</i>	
	Ct promedio	Desviación estándar	Ct promedio	Desviación estándar
1	NA	--	NA	--
2	NA	--	NA	--
3	—	—	NA	--
4	NA	--	NA	--
5	NA	--	NA	--
6	NA	--	NA	--
7	NA	--	NA	--
8	NA	--	NA	--
9	NA	--	NA	--
10	—	—	NA	--
11	NA	--	NA	--
12	NA	--	NA	--
13	NA	--	NA	--
14	—	—	NA	--
15	NA	--	NA	--
16	NA	--	NA	--
17	—	—	NA	--
18	—	—	NA	--
19	NA	--	NA	--
20	NA	--	NA	--
21	—	—	NA	--
22	—	—	NA	--
23	NA	--	NA	--
24	NA	--	NA	--
25	NA	--	NA	--
26	NA	--	NA	--
27	NA	--	NA	--
28	—	—	NA	--
29	NA	--	NA	--
30	NA	--	NA	--
31	—	—	NA	--

Unidad de ensayo	GE ETEC 1		GE ETEC 2	
	Ct promedio	Desviación estándar	Ct promedio	Desviación estándar
32	—	—	NA	--
33	—	—	NA	--
34	NA	--	NA	--
35	NA	--	NA	--
36	NA	--	NA	--
37	NA	--	NA	--
38	NA	--	NA	--
39	NA	--	NA	--
40	—	—	NA	--
41	NA	--	NA	--
42	—	—	NA	--
43	—	—	NA	--
44	—	—	NA	--
45	—	—	NA	--
46	—	—	NA	--
47	—	—	NA	--
48	NA	--	NA	--
49	—	—	NA	--
50	—	—	NA	--
51	NA	--	NA	--
52	NA	--	NA	--
53	NA	--	NA	--
54	NA	--	NA	--
55	NA	--	NA	--
56	NA	--	NA	--
57	NA	--	NA	--
58	NA	--	NA	--
59	NA	--	NA	--
60	NA	--	NA	--
61	NA	--	NA	--
62	NA	--	NA	--
63	NA	--	NA	--
64	NA	--	NA	--
65	NA	--	NA	--
66	NA	--	NA	--
67	NA	--	NA	--
68	NA	--	NA	--
69	NA	--	NA	--
70	NA	--	NA	--

Unidad de ensayo	<i>GE ETEC 1</i>		<i>GE ETEC 2</i>	
	Ct promedio	Desviación estándar	Ct promedio	Desviación estándar
71	NA	--	NA	--
72	NA	--	NA	--
73	NA	--	NA	--
74	NA	--	NA	--
75	NA	--	NA	--
76	NA	--	NA	--
77	NA	--	NA	--
78	NA	--	NA	--
79	NA	--	NA	--
80	NA	--	NA	--
81	NA	--	NA	--
82	NA	--	NA	--
83	NA	--	NA	--
84	NA	--	NA	--
85	NA	--	NA	--
86	NA	--	NA	--
87	NA	--	NA	--
88	NA	--	NA	--
89	NA	--	NA	--
90	NA	--	NA	--
91	NA	--	NA	--
92	NA	--	NA	--
93	NA	--	NA	--
94	NA	--	NA	--
95	NA	--	NA	--

NA – No hubo amplificación.

-- - Resultado negativo, el Ct promedio > 32.5

Tabla 10b. Ciclos umbral promedio y desviación estándar de las 95 unidades de ensayo para el par de genes específicos de EHEC obtenidos por qPCR

Unidad de ensayo	<i>GE EHEC 1</i>		<i>GE EHEC 2</i>	
	Ct promedio	Desviación estándar	Ct promedio	Desviación estándar
1	—	—	NA	--
2	NA	--	—	—
3	—	—	NA	--
4	—	—	—	—
5	NA	--	—	—
6	—	—	NA	--

Unidad de ensayo	GE EHEC 1		GE EHEC 2	
	Ct promedio	Desviación estándar	Ct promedio	Desviación estándar
7	NA	--	NA	--
8	—	—	NA	--
9	NA	--	—	—
10	—	—	NA	--
11	—	—	—	—
12	—	—	—	—
13	—	—	—	—
14	—	—	—	—
15	—	—	—	—
16	—	—	—	—
17	—	—	—	—
18	—	—	—	—
19	—	—	—	—
20	—	—	—	—
21	—	—	NA	--
22	—	—	—	—
23	—	—	—	—
24	—	—	NA	--
25	—	—	NA	--
26	—	—	NA	--
27	—	—	NA	--
28	—	—	—	—
29	NA	--	—	—
30	—	—	—	—
31	—	—	NA	--
32	NA	--	—	—
33	—	—	—	—
34	—	—	NA	--
35	—	—	—	—
36	—	—	NA	--
37	—	—	—	—
38	—	—	—	—
39	—	—	NA	--
40	—	—	—	—
41	NA	--	NA	--
42	NA	--	—	—
43	—	—	—	—
44	—	—	NA	--
45	—	—	—	—

Unidad de ensayo	GE EHEC 1		GE EHEC 2	
	Ct promedio	Desviación estándar	Ct promedio	Desviación estándar
46	—	—	NA	--
47	NA	--	NA	--
48	NA	--	—	—
49	—	—	—	—
50	NA	--	NA	--
51	—	—	—	—
52	—	—	—	—
53	—	—	—	—
54	—	—	—	—
55	—	—	—	—
56	—	—	—	—
57	—	—	—	—
58	—	—	—	—
59	—	—	—	—
60	—	—	—	—
61	—	—	—	—
62	—	—	NA	--
63	—	—	—	—
64	NA	--	NA	--
65	NA	--	NA	--
66	—	—	NA	--
67	NA	--	NA	--
68	NA	--	—	—
69	—	—	—	—
70	NA	--	NA	--
71	NA	--	NA	--
72	NA	--	NA	--
73	NA	--	NA	--
74	NA	--	NA	--
75	NA	--	NA	--
76	NA	--	NA	--
77	NA	--	NA	--
78	NA	--	NA	--
79	NA	--	NA	--
80	NA	--	NA	--
81	NA	--	NA	--
82	NA	--	NA	--
83	NA	--	NA	--
84	NA	--	NA	--

Unidad de ensayo	GE EHEC 1		GE EHEC 2	
	Ct promedio	Desviación estándar	Ct promedio	Desviación estándar
86	NA	--	NA	--
87	NA	--	NA	--
88	NA	--	NA	--
89	NA	--	NA	--
90	NA	--	NA	--
91	NA	--	NA	--
92	NA	--	NA	--
93	NA	--	NA	--
94	NA	--	NA	--
95	NA	--	NA	--

NA – No hubo amplificación.

-- - Resultado negativo, el Ct promedio > 27.0

Además del análisis por qPCR de las 95 unidades de ensayo de queso Cotija artesanal madurado, se llevó a cabo un análisis de unidades de ensayo al azar mediante métodos rápidos, estas unidades de ensayo se creían sospechosas de estar contaminadas de acuerdo a los resultados de otro laboratorio participante en el proyecto global y a los valores de Ct obtenidos en nuestro laboratorio; de las 95 unidades de ensayo se eligieron 9 al azar y se analizaron por medio de placas Petrifilm® de la marca 3M.

Las placas utilizadas fueron las llamadas de Alta Sensibilidad para Coliformes, arrojando como resultado que las cuentas de coliformes totales y *E. coli* en las unidades de ensayo analizadas fueron de <10UFC/g, concordando con los resultados obtenidos por el método molecular (qPCR) utilizado en este proyecto y confirmando la calidad microbiológica del queso Cotija artesanal madurado.

La Tabla 11 muestra un resumen de los resultados obtenidos tanto por qPCR como por las Placas Petrifilm®.

Tabla 11. Análisis de las unidades de ensayo de queso Cotija artesanal madurado por qPCR y Placas Petrifilm de Alta Sensibilidad para Coliformes.

Unidad de ensayo	qPCR <i>E. coli</i> enterotoxigénica	qPCR <i>E. coli</i> O157	Petrifilm Alta sensibilidad a coliformes
QC-1	Negativo	Negativo	
QC-2	Negativo	Negativo	
QC-3	Negativo	Negativo	
QC-4	Negativo	Negativo	
QC-5	Negativo	Negativo	
QC-6	Negativo	Negativo	
QC-7	Negativo	Negativo	
QC-8	Negativo	Negativo	
QC-9	Negativo	Negativo	
QC-10	Negativo	Negativo	
QC-11	Negativo	Negativo	
QC-12	Negativo	Negativo	
QC-13	Negativo	Negativo	
QC-14	Negativo	Negativo	
QC-15	Negativo	Negativo	
QC-16	Negativo	Negativo	
QC-17	Negativo	Negativo	<10UFC/g
QC-18	Negativo	Negativo	
QC-19	Negativo	Negativo	
QC-20	Negativo	Negativo	
QC-21	Negativo	Negativo	
QC-22	Negativo	Negativo	
QC-23	Negativo	Negativo	
QC-24	Negativo	Negativo	
QC-25	Negativo	Negativo	
QC-26	Negativo	Negativo	
QC-27	Negativo	Negativo	
QC-28	Negativo	Negativo	
QC-29	Negativo	Negativo	
QC-30	Negativo	Negativo	
QC-31	Negativo	Negativo	
QC-32	Negativo	Negativo	
QC-33	Negativo	Negativo	
QC-34	Negativo	Negativo	
QC-35	Negativo	Negativo	
QC-36	Negativo	Negativo	
QC-37	Negativo	Negativo	

Unidad de ensayo	qPCR <i>E. coli</i> enterotoxigénica	qPCR <i>E. coli</i> O157	Petrifilm Alta sensibilidad a coliformes
QC-38	Negativo	Negativo	
QC-39	Negativo	Negativo	
QC-40	Negativo	Negativo	
QC-41	Negativo	Negativo	
QC-42	Negativo	Negativo	
QC-43	Negativo	Negativo	
QC-44	Negativo	Negativo	
QC-45	Negativo	Negativo	
QC-46	Negativo	Negativo	
QC-47	Negativo	Negativo	
QC-48	Negativo	Negativo	
QC-49	Negativo	Negativo	
QC-50	Negativo	Negativo	
QC-51	Negativo	Negativo	
QC-52	Negativo	Negativo	
QC-53	Negativo	Negativo	
QC-54	Negativo	Negativo	
QC-55	Negativo	Negativo	<10UFC/g
QC-56	Negativo	Negativo	<10UFC/g
QC-57	Negativo	Negativo	
QC-58	Negativo	Negativo	
QC-59	Negativo	Negativo	
QC-60	Negativo	Negativo	
QC-61	Negativo	Negativo	
QC-62	Negativo	Negativo	
QC-63	Negativo	Negativo	
QC-64	Negativo	Negativo	<10UFC/g
QC-65	Negativo	Negativo	
QC-66	Negativo	Negativo	
QC-67	Negativo	Negativo	
QC-68	Negativo	Negativo	
QC-69	Negativo	Negativo	
QC-70	Negativo	Negativo	
QC-71	Negativo	Negativo	
QC-72	Negativo	Negativo	
QC-73	Negativo	Negativo	
QC-74	Negativo	Negativo	<10UFC/g
QC-75	Negativo	Negativo	
QC-76	Negativo	Negativo	

Unidad de ensayo	qPCR <i>E. coli</i> enterotoxigénica	qPCR <i>E. coli</i> O157	Petrifilm Alta sensibilidad a coliformes
QC-77	Negativo	Negativo	
QC-78	Negativo	Negativo	
QC-79	Negativo	Negativo	
QC-80	Negativo	Negativo	
QC-81	Negativo	Negativo	
QC-82	Negativo	Negativo	
QC-83	Negativo	Negativo	
QC-84	Negativo	Negativo	
QC-85	Negativo	Negativo	
QC-86	Negativo	Negativo	<10UFC/g
QC-87	Negativo	Negativo	<10UFC/g
QC-88	Negativo	Negativo	
QC-89	Negativo	Negativo	
QC-90	Negativo	Negativo	
QC-91	Negativo	Negativo	
QC-92	Negativo	Negativo	<10UFC/g
QC-93	Negativo	Negativo	
QC-94	Negativo	Negativo	
QC-95	Negativo	Negativo	<10UFC/g

Los resultados obtenidos tanto en el análisis por qPCR como por los métodos rápidos de las Placas Petrifilm®, demuestran la higiene con el que los productores del queso Cotija artesanal madurado llevan a cabo el proceso de elaboración del mismo, además de que en la etapa de maduración se disminuye el a_w , aumenta la acidez y se pierde humedad, dando así un ambiente no propicio para el desarrollo de ETEC o de EHEC, ayudando así a que este producto tenga una buena inocuidad.

En un queso madurado en el laboratorio, se demostró que después de 80 días de maduración, la cuenta de coliformes totales (por número más probable)

fue de menos de 3 UFC/g de queso, con lo que se confirma lo anteriormente expuesto (Bravo, 2008).

7. Conclusiones.

- El método de extracción de ADN permite su obtención con una calidad amplificable y de pureza adecuada, ya que la matriz, en especial la grasa del alimento, no tuvo un efecto negativo en la detección de ETEC y EHEC.
- Las sondas y cebadores son específicos para la detección por reacción dúplex de ETEC y EHEC mediante la técnica de PCR en tiempo real ya que no hubo amplificación positiva tanto con otros microorganismos patógenos como con no patógenos.
- No se detectó *E. coli* ETEC o EHEC en las 95 unidades de ensayo de queso Cotija artesanal madurado, asegurando así su inocuidad con respecto a este microorganismo patógeno.

Bibliografía.

Álvarez-Barajas, R. *et al.*, 2005, *Reglas de uso Marca colectiva Queso Cotija Región de Origen.*, Asociación Regional de Productores de Queso Cotija, S.P.R.

Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., Valdezate, S., 2011, Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), pp. 601-608.

Bravo A., 2008, *Estudio de las poblaciones microbianas de interés biotecnológico aisladas de queso Cotija*, Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, México, D.F.

Deng, M. Y., Cliver, D. O., Day, S. P., Fratamico, P. M., 1996, Enterotoxigenic *Escherichia coli* detected in foods by PCR and enzyme-linked oligonucleotide probe, *International Journal of Food Microbiology*, 30(3), pp. 217-229.

Dos Santos, A., 2007, *Estudio del Comportamiento Cinético de Microorganismos de Interés en Seguridad Alimentaria con Modelos Matemáticos*, Memorias para optar por el título de Doctor en Veterinaria, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, [En línea] Disponible en: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5691/ajse1de1.pdf;jsessionid=EFFF37B3B1226106B46D984E3B064DD1.tdx2?sequence=1> [Último acceso el 18 de julio de 2013].

Dubreuil, J. D., 1997, *Escherichia coli* STb enterotoxin, *Microbiology*, 143, pp. 1783-1795.

Erume, J., Berberov, E.M., Moxley, R.A., 2010, Comparison of the effects of different nutrient media on production of heat-stable enterotoxin-b by *Escherichia coli*, *Veterinary Microbiology*, 144, pp. 160-165

Estrada, C., 2009, *Análisis microbiológico de queso Cotija. Identificación de microorganismos patógenos mediante técnica de PCR punto final*, Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, México, D.F.

EFSA – European Food Safety Authority, 2009, Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food (VTEC surveys on animals and food), *EFSA Journal*, 7(11), pp. 38–39.

García, V., 2011, *Detección de microorganismos lipolíticos durante las etapas de un queso artesanal, mediante técnicas moleculares*. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Ciudad de México.

Garzón, A., Gómez, J., 2007, *Evaluación de la cinética de crecimiento para Escherichia coli ATCC 25922 y estandarización de un método alternativo de preservación a corto plazo empleando buffer fosfatos*, Trabajo de grado para

Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá D.C. [En línea] Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis133.pdf> [Último acceso el 15 de julio de 2013].

Hernández, I., 2012, *Detección de Salmonella spp. en queso Cotija artesanal madurado por PCR en Tiempo Real*, Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, México, D.F.

Hernández, V., 2007, *Queso Cotija: Estudio del análisis fisicoquímico, proximal y actividad antioxidante*. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Ciudad de México.

Life Technologies Corporation, 2012, *Real-time PCR handbook*, Estados Unidos.

Madic, J., Peytavin de Garam, C., Brugère, H., Loukiadis, E., Fach, P., Jamet, E., Auvray, F., 2011, Duplex real-time PCR detection of type III effector *tccP* and *tccP2* genes in pathogenic *Escherichia coli* and prevalence in raw milk cheese, *Letter in Applied Microbiology*, 52, pp. 538-545.

Madic, J., Vingadassalon, N., Peytavin de Garam, C., Marault, M., Scheutz, F., Brugère, H., Jamet, E., Auvray, F., 2011, Detection of Shiga toxin-producing

Escherichia coli serotypes O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 and O157:H7 in raw milk cheeses by using multiplex real-time PCR, *Applied and Environmental Microbiology*, 77(6), pp. 2035-2041.

Maurer, J., 2006, *PCR Methods in Foods*, New York: Springer Science Business Media, Inc.

Meng, J., Doyle, M., Zhao, T., Zhao, S., 2001, *Enterohemorrhagic Escherichia coli* **En:** Doyle, M., Beuchat, L., Montville, T., eds., *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*, Washington, D.C., ASM Press, 2da ed., Capítulo 10.

Miguel, O., 2006, *Enterobacterias II. Escherichia y Shigella*, **En:** Basualdo, J., Coto, C., Torres, R., eds. *Microbiología Biomédica*, Buenos Aires: Atlante Argentina S.R.L., 2da ed., Capítulo 26.

Møller, E., Thorup, M., 2003, Detection and characterization of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay, *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7), pp. 2884-2893

Nada, R. A., Shaheen H. I., Touni I., Fahmy D., Armstrong A. W., Weiner, M., Klena, J., 2010, Design and validation of a multiplex polymerase chain reaction for the identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* and associated colonization factor antigens, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 67, pp. 134–142.

NMX-F-730-COFOCALEC-2008. Sistema Producto Leche – Alimentos – Lácteos – Prácticas de higiene recomendadas para la obtención de leche.

NMX-F-735-COFOCALEC-2011. Sistema Producto Leche – Alimentos – Lácteos – Alimento Regional – Queso Cotija Artesanal Madurado – Denominación, Especificaciones y Métodos de Prueba.

NOM-110-SSA1-1994 Norma Oficial Mexicana. Bienes y Servicios. Preparación y dilución de unidades de ensayo para su análisis microbiológico.

NOM-121-SSA1-1994 Norma Oficial Mexicana. Bienes y Servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones Sanitarias.

OMS – Organización Mundial de la Salud, 2011, *Enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC) Nota descriptiva No. 125*. [En línea] (Actualizado a Diciembre de 2011). Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/> [Último acceso el 09 de julio de 2013].

OPS – Organización Panamericana de la Salud, 2011, *Alerta epidemiológica: Síndrome hemolítico urémico (SHU) e infección por E. coli enterohemorrágica (EHEC)*. [En línea] (Actualizado a Junio de 2011). Disponible en: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5555%3A-epidemiological-alert%3A-haemolytic-uraemic-syndrome-hus-and-infection-by-

[enterohaemorrhagic-e.-coli-ehec-published-on-7-june-2011&catid=2103%3A--hsd0104d-most-recent-ea&lang=es](#) [Último acceso el 21 de julio de 2013].

Patel, C.B., Vajpayee P., Singh G., Upadhyay R.S., Shanker R., 2011, Contamination of potable water by enterotoxigenic *Escherichia coli*: qPCR based culture-free detection and quantification, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, pp. 2292–2298.

Peña, C., 2009, *Análisis de la expresión y caracterización de la esterasa StcI involucrada en la biosíntesis de esterigmatocistina en Aspergillus nidulans*, Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, México, D.F.

Poméon, T., 2007, *El queso Cotija. Un producto con marca colectiva queso “Cotija Región de origen”, en proceso de adquisición de una Denominación de Origen* CIESTAAM, Universidad Autónoma Chapingo, 6,12, pp. 60-63.

Rodríguez, G., 2002, Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*: Revisión, *Salud Pública de México*, 44(5), pp. 464–475.

Anexos.

Anexo A. Composición de medios de cultivo y soluciones utilizados.

A1. Caldo BHI + 2% casaminoácidos

Sustrato alimenticio (extracto de cerebro, extracto de corazón y peptona)	27.5 g
Casaminoácidos	20.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato ácido de sodio	2.5 g
D (+)-glucosa	
2.0 g	
Agua destilada	1.0 L

A2. Agar BHI

Sustrato alimenticio (extracto de cerebro, extracto de corazón y peptona)	27.5 g
Agar	15.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato ácido de sodio	2.5 g
D (+)-glucosa	
2.0 g	
Agua destilada	1.0 L

A3. Agua Peptonada

Peptona	1.0 g
---------	-------

Cloruro de sodio	0.85 g
------------------	--------

Agua destilada	1.0 L
----------------	-------

A4. Solución Salina

Cloruro de Sodio	8.5 g
------------------	-------

Agua destilada, desionizada, filtrada y estéril (DDFE)	1.0 L
--	-------

A5. Alcohol etílico 75% (Extracción de ADN).

Alcohol Etílico del 100%	750 mL
--------------------------	--------

Agua DDFE	250 mL
-----------	--------

Anexo B. Concentración y condiciones de reacción para PCR punto final.

B1. Concentración de reactivos para la reacción de PCR punto final.

Reactivo	[]Inicial	[]Final	Vol. p/1 reacción (µL)
Agua Grado Biología Molecular	---	---	28.5
Buffer	10X	1X	5.0
dNTP	10 mM	300 nM	1.0
Pfu	25 U	300 nM	0.5
Cebador D	10 µM	300 nM	2.5
Cebador R	10 µM	300 nM	2.5
ADN	10 ng/mL	100 ng	10.0
Volumen total de reacción			50

B2. Condiciones de reacción del PCR punto final.

Tapa calentada a:	110 °C
Pre calentamiento de tapa:	Activado

Desnaturalización inicial	94.0 °C	5 m 00 s
Calentamiento inicial	Desactivado	

Loop 1			
Ciclos	20		
Desnaturalización	94.0 °C	1 min 00 s	Máx.
Acoplamiento	65.0 °C	1 min 00 s	Máx.
Extensión	72.0 °C	3 min 00 s	Máx.

Loop 2			
Ciclos	10		
Desnaturalización	94.0 °C	1 min 00 s	Máx.
Acoplamiento	55.0 °C	1 min 00 s	Máx.
Extensión	72.0 °C	3 min 00 s	Máx.

Extensión final	72 °C	10 min 00 s
Temperatura de conservación final	4 °C	Indefinido

Anexo C. Concentración de reactivos y condiciones de reacción para qPCR.

C1. Concentración de los reactivos para las reacciones de qPCR para la reacción dúplex de los *GE ETEC 1* y *GE ETEC 2* para *E. coli* enterotoxigénica.

Reactivo	[] _{Inicial}	[] _{Stock}	[] _{Final}	Vol. p/1 reacción (µL)
Agua Grado Biología Molecular	---	---	---	3.66
Master mix	2X	2X	1X	10
Stock <i>GE ETEC 1</i> (Cebadores + Sonda)	120X	20X	1X	0.5
Cebador F <i>GE ETEC 2</i>	100µM	10µM	130nM	0.26
Cebador R <i>GE ETEC 2</i>	100µM	10µM	130nM	0.26
Sonda VIC	100µM	5µM	80nM	0.32
ADN		10ng/µL	50ng	5.0
Volumen total de reacción				20

C2. Concentración de los reactivos para las reacciones de qPCR para la reacción dúplex de los *GE EHEC 1* y *GE EHEC 2* para *E. coli* enterohemorrágica.

Reactivo	[] _{Inicial}	[] _{Stock}	[] _{Final}	Vol. p/1 reacción (µL)
Agua Grado Biología Molecular	---	---	---	3.32
Master mix	2X	2X	1X	10
Cebador F <i>GE EHEC 1</i>	100 µM	10 µM	130 nM	0.26
Cebador R <i>GE EHEC 1</i>	100 µM	10 µM	130 nM	0.26
Cebador F <i>GE EHEC 2</i>	100 µM	10 µM	130 nM	0.26
Cebador R <i>GE EHEC 2</i>	100 µM	10 µM	130 nM	0.26
Sonda VIC	100 µM	5 µM	80 nM	0.32
Sonda FAM	100 µM	5 µM	80 nM	0.32
ADN		10 ng/µL	50 ng	5.0
Volumen total de reacción				20

C3. Condiciones de la reacción de qPCR.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Repeticiones
1	50	2 minutos	1
2	95	10 minutos	1
3 (paso 1)	95	15 segundos	40
3 (paso 2)	62	1 segundo	

Anexo D. a_w de las unidades de ensayo de queso Cotija artesanal madurado.

D1. a_w promedio y desviación estándar de las unidades de ensayo de queso Cotija artesanal madurado.

Unidad de ensayo	Promedio a_w	Desviación Estándar
QC-1	0.890	0.0064
QC-2	0.883	0.0063
QC-3	0.890	0.0028
QC-4	0.858	0.0311
QC-5	0.854	0.0007
QC-6	0.877	0.0035
QC-7	0.889	0.0007
QC-8	0.892	0.0007
QC-9	0.891	0.0064
QC-10	0.870	0.0035
QC-11	0.860	0.0021
QC-12	0.867	0.0007
QC-13	0.857	0.0028
QC-14	0.885	0.0049
QC-15	0.890	0.0007
QC-16	0.892	0.0021
QC-17	0.899	0.0057
QC-18	0.888	0.0021
QC-19	0.889	0.0057
QC-20	0.869	0.0028
QC-21	0.870	0.0021
QC-22	0.877	0.0007
QC-23	0.864	0.0057
QC-24	0.890	0.0049
QC-25	0.852	0.0163
QC-26	0.894	0.0007
QC-27	0.883	0.0000
QC-28	0.872	0.0028
QC-29	0.897	0.0035
QC-30	0.904	0.0049
QC-31	0.869	0.0014
QC-32	0.910	0.0042
QC-33	0.865	0.0000
QC-34	0.890	0.0057
QC-35	0.905	0.0028

Unidad de ensayo	Promedio a_w	Desviación Estándar
QC-36	0.919	0.0297
QC-37	0.912	0.0057
QC-38	0.865	0.0064
QC-39	0.904	0.0021
QC-40	0.899	0.0021
QC-41	0.885	0.0071
QC-42	0.909	0.0014
QC-43	0.830	0.0014
QC-44	0.832	0.0049
QC-45	0.881	0.0028
QC-46	0.887	0.0085
QC-47	0.884	0.0014
QC-48	0.874	0.0028
QC-49	0.859	0.0014
QC-50	0.833	0.0000
QC-51	0.847	0.0021
QC-52	0.876	0.0014
QC-53	0.846	0.0000
QC-54	0.893	0.0014
QC-55	0.864	0.0085
QC-56	0.844	0.0028
QC-57	0.831	0.0000
QC-58	0.884	0.0049
QC-59	0.877	0.0028
QC-60	0.875	0.0007
QC-61	0.782	0.0092
QC-62	0.894	0.0014
QC-63	0.894	0.0057
QC-64	0.889	0.0000
QC-65	0.880	0.0042
QC-66	0.879	0.0014
QC-67	0.893	0.0000
QC-68	0.873	0.0035
QC-69	0.896	0.0007
QC-70	0.868	0.0007
QC-71	0.866	0.0049
QC-72	0.825	0.0021
QC-73	0.879	0.0007
QC-74	0.812	0.0021
QC-75	0.829	0.0014

Unidad de ensayo	Promedio a_w	Desviación Estándar
QC-76	0.877	0.0007
QC-77	0.887	0.0014
QC-78	0.837	0.0007
QC-79	0.860	0.0014
QC-80	0.889	0.0000
QC-81	0.831	0.0007
QC-82	0.896	0.0035
QC-83	0.905	0.0014
QC-84	0.818	0.0000
QC-85	0.833	0.0071
QC-86	0.854	0.0028
QC-87	0.877	0.0021
QC-88	0.818	0.0007
QC-89	0.880	0.0007
QC-90	0.836	0.0028
QC-91	0.830	0.0007
QC-92	0.793	0.0078
QC-93	0.864	0.0035
QC-94	0.855	0.0021
QC-95	0.852	0.0042

Anexo E. Concentraciones de ADN.

E1. Concentraciones promedio, desviación estándar y relación A_{260}/A_{280} de ADN de queso inoculado-incubado, queso inoculado-no incubado, queso no inoculado y unidades de ensayo de queso Cotija artesanal madurado.

Unidad de ensayo	Concentración de ADN promedio (ng/μL)	Desviación estándar	Relación A_{260}/A_{280} promedio
ETEC inoculado incubado 1	333.384	30.427	2.028
ETEC inoculado incubado 2	352.163	8.567	1.994
ETEC inoculado no incubado 1	38.685	21.761	2.733
ETEC inoculado no incubado 2	16.978	1.398	2.972
ETEC no inoculado 1	12.738	3.866	2.403
ETEC no inoculado 2	19.423	2.890	3.009
EHEC inoculado incubado 1	197.358	22.775	1.983
EHEC inoculado incubado 2	285.413	2.169	1.992
EHEC inoculado no incubado 1	11.006	1.324	2.239
EHEC inoculado no incubado 2	12.628	2.438	4.337
EHEC no inoculado 1	30.966	3.106	2.852
EHEC no inoculado 2	22.304	8.858	2.414
1a	238.280	123.433	1.985
1b	301.000	121.622	1.500
2a	154.483	0.732	1.497
2b	249.500	89.803	1.000
3a	88.500	14.849	1.996
3b	129.500	40.305	1.484
4a	118.077	2.534	2.000
4b	188.045	34.138	1.000
5a	159.682	24.508	1.000
5b	128.000	7.071	2.002
6a	118.413	4.501	1.998

Unidad de ensayo	Concentración de ADN promedio (ng/μL)	Desviación estándar	Relación A₂₆₀/A₂₈₀ promedio
6b	146.049	41.769	1.000
7a	137.307	37.203	2.000
7b	155.660	54.147	2.000
8a	76.700	36.345	2.000
8b	62.500	3.536	2.000
9a	93.775	44.937	1.985
9b	126.716	34.343	1.000
10a	79.115	4.080	2.004
10b	122.000	22.627	2.045
11a	67.800	0.352	2.115
11b	356.527	0.437	1.991
12a	43.792	0.047	2.115
12b	100.632	1.871	2.023
13a	59.894	1.076	2.091
13b	203.867	0.148	2.015
14a	80.578	0.151	2.120
14b	123.599	2.429	1.999
15a	104.089	3.241	1.998
15b	187.765	2.533	1.985
16a	49.722	0.246	2.105
16b	31.379	1.298	2.047
17a	137.319	2.237	2.033
17b	262.957	2.551	1.982
18a	20.463	0.419	2.453
18b	14.741	0.477	2.152
19a	463.141	4.888	1.986
19b	203.186	0.002	2.040
20a	67.903	0.173	1.929
20b	143.262	0.065	1.977
21a	70.883	7.762	2.308
21b	90.079	0.482	2.181
22a	41.964	2.706	2.011
22b	35.624	0.212	1.473
23a	187.443	0.902	2.056
23b	185.968	5.667	1.961
24a	71.048	0.359	2.149
24b	82.971	2.893	2.172
25a	116.219	84.096	2.090
25b	79.554	7.234	2.081

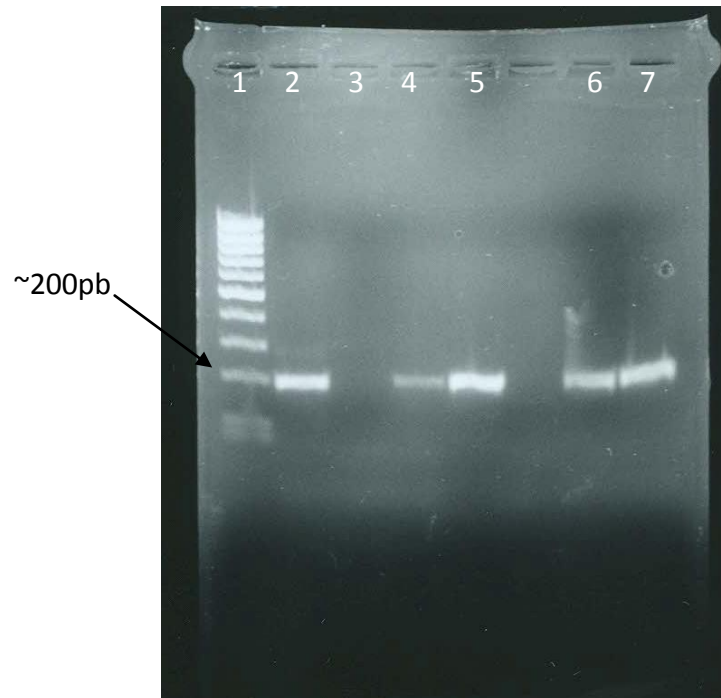
Unidad de ensayo	Concentración de ADN promedio (ng/μL)	Desviación estándar	Relación A₂₆₀/A₂₈₀ promedio
26a	93.018	4.009	2.144
26b	183.564	109.781	1.984
27a	259.111	31.931	2.000
27b	323.398	9.445	2.010
28a	611.082	6.432	1.981
28b	249.356	22.236	1.999
29a	136.205	49.615	2.863
29b	519.653	113.941	1.939
30a	Durante la extracción de ADN se perdió esta unidad de ensayo.		
30b	361.131	14.762	1.977
31a	38.991	0.436	2.112
31b	29.867	1.077	2.296
32a	106.090	1.095	2.047
32b	170.986	0.930	2.011
33a	78.793	0.052	2.105
33b	49.883	1.459	2.121
34a	41.823	0.890	2.114
34b	107.836	2.065	2.017
35a	549.079	1.525	2.016
35b	168.361	2.123	2.021
36a	303.475	0.190	2.068
36b	246.567	0.570	2.061
37a	164.849	0.688	2.022
37b	164.834	2.245	2.052
38a	66.344	0.031	2.072
38b	127.439	0.513	2.052
39a	62.364	0.640	2.049
39b	95.311	2.382	2.024
40a	84.199	0.504	2.041
40b	90.021	2.858	2.034
41a	135.708	1.300	2.106
41b	65.859	0.161	2.081
42a	184.824	0.084	2.071
42b	306.925	0.236	2.024
43a	64.746	1.860	2.110
43b	44.305	0.011	2.206
44a	71.527	0.700	2.091
44b	132.922	1.691	2.099

Unidad de ensayo	Concentración de ADN promedio (ng/μL)	Desviación estándar	Relación A₂₆₀/A₂₈₀ promedio
45a	119.839	2.080	2.035
45b	158.865	1.551	2.057
46a	165.250	1.117	2.083
46b	60.948	1.749	2.107
47a	43.019	1.580	2.144
47b	58.300	1.129	2.112
48a	157.699	3.381	2.100
48b	117.746	1.703	2.104
49a	389.383	7.092	2.010
49b	359.366	3.538	2.002
50a	284.210	1.416	2.081
50b	36.622	0.891	2.338
51a	39.988	0.142	3.617
51b	106.477	0.602	2.048
52a	174.590	0.640	1.999
52b	180.472	1.580	2.008
53a	238.946	2.232	1.997
53b	236.794	2.454	1.990
54a	580.056	1.856	1.979
54b	479.855	3.046	1.986
55a	241.046	2.664	2.028
55b	291.760	0.935	2.045
56a	64.356	0.690	2.068
56b	149.381	2.006	1.992
57a	155.292	1.160	2.006
57b	232.046	0.332	2.042
58a	117.730	2.837	2.052
58b	123.962	1.801	1.998
59a	24.356	0.964	2.941
59b	140.159	1.969	2.019
60a	96.475	3.882	2.053
60b	41.474	2.357	2.106
61a	76.413	3.463	2.022
61b	62.040	4.001	2.016
62a	52.360	0.607	2.115
62b	59.291	3.480	2.044
63a	48.505	0.077	2.040
63b	58.825	1.126	2.031
64a	422.019	0.352	1.994

Unidad de ensayo	Concentración de ADN promedio (ng/μL)	Desviación estándar	Relación A₂₆₀/A₂₈₀ promedio
64b	346.084	2.724	2.019
65a	74.019	0.670	2.023
65b	94.017	2.225	1.989
66a	33.599	1.664	2.078
66b	95.771	2.951	2.007
67a	68.429	0.869	2.047
67b	30.445	1.001	2.074
68a	45.841	0.485	2.072
68b	37.410	1.573	2.376
69a	49.711	0.439	2.019
69b	163.473	1.321	1.917
70a	91.626	0.401	2.028
70b	120.121	1.451	1.990
71a	196.841	0.256	1.975
71b	194.598	2.355	1.968
72a	141.518	1.439	1.994
72b	102.882	3.466	2.030
73a	120.893	0.378	2.038
73b	152.942	1.057	2.019
74a	148.145	1.270	1.993
74b	180.633	1.413	2.054
75a	223.952	0.081	2.000
75b	301.781	2.696	1.977
76a	248.396	1.824	1.984
76b	248.406	1.883	1.967
77a	237.401	0.579	1.980
77b	68.556	0.265	2.016
78a	120.275	3.606	2.000
78b	90.766	0.290	2.029
79a	134.434	1.214	1.990
79b	103.017	4.636	1.938
80a	454.190	1.098	2.029
80b	334.857	0.575	2.020
81a	90.265	0.288	2.008
81b	23.767	0.018	2.098
82a	96.900	2.073	2.035
82b	75.030	0.152	2.017
83a	97.920	0.987	2.003
83b	68.814	2.937	2.067

Unidad de ensayo	Concentración de ADN promedio (ng/μL)	Desviación estándar	Relación A₂₆₀/A₂₈₀ promedio
84a	227.266	1.135	1.976
84b	225.652	3.248	1.989
85a	55.422	3.834	2.066
85b	49.502	0.069	2.059
86a	39.113	0.232	2.045
86b	22.193	0.244	2.075
87a	33.386	0.119	1.998
87b	32.172	0.647	2.292
88a	40.509	1.860	2.150
88b	62.888	0.011	2.207
89a	92.584	1.334	2.011
89b	102.780	0.498	2.067
90a	77.951	0.945	2.051
90b	72.149	1.030	2.037
91a	105.792	1.182	1.954
91b	48.299	2.481	2.068
92a	61.611	1.165	2.078
92b	63.325	1.334	2.049
93a	35.643	0.483	2.102
93b	32.386	3.168	2.124
94a	43.716	1.121	2.023
94b	42.994	0.680	2.095
95a	56.775	0.813	2.046
95b	92.340	0.226	2.030

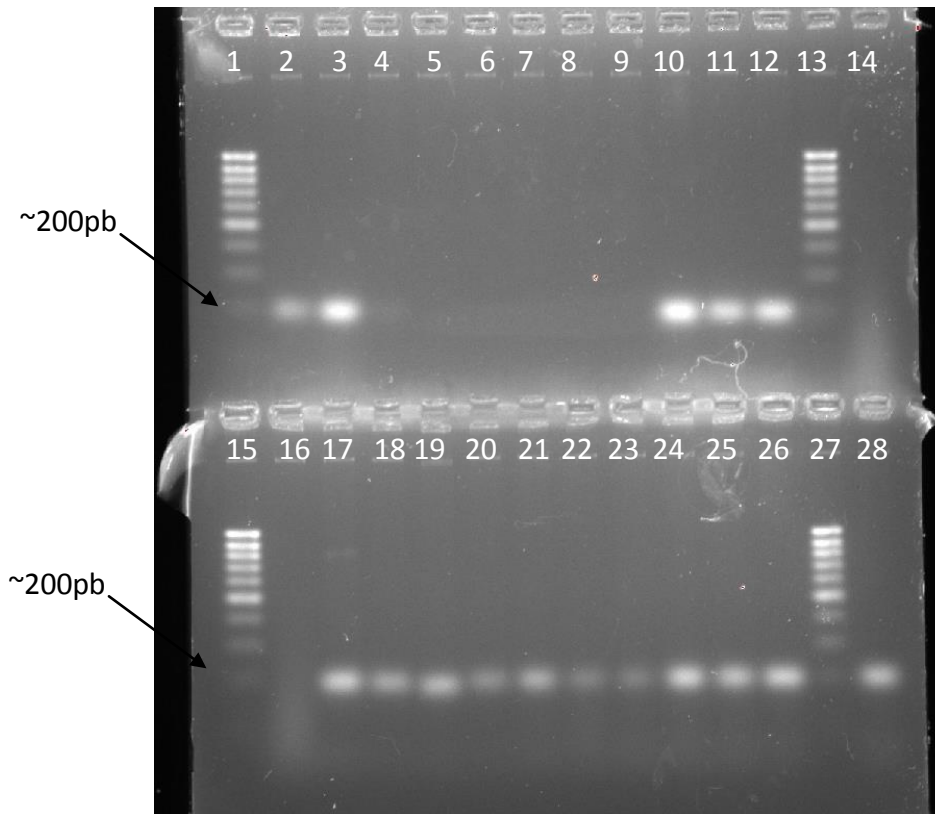
Anexo F. Amplificación de la región V3 del gen ribosomal 16S en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio.



F1. Amplificación de la región V3 del gen ribosomal 16S en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio, unidades de ensayo 1-10.

Carriles:

- 1:** MassRuler Low Range DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Scientific).
- 2:** ADN de cepa pura ETEC, control positivo.
- 3:** Control negativo (NTC).
- 4 a 7:** Amplicones obtenidos del ADN de las unidades de ensayo 1, 2, 5 y 7, respectivamente.



F2. Amplificación de la región V3 del gen ribosomal 16S en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio, unidades de ensayo 20-95.

Carriles:

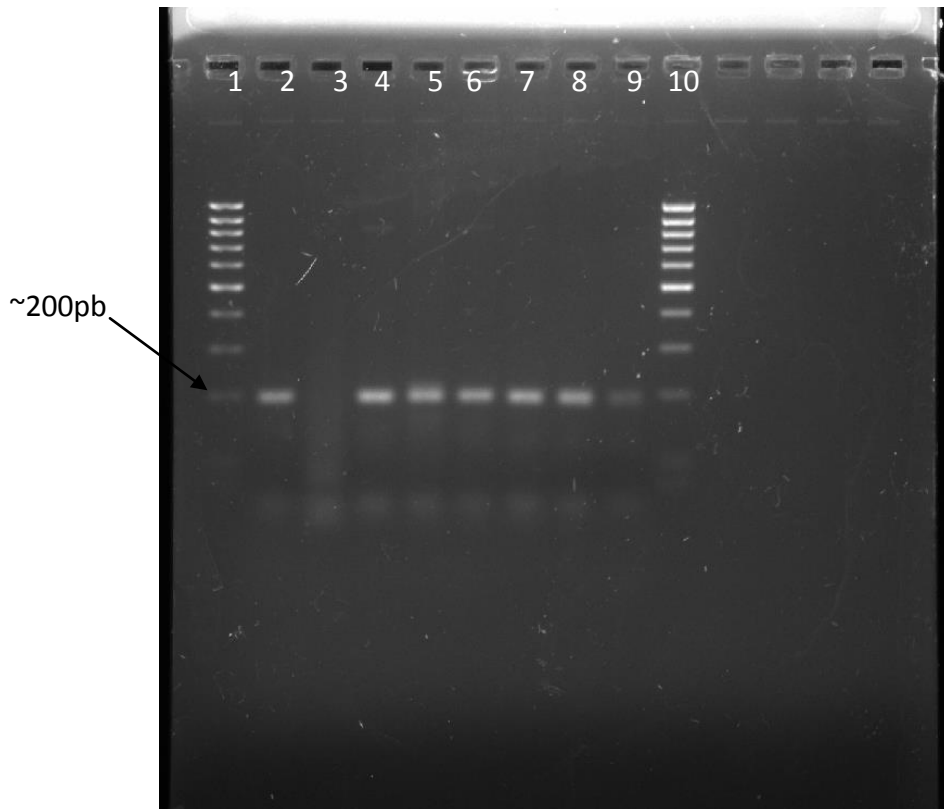
1, 13, 15, 27: MassRuler Low Range DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Scientific).

2 y 28: ADN de cepa pura EHEC, control positivo.

14 y 16: Control negativo (NTC).

3 a 12: Amplicones obtenidos del ADN de las unidades de ensayo, H21a, T28b, 34b, 35a, 37a, 42a, 47b, 50a, 51b, 60b respectivamente.

17 a 26: Amplicones obtenidos del ADN de las unidades de ensayo, 64a, 67b, 70b, 73a, 79b, 82b, 83a, 87b, 93a, 95a respectivamente.

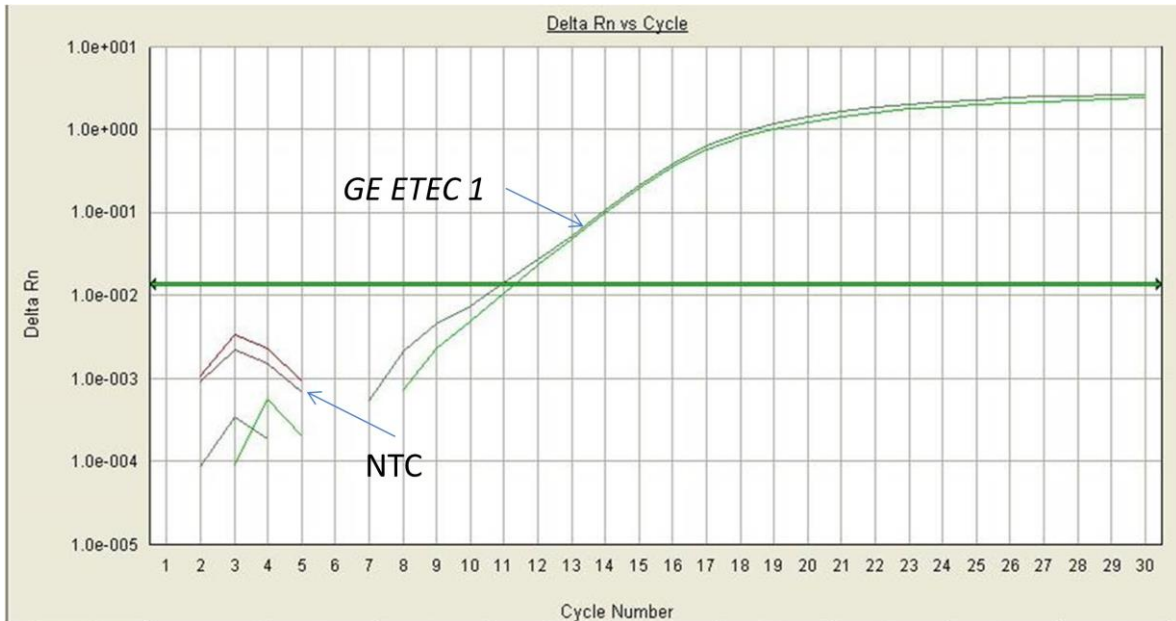


F3. Amplificación de la región V3 del gen ribosomal 16S en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio, repetición.

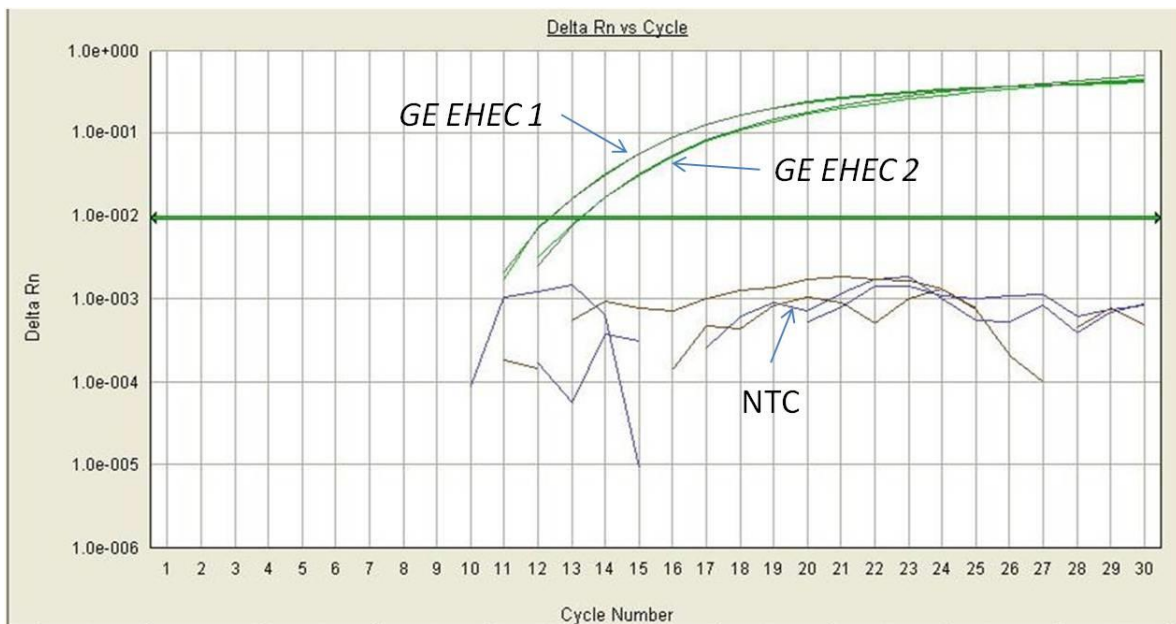
Carriles:

- 1 y 10:** MassRuler Low Range DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Scientific).
- 2:** ADN de cepa pura EHEC, control positivo.
- 3:** Control negativo (NTC).
- 4 a 9:** Amplicones obtenidos del ADN de las unidades de ensayo, T28a, 34b, 35a, 37a, 42a, 47b respectivamente.

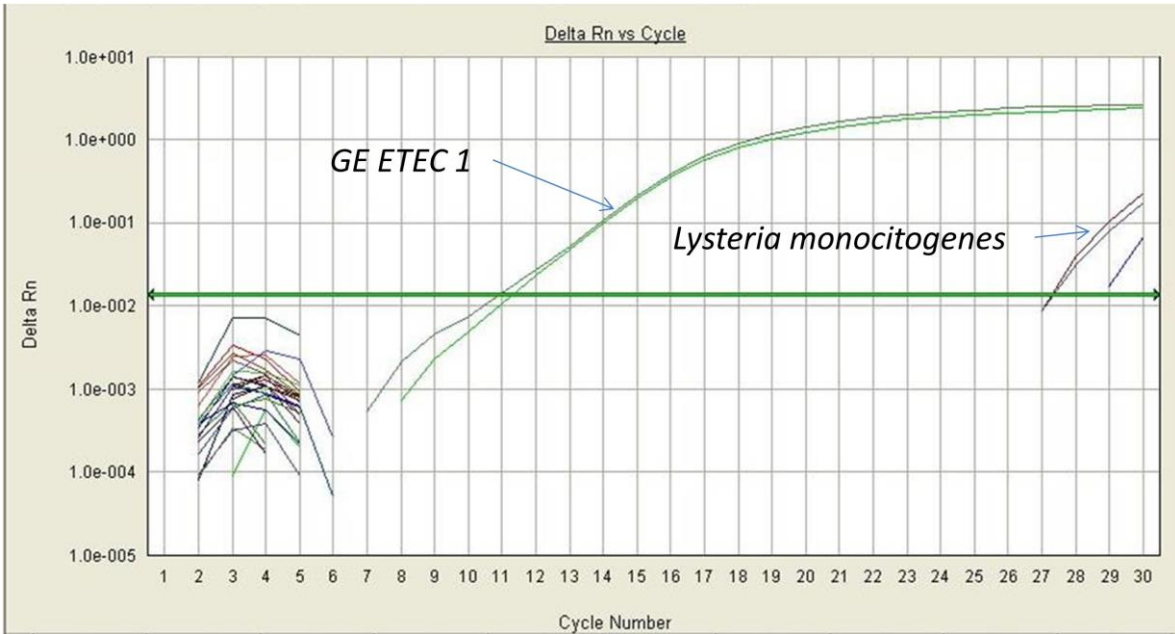
Anexo G. Gráficas de amplificación por qPCR de los controles positivos y negativos utilizados para ETEC y EHEC.



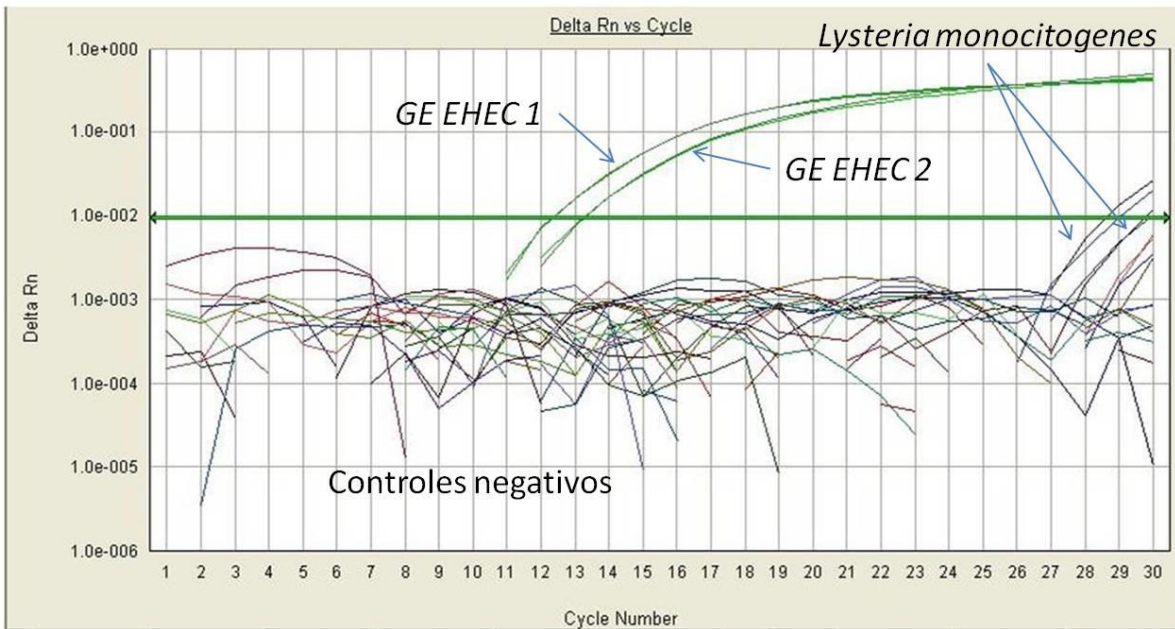
G1. Gráfica de amplificación por qPCR de *GE ETEC 1* y *GE ETEC 2* de ETEC.



G2. Gráfica de amplificación por qPCR de *GE EHEC 1* y *GE EHEC 2* de EHEC.

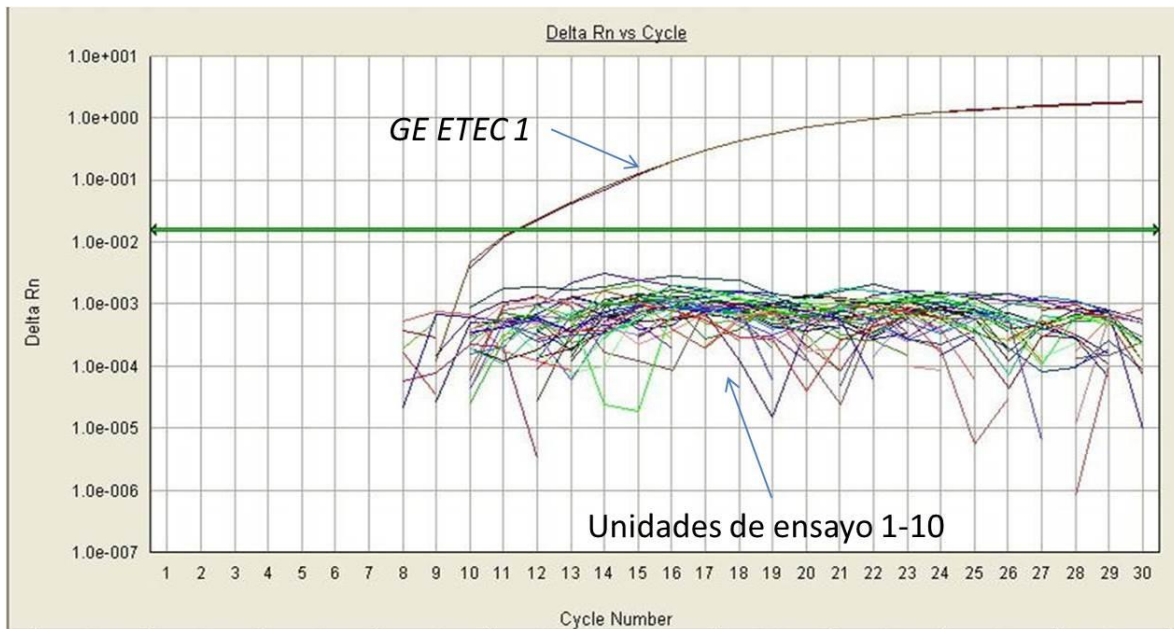


G3. Gráfica de amplificación por qPCR de *GE ETEC 1* y *GE ETEC 2* de ETEC.

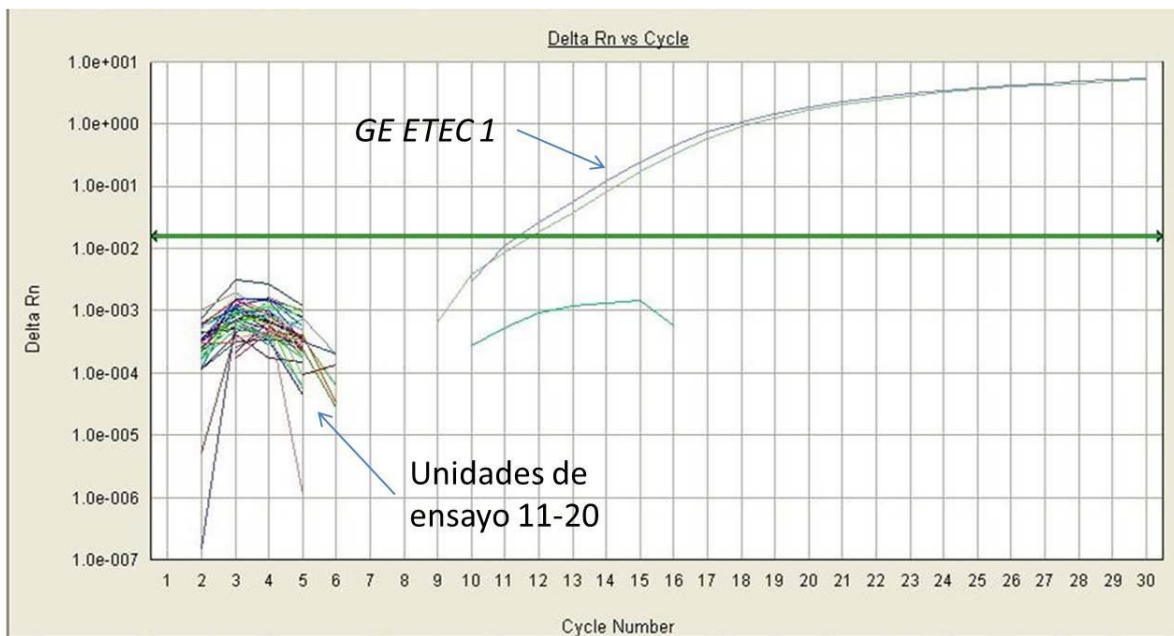


G4. Gráfica de amplificación por qPCR de *GE EHEC 1* y *GE EHEC 2* y los controles negativos de EHEC.

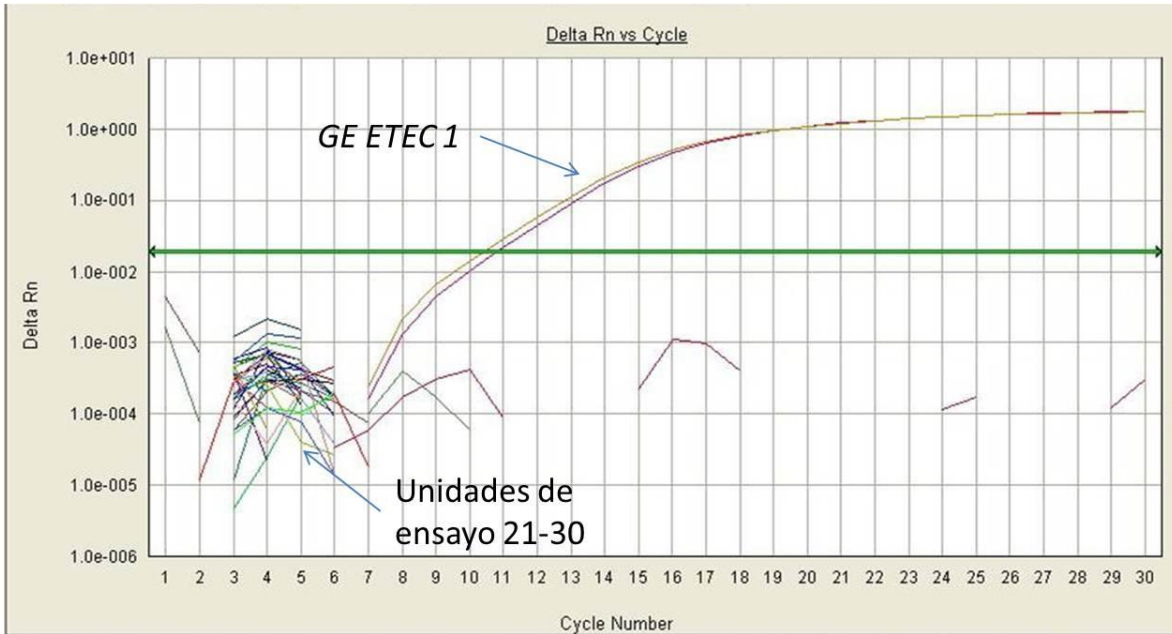
Anexo H. Gráficas por qPCR para el análisis de las unidades de ensayo de queso Cotija artesanal madurado.



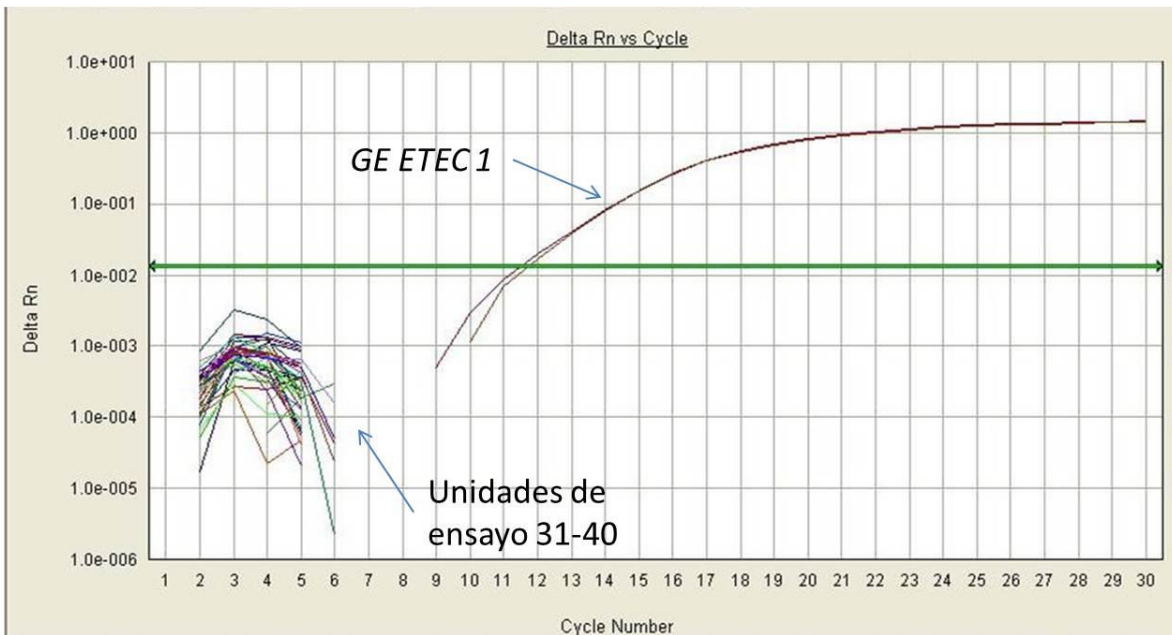
H1. Gráfica de amplificación por qPCR de *GE ETEC 1* y *GE ETEC 2* y las unidades de ensayo 1-10 de ETEC.



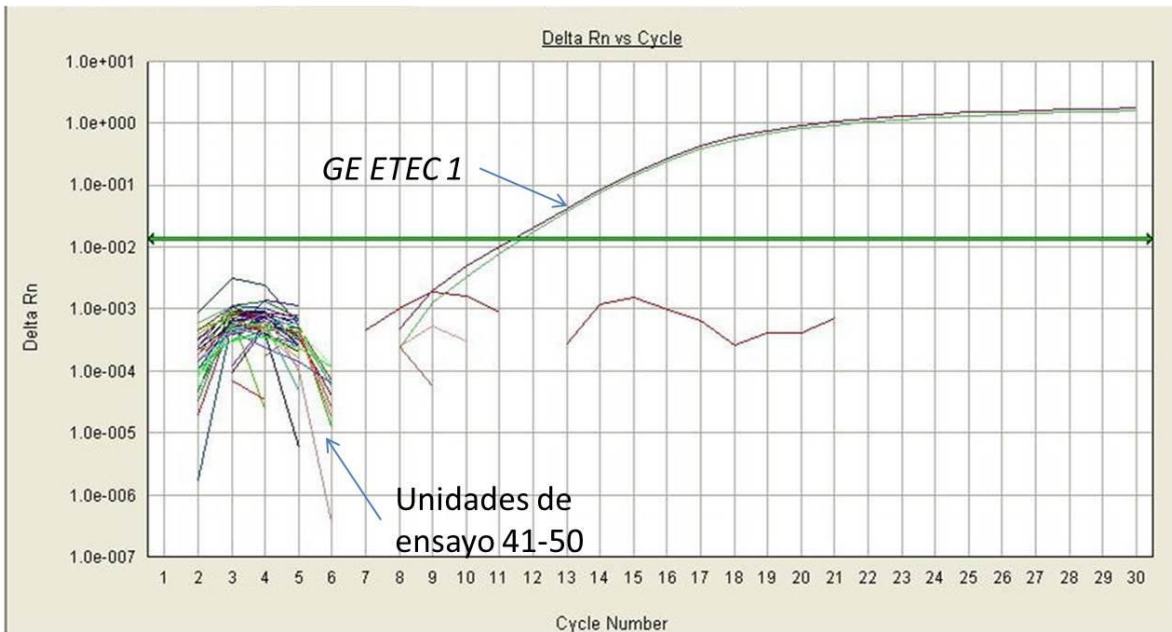
H2. Gráfica de amplificación por qPCR de *GE ETEC 1* y *GE ETEC 2* y las unidades de ensayo 11-20 de ETEC.



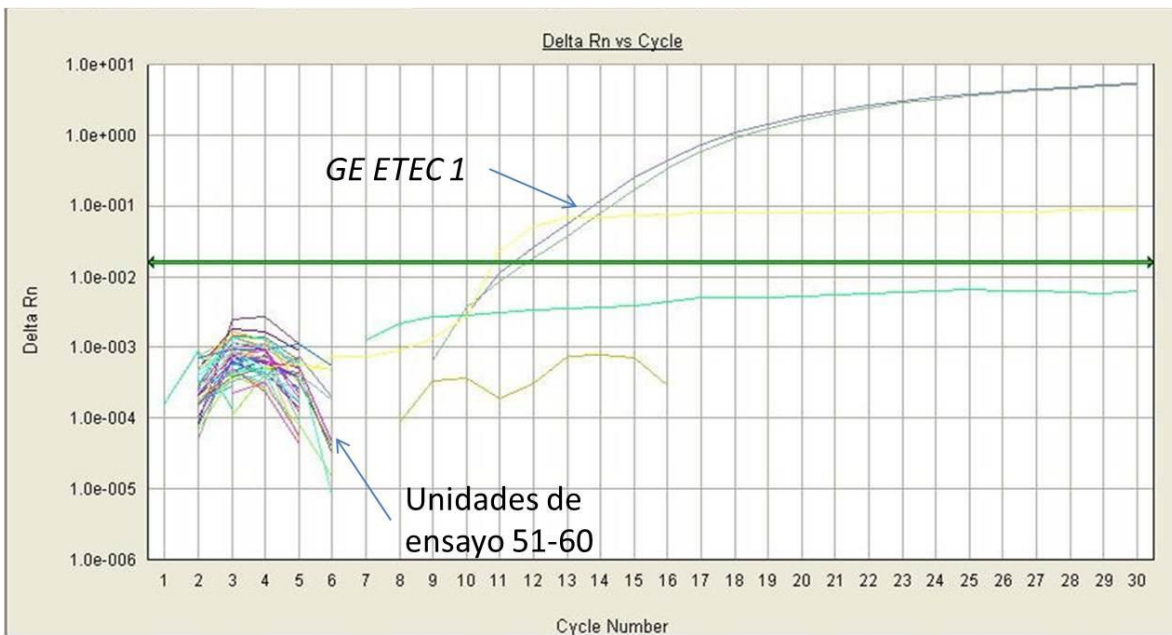
H3. Gráfica de amplificación por qPCR de *GE ETEC 1* y *GE ETEC 2* y las unidades de ensayo 21-30 de ETEC.



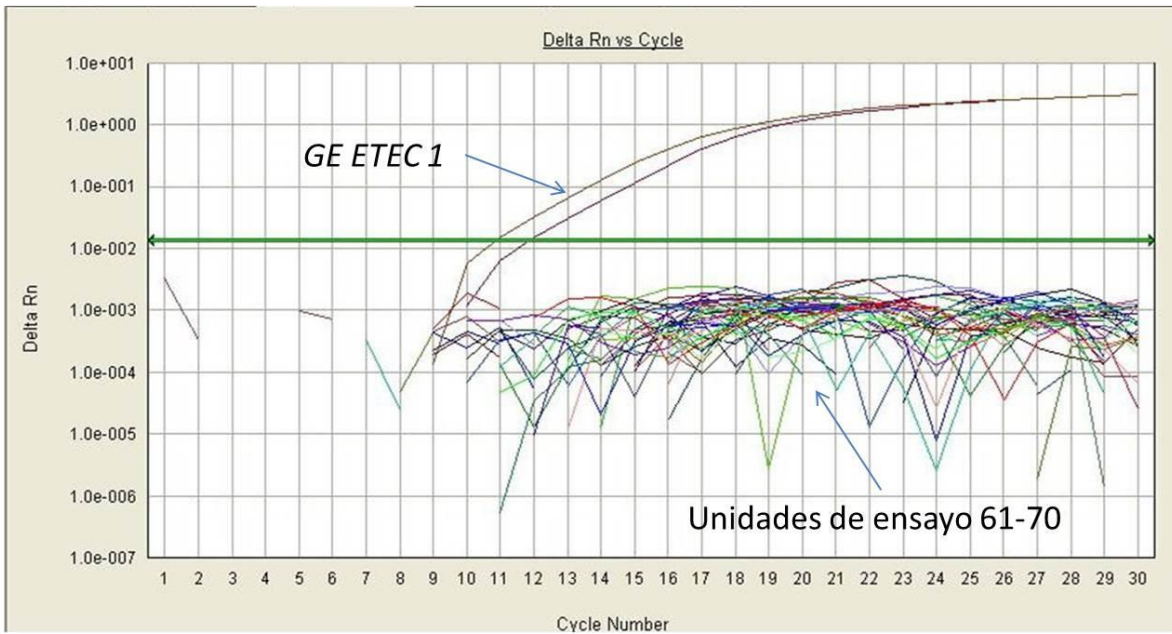
H4. Gráfica de amplificación por qPCR de *GE ETEC 1* y *GE ETEC 2* y las unidades de ensayo 31-40 de ETEC.



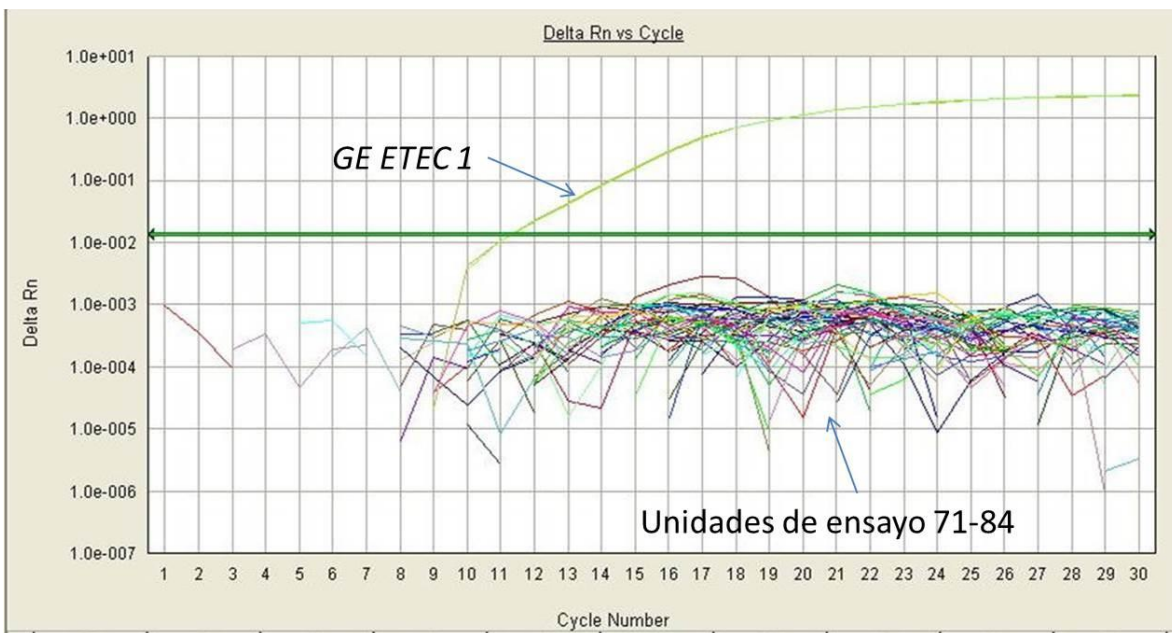
H5. Gráfica de amplificación por qPCR de *GE ETEC 1* y *GE ETEC 2* y las unidades de ensayo 41-50 de ETEC.



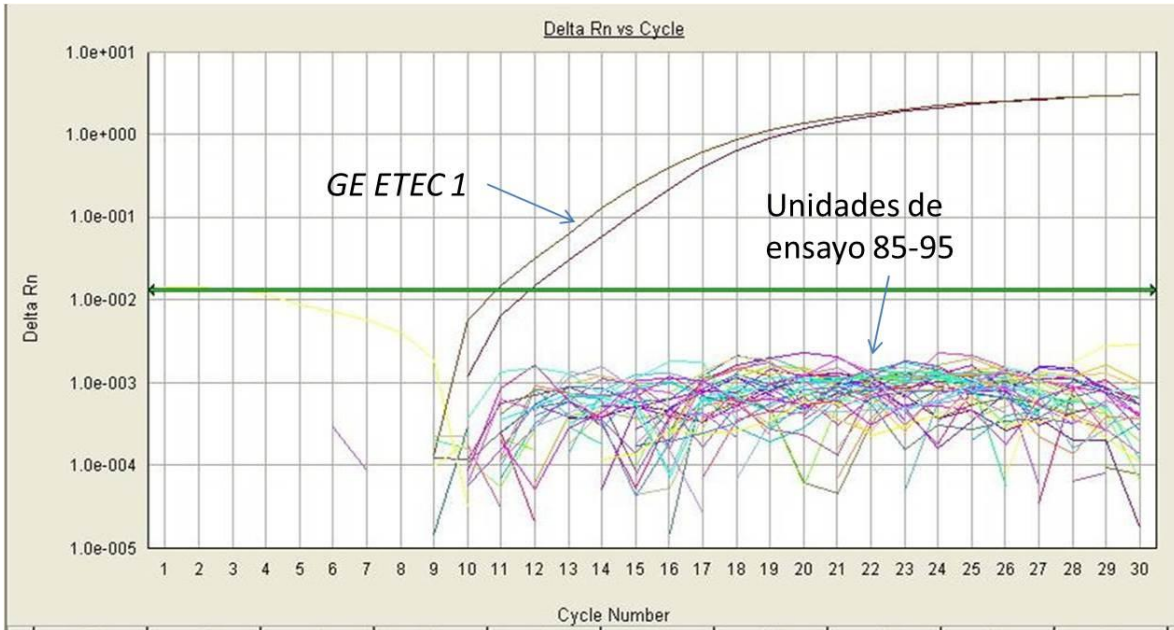
H6. Gráfica de amplificación por qPCR de *GE ETEC 1* y *GE ETEC 2* y las unidades de ensayo 51-60 de ETEC.



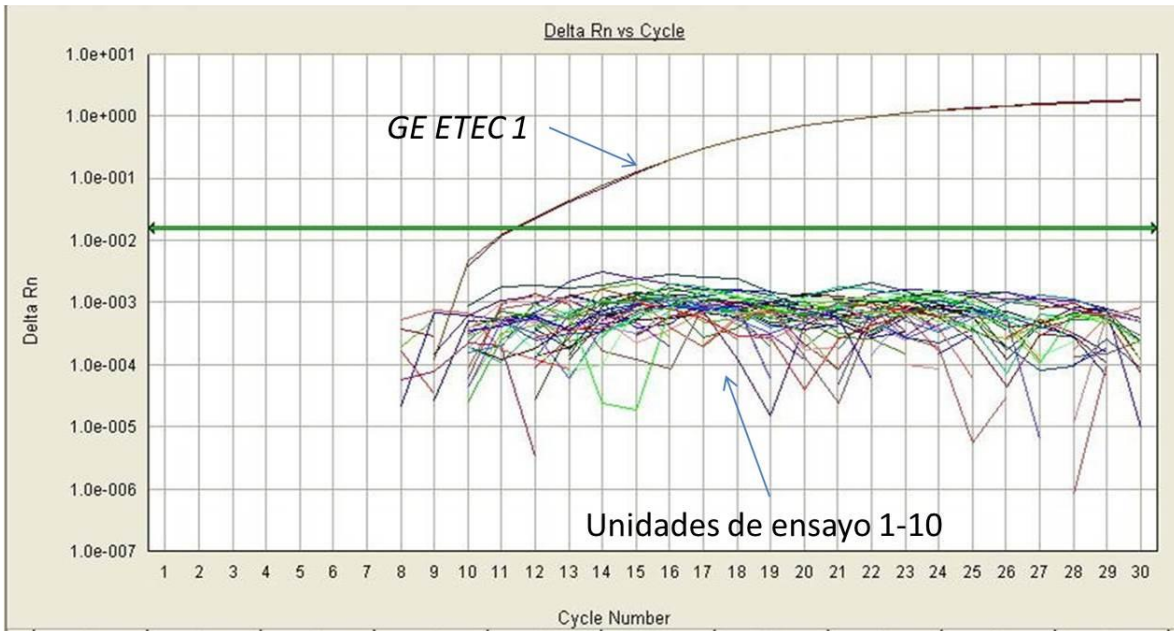
H7. Gráfica de amplificación por qPCR de los *GE ETEC 1* y *GE ETEC 2* y las unidades de ensayo 61-70 de ETEC



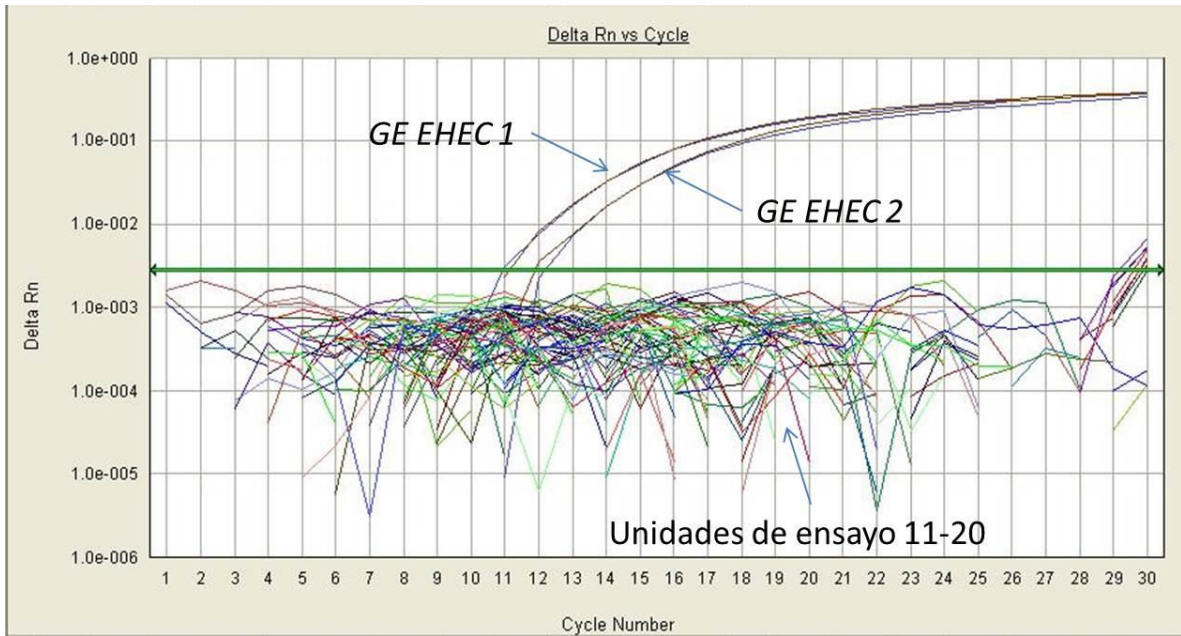
H8. Gráfica de amplificación por qPCR de *GE ETEC 1* y *GE ETEC 2* y las unidades de ensayo 71-84 de ETEC.



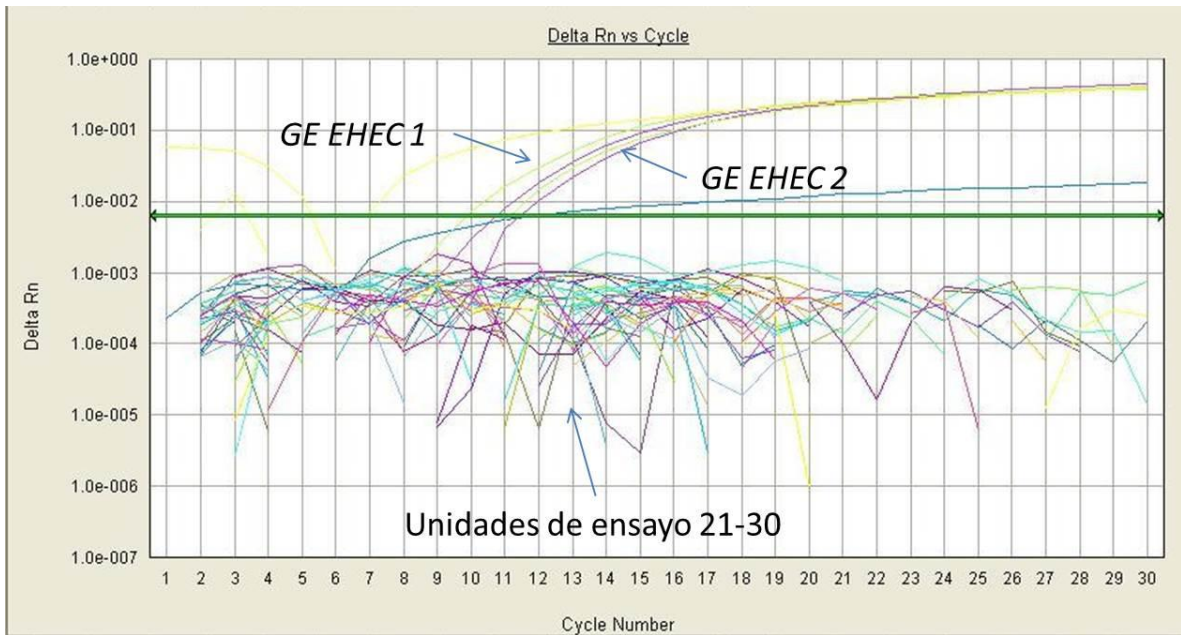
H9. Gráfica de amplificación por qPCR de *GE ETEC 1* y *GE ETEC 2* y las unidades de ensayo 85-95 de ETEC.



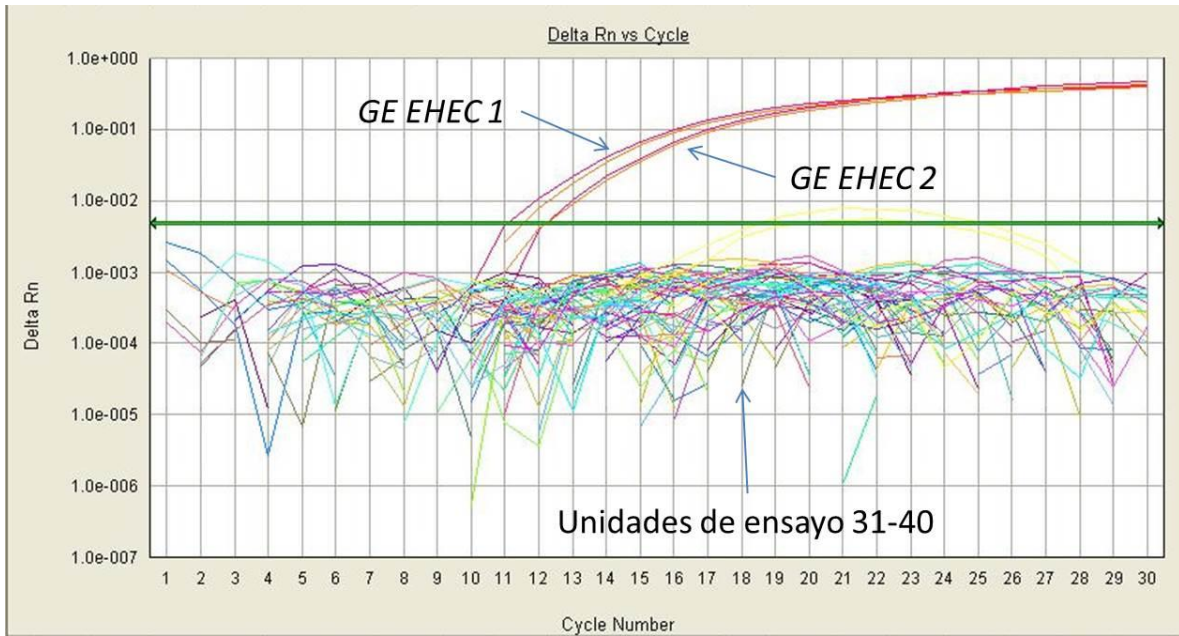
H10. Gráfica de amplificación por qPCR de *GE EHEC 1* y *GE EHEC 2* y las unidades de ensayo 1-10 de EHEC.



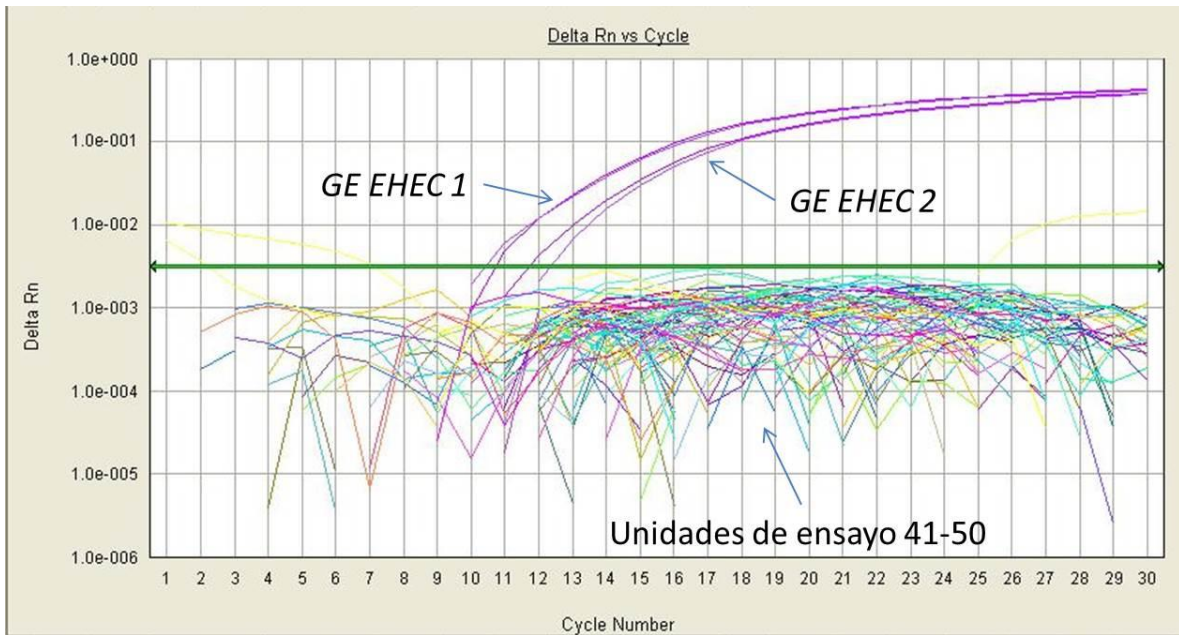
H11. Gráfica de amplificación por qPCR de *GE EHEC 1* y *GE EHEC 2* y las unidades de ensayo 11-20 de EHEC.



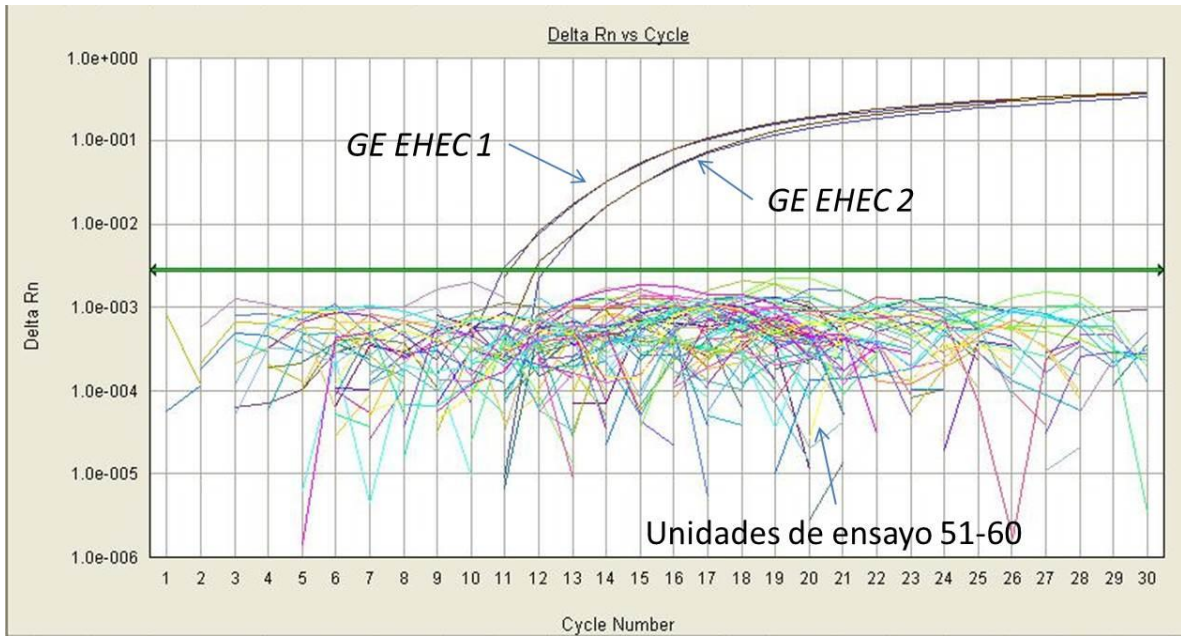
H12. Gráfica de amplificación por qPCR de *GE EHEC 1* y *GE EHEC 2* y las unidades de ensayo 21-30 de EHEC.



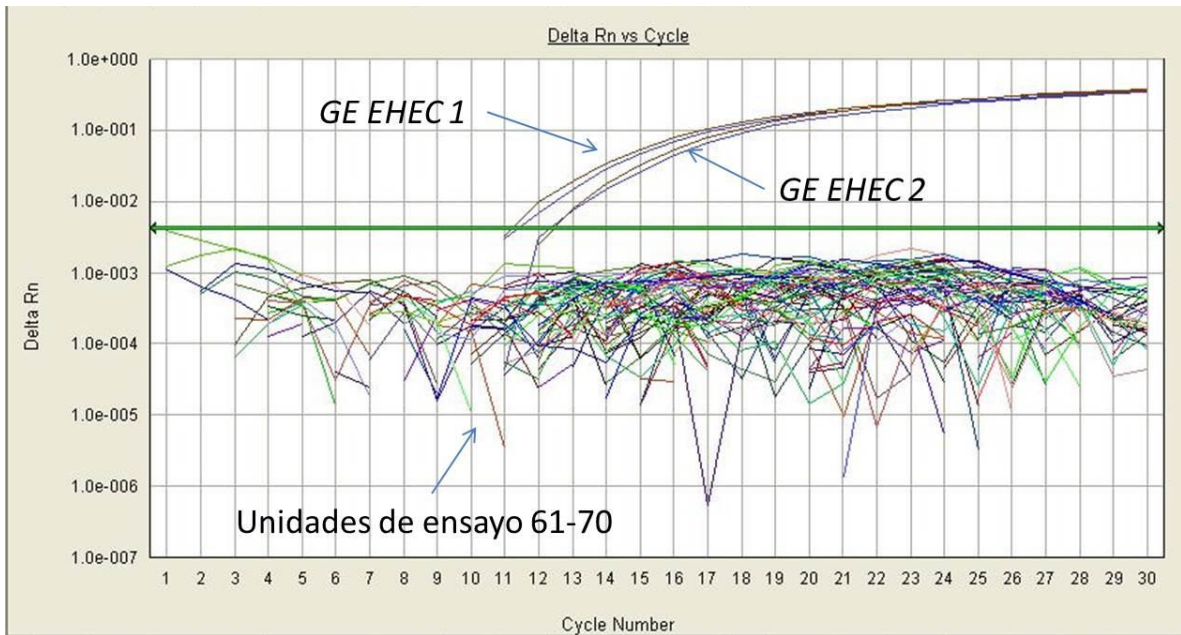
H13. Gráfica de amplificación por qPCR de *GE EHEC 1* y *GE EHEC 2* y las unidades de ensayo 31-40 de EHEC.



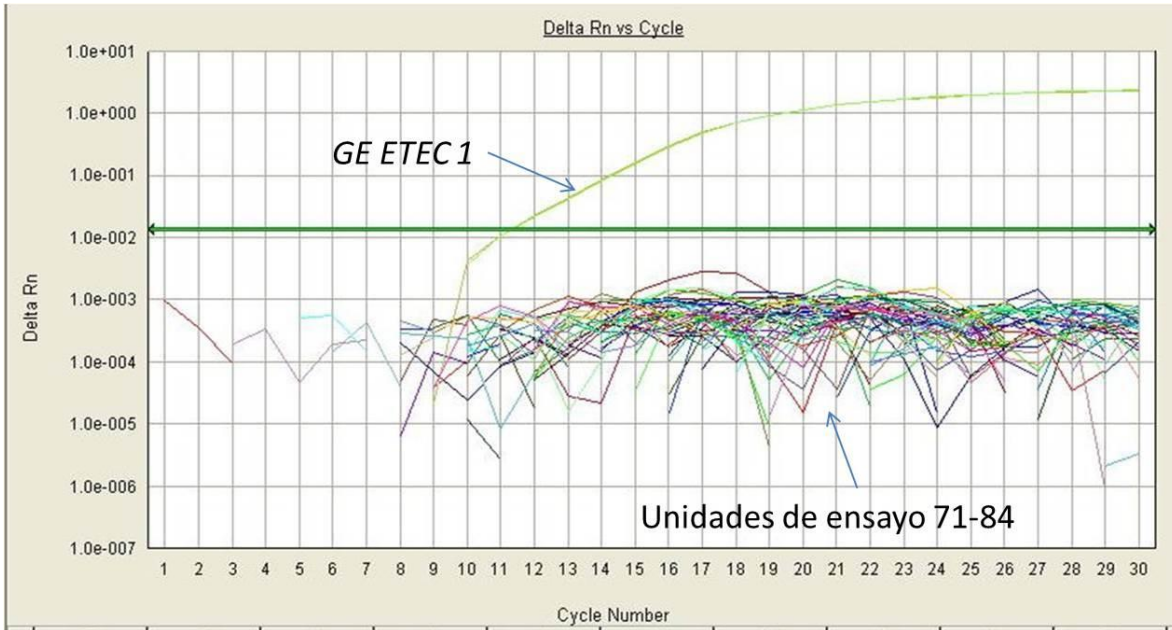
H14. Gráfica de amplificación por qPCR de *GE EHEC 1* y *GE EHEC 2* y las unidades de ensayo 41-50 de EHEC.



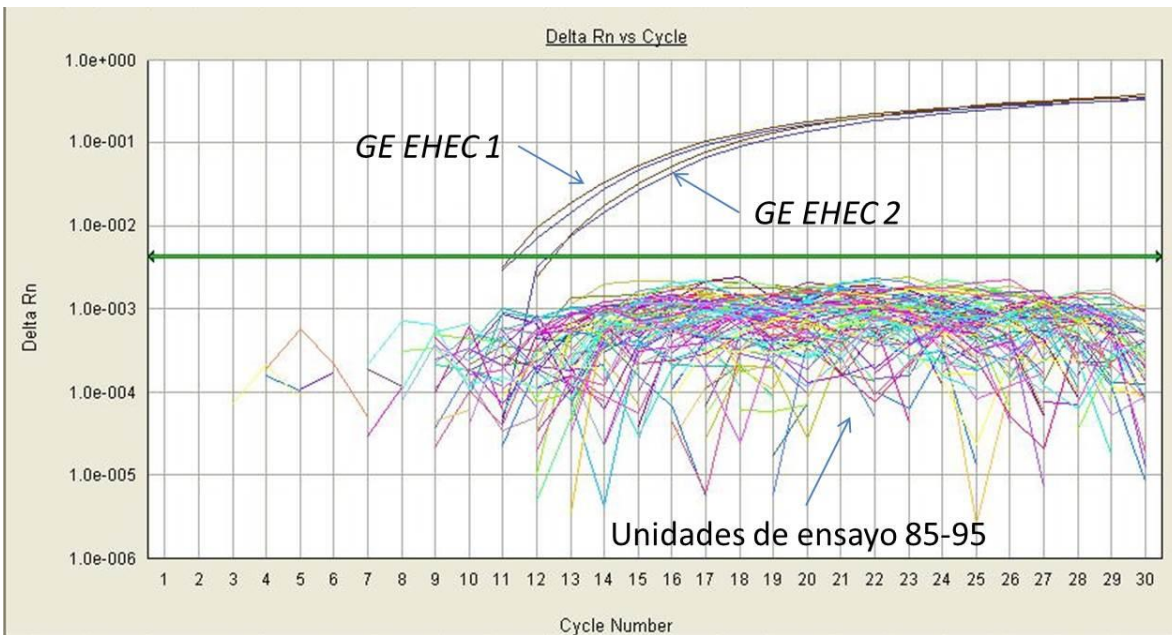
H15. Gráfica de amplificación por qPCR de *GE EHEC 1* y *GE EHEC 2* y las unidades de ensayo 51-60 de EHEC.



H16. Gráfica de amplificación por qPCR de *GE EHEC 1* y *GE EHEC 2* y las unidades de ensayo 61-70 de EHEC.



H17. Gráfica de amplificación por qPCR de *GE EHEC 1* y *GE EHEC 2* y las unidades de ensayo 71-84 de EHEC.



H18. Gráfica de amplificación por qPCR de *GE EHEC 1* y *GE EHEC 2* y las unidades de ensayo 85-95 de EHEC.