



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETECCIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS DE INTERÉS
EN ALIMENTOS EN QUESO BOLA
DE OCOSINGO POR qPCR**

TESIS

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

**PRESENTA:
TANIA OLIVERA MARTÍNEZ**



CIUDAD DE MEXICO, 2023.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: Profesora: María Amanda Gálvez Mariscal

VOCAL: Profesor: Francisco Javier Plasencia de la Parra

SECRETARIO: Profesora: Quirasco Baruch Maricarmen

1er. SUPLENTE: Profesora: Gloria Ruiz Diaz

2° SUPLENTE: Profesora: Tzvetanka Dimitrova Dinkova

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM. EDIFICIO E, LABORATORIO 312. DEPTO ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA.

ESTE PROYECTO FUE FINACIADO POR EL PROYECTO DGAPA PAPIIT IN229319: “ANÁLISIS DE LA MICROBIOTA BACTERIANA DEL QUESO BOLA DE OCOSINGO: DESCRIPCIÓN POLIFÁSICA Y POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO” Y POR EL PAIP FQ CON LA CLAVE 5000-9102.

ASESOR DEL TEMA: _____
DRA. MARICAMEN QUIRASCO BARUCH

SUPERVISOR TÉCNICO: _____
M. EN C. CINDY A. ESTRADA HERNÁNDEZ

SUSTENTANTE(S): _____
TANIA OLIVERA MARTÍNEZ

CONTENIDO

I. Resumen	5
III. Marco teórico.....	8
3.1. Queso bola de Ocosingo.....	8
3.2. Proceso de elaboración del queso Bola de Ocosingo.....	9
3.3. Bacterias patógenas en el queso.....	12
3.3.1. <i>Salmonella enterica</i>	13
3.3.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	14
3.3.3. <i>Escherichia coli</i>	15
3.3.3.1 <i>E. coli</i> EHEC (O:157:H7) (cepas enterohemorrágica).....	16
3.3.3.2 <i>E. coli</i> ETEC (cepas enterotoxigénica).....	16
3.3.4. <i>Listeria monocytogenes</i>	17
3.3.5. <i>Brucella abortus</i>	19
3.4. Métodos dependientes de cultivo y métodos moleculares en microbiología.	20
3.5. PCR tiempo real (qPCR)	21
3.6. Química TaqMan.....	22
3.7. Química SYBR Green I®	24
3.9. PCR en alimentos.....	26
IV. Antecedentes inmediatos	27
V. Justificación	31
VI. Hipótesis.....	31
VII. Objetivos	31
7.1. Objetivo General.....	31
7.2. Objetivos Particulares.....	31
VIII. Metodología.....	32
8.1. Diagrama de Bloques.....	32
8.2. Procesamiento de muestras de Queso bola de Ocosingo.....	32
8.3. Recuperación del paquete celular a partir del queso Bola de Ocosingo.....	33

8.4. Material biológico	34
8.5. Obtención del paquete celular de los microorganismos puros que se utilizaron como control.	36
8.6. Extracción y cuantificación de ADN	36
8.7. Secuencias de Sondas y Cebadores	36
8.8. Especificidad de sondas y cebadores	37
8.9. PCR punto final	37
8.10. Evaluación de la calidad amplificable del ADN molde	40
8.11. Análisis de unidades de ensayo	40
IX. Resultados y Discusión	41
9.1. Evaluación de la calidad de ADN	41
9.3. Efecto de la concentración de ADN molde	46
9.4. Análisis de las unidades de ensayo de Queso bola de Ocosingo	50
X. Conclusiones	68
Bibliografía	69
ANEXO A. Concentraciones promedio de ADN de los microorganismos patógenos (cepas de referencia) y muestras de Queso bola, después del enriquecimiento	74

I. Resumen

El queso bola es un producto lácteo elaborado de manera artesanal a partir de leche no pasteurizada, en el municipio de Ocosingo, Chiapas y, a pesar de que es sometido a un proceso de maduración de 21 días como mínimo, surge la necesidad de buscar bacterias que puedan poner en riesgo la salud del consumidor. El alcance de este proyecto involucró la evaluación de muestras de Queso bola provenientes de 8 productores de la región, cada uno por duplicado. Las técnicas tradicionales para detección de patógenos en alimentos implican tiempos largos y un riesgo al analista, por lo que aquí se planteó como alternativa utilizar la técnica de PCR en tiempo real (qPCR), que además es muy específica y sensible, para el análisis microbiológico de las muestras.

El objetivo de esta investigación fue determinar la presencia de *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (O157:H7 y ETEC), *Listeria monocytogenes* y *Brucella spp.* en muestras de quesos de Ocosingo a través de qPCR.

Durante la etapa de enriquecimiento, una muestra representativa de cada producto, se homogenizó y se inoculó en medios de cultivo selectivos para cada microorganismo blanco. Se extrajo el ADN de los paquetes celulares. La qPCR, de genes específicos para cada bacteria, se realizó mediante la química TaqMan®. Se comprobó la especificidad de los cebadores con cepas de colección (controles positivos y negativos). Para validar el método y corroborar la especificidad tanto de sondas como cebadores, se realizó la qPCR con ADN de diferentes microorganismos patógenos y no patógenos que se podrían encontrar presentes en la microbiota del queso. Los resultados muestran que sólo hubo amplificación a partir del ADN de la bacteria blanco. De igual manera se corroboró la sensibilidad y la eficiencia del método.

Los resultados del análisis de las unidades de ensayo indicaron la ausencia total de ADN de *L. monocytogenes*, *Brucella spp.*, *E. coli* ETEC y O157: H7. Se detectó la presencia de ADN proveniente de *Salmonella enterica* y *S. aureus* en un 1.5% y 0.5% de las muestras, respectivamente. Sin embargo, por el Ct obtenido, correspondería a microorganismos no viables. Lo anterior sugiere que el queso bola de Ocosingo está libre bacterias patógenas que pudieran poner en riesgo la salud del consumidor.

II. Introducción

Las infecciones de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) se diagnostican mediante el cultivo de muestras de alimentos que se suponen contaminados; la identificación y detección de las bacterias se basa principalmente en el crecimiento de las bacterias en medios de cultivo, con base en criterios morfológicos y fisiológicos que pueden depender de factores ambientales o genéticos. Por otro lado, se ha demostrado que algunas células bacterianas pueden entrar en un estado viable pero no cultivable, debido al procesamiento al que se sujeta el alimento, lo que limita el uso de los métodos de cultivo como herramienta de diagnóstico. Además, la obtención de resultados puede demorar varios días. Un alto porcentaje de los casos de ETA no puede asociarse con algún alimento en particular o no es posible identificar al patógeno responsable debido, fundamentalmente, a que los resultados de los análisis bacteriológicos demoran mucho tiempo, lo que sugiere la necesidad de establecer métodos rápidos y eficientes de detección del agente causal (Probert et al 2004; Flores y Herrera, 2005).

Uno de los retos actuales en la tecnología de los alimentos, es la de implementar métodos rápidos y sensibles para el diagnóstico confiable de enfermedades que se pueden transmitir a través de los alimentos, asociadas al consumo de productos y subproductos de origen animal (Castro et al., 2005).

La búsqueda de metodologías rápidas para asegurar una buena calidad de los productos es una necesidad. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), es un método rápido y confiable, además de que representa una buena opción para lograr el diagnóstico rápido y específico de bacterias patógenas, ya que se basa en la detección de genes particulares del microorganismo de interés (Flores y Herrera, 2005). Al basarse en características genotípicas y no fenotípicas, la detección resulta más confiable, pues no depende de las condiciones del cultivo.

Los quesos artesanales fueron los precursores de los industrializados, y su consumo puede generar desconfianza porque algunos se elaboran con leche cruda (leche no pasteurizada). Villegas (2004) y Ramírez (2011) mencionan que en México se elaboran más de 30 tipos de quesos, la mayor parte de ellos son del tipo artesanal, y de estos quesos el más comercializado es el queso fresco (Villegas y Cervantes, 2011).

González y col. (2004) definen al queso fresco artesanal como aquel producto que es blanco, blando, con alta humedad, sabor tenue a leche y salado, mientras que Ramírez (2011) menciona que la elaboración de queso artesanal en México, en muchas ocasiones, no incluye la pasteurización de la leche, lo que lo hace un producto altamente perecedero; haciéndolo un excelente sustrato para el crecimiento de microorganismos patógenos, lo que representaría un riesgo a la salud pública.

El queso bola de Ocosingo es un queso muy original y único dentro de los quesos artesanales mexicanos debido a su proceso de elaboración y su forma de presentación. Es una bola dura, de diámetro entre 8 y 12 cm, y con un peso entre 400 y 1000 g. Consiste en una doble corteza de caseína muy firme que encierra la pasta de un queso doble crema, la que se caracteriza por ser relativamente blanca o amarillo marfil, blanda, ácida y aromática con grandes atributos sensoriales (Cervantes et al, 2013). Se elabora de manera artesanal a partir de leche no pasteurizada. Durante el proceso de su elaboración se llevan a cabo varias operaciones manuales en instalaciones que no necesariamente cumplen con la normatividad mexicana establecida para áreas destinadas a elaboración de alimentos con base a la NOM-251-SSA1-2009. Los productores dicen que la leche que utilizan proviene de ganado sano y que los animales participan en campañas contra brucelosis y tuberculosis; sin embargo, no todos los productores son dueños del ganado, suelen comprar la leche a un tercero y no les consta la salud de los animales. Por otra parte, no existen estudios donde se busque la presencia de bacterias patógenas en este tipo de queso a través de métodos moleculares.

El presente trabajo aporta información científica sobre la inocuidad microbiológica del queso Bola de Ocosingo, la cual se obtuvo a través de PCR en tiempo real mediante la química Taq Man®, que se realizó sobre muestras proveniente de 8 productores diferentes: “Queso ocosingo”, “Laltic”, “La Maya”, “La Peña”, “Regional”, “Dorados de la selva”, “Queshill”, y “Santa Rosa”; de cada uno de estos fabricantes se analizaron 2 quesos, teniendo un total de 16 muestras. Se obtuvo un amplio panorama, ya que, se analizaron 8 de los 12 queseros de la región, cubriendo un 66% de los productores de la zona.

III. Marco teórico.

3.1. Queso bola de Ocosingo

El municipio de Ocosingo es el más grande del estado de Chiapas, se localiza en el extremo este del estado, limita al norte con el municipio de Palenque; al este y al sur con Guatemala y al oeste con los municipios de Chilón, Tenejapa, Oxchuc y Altamirano (Figura 1). El queso bola de Ocosingo, es una esfera dura, con un diámetro que varía entre 8 y 12 cm, con un peso comprendido entre 400 g y 1 kg, aproximadamente. Es considerado como un queso doble, integrado por una pasta resultado del cuajado mixto (por cuajo y acidez natural) madurado por 21 días; y un forro hecho a partir de dos capas de pasta hilada caliente de leche descremada, que al enfriarse forma una corteza de caseína muy consistente, a manera de una dura cáscara, que encierra la pasta del queso propiamente dicho. Se elabora con leche cruda de vaca de doble propósito (este tipo de ganado se utiliza en la producción y venta tanto de leche como de carne), su elaboración puede dividirse en dos fases: la hechura de la pasta del núcleo por cuajado mixto (láctico-enzimático) y la confección de la corteza o forro (Cervantes et al., 2013).

Es un producto típico cuya calidad está ligada al origen y lo hacen unos cuantos queseros artesanales, cuyo conocimiento tecnológico se basa en un saber hacer tradicional que ha pasado de generación en generación por transmisión oral y práctica. Cabe señalar que ya cuenta con la Marca Colectiva que refuerza su valor agregado: el 24 de octubre del 2005, el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) otorgó a la Sociedad Agropecuaria e Industrial Quesera de Ocosingo S.P.R. de R.I. (SAIQUO) el registro de la marca: “Queso bola de Ocosingo, Chiapas” (López et al., 2015).



Figura 1. Localización del municipio de Ocosingo, Chiapas. Limita al norte con el municipio de Palenque; al este y al sur con Guatemala y al oeste con los municipios de Chilón, Tenejapa, Oxchuc y Altamirano. El clima del municipio varía con la altitud, predominando el cálido húmedo, mientras que la temperatura media anual se sitúa entre 18 y 28°C (INAFED, Cervantes et al, 2014)

3.2. Proceso de elaboración del queso Bola de Ocosingo.

El queso se elabora con leche cruda de vaca de doble propósito como se mencionó anteriormente, proveniente exclusivamente de ganado de la región, cruce de cebú y pardo suizo que pastorea libremente. La elaboración del queso bola de Ocosingo se divide en dos etapas, la primera consiste en la elaboración de la pasta del centro y la segunda es la confección del forro a partir de leche descremada. Una de las características particulares en su elaboración, es que no se utilizan cultivos iniciadores.

El proceso de elaboración de este queso se esquematiza en la Figura 2 y se explica a continuación (Villegas y Cervantes, 2017);

Elaboración de la pasta del centro

1. **Recepción y colado:** La leche cruda es recibida y se cuela en lienzos de algodón.
2. **Cuajado y reposado:** Antes de la adición de cuajo, se adicionan 4 kg de crema/100 L de leche (realizan una estandarización), con la finalidad de obtener el centro doble crema. Se agrega una dosis de 2.5-5 mL de cuajo comercial puro

de ternera 1:10.000 por cada 100 L de leche y se deja reposar la leche a temperatura ambiente durante 24 horas aproximadamente.

3. **Cortado y desuerado:** La cuajada se corta y se transfiere a una manta de algodón, formándose una especie de bolsa; se deja escurrir el suero (desuerado), el cuál puede ser acelerado colocando la bolsa en una prensa durante 24 h.
4. **Madurado de la pasta:** La masa se deja reposar para que madure colgado en un lapso de varios días, cambiando la manta cada tercer día. Por cada cambio de manta se realiza un amasado a la pasta. De acuerdo con las reglas de la Marca Colectiva, se establece que la maduración debe durar al menos 21 días en condiciones ambientales. La fermentación y maduración se efectúa por la microbiota nativa de la leche, además de lo que se pueda inocular a través de los materiales utilizados de las superficies de elaboración y por parte de los mismos productores.
5. **Moldeado:** Se toman porciones de aproximadamente 400 g a 700 g, se compactan y se manipulan hasta que se logre obtener un aspecto esférico. Después se realiza un forro a estas piezas con dos capas de cuajada hilada y caliente, elaborada con leche completamente descremada. El forro, constituido de caseína principalmente, se enfría y se orea, de tal forma que funge como un empaque protector.

Elaboración del forro

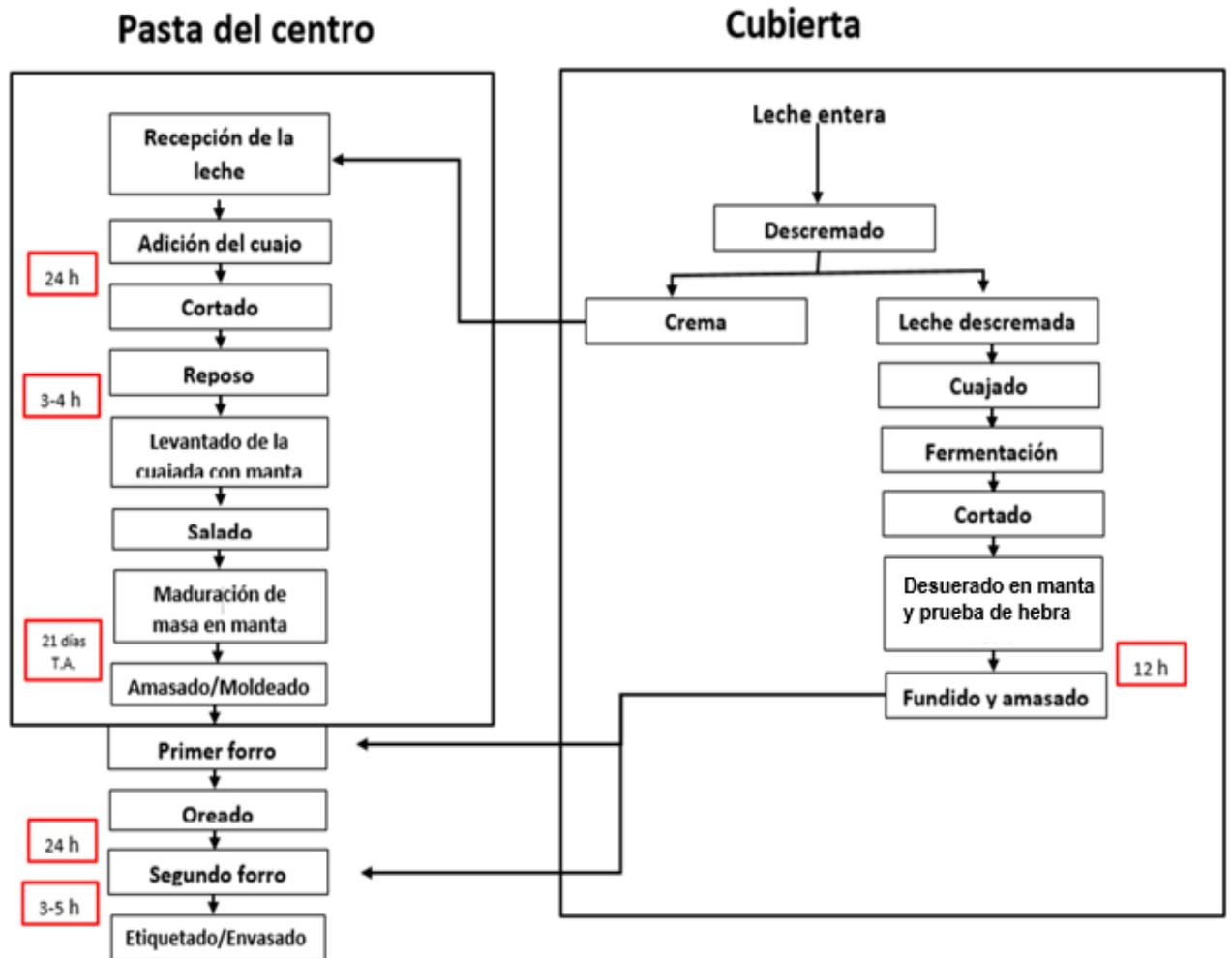
1. **Recepción de la leche y descremado:** La leche cruda se recibe y se cuela en un lienzo de algodón. Posteriormente, la leche se descrema a través de un proceso de centrifugación y la crema que se obtiene es la que se utiliza para la pasta del centro.
2. **Cuajado y reposado:** A la leche descremada se le adicionan 10 mL de cuajo/100 L de leche, se agita la mezcla para lograr una incorporación total del cuajo. Este se deja reposar de 3 a 4 horas en recipientes cerrados.
3. **Bolseado y prueba de la hebra:** La cuajada se corta y se transfiere a una manta de algodón y se forma una especie de bolsa; se deja desuerar durante 12 h. Al

término, se hace una prueba de hebra, donde estiran el queso hasta el punto en que el productor decide que ya es óptimo para realizar el forrado.

4. **Fundido y amasado:** La cuajada se corta y se agrega agua caliente para así obtener una pasta. Después, se amasa hasta que se observa una masa con apariencia brillante.
5. **Moldeado:** Se forman porciones de 400 a 700 g y se compactan con las manos, dándoles una forma casi esférica. Finalmente. Las piezas se forran con dos capas de cuajada hilada, elaborada con leche descremada. Esta capa es rica en caseína y al enfriarse se endurece y funciona como empaque protector.

El nivel tecnológico de las queserías corresponde al perfil artesanal, con equipamiento básico. Algunas tienen implementos de acero inoxidable, y en otras persiste el uso de utensilios de madera (Agudelo & Cesín, 2013). Su producción se ha dado en espacios rurales aislados y bajo condiciones de rezago tecnológico, lo que evita su producción masiva en el contexto del mercado global.

Figura 2. Diagrama general para la elaboración del queso Bola de Ocosingo.



(Tomado y modificado de Villegas y Cervantes, 2017)

3.3. Bacterias patógenas en el queso

Las principales causas de contaminación en quesos con bacterias patógenas son: pobre actividad del microorganismo iniciador (en caso de utilizarse para la elaboración), falta de higiene en la planta y proceso de elaboración, contaminación ambiental y la falta de pasteurización de la leche (Fox, et al, 2000). Sin duda, el factor más importante en el control del crecimiento de patógenos en queso es la pasteurización de la leche, sin embargo, una de las razones para el uso de leche cruda es que, con ésta, se producen quesos con notas más complejas de sabor y olor.

La presencia y sobrevivencia de microorganismos patógenos en el queso está influenciada por diversos factores como (Hernández, I. 2012):

- El género y especie de los microorganismos encontrados
- Cantidad inicial de microorganismos
- Su condición fisiológica
- Producción de ácido por los cultivos iniciadores o microorganismos naturalmente presentes en la leche y en consecuencia el descenso del pH en la pasta
- Tolerancia de los microorganismos al ácido y a la concentración de sal presente
- Contaminación post-manufactura
- Cambios bioquímicos durante la maduración del queso
- Temperatura de almacenamiento y etapa maduración del queso

A continuación, se abordan los principales microorganismos patógenos transmitidos por alimentos: *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (O157:H7 y ETEC), *Listeria monocytogenes* y *Brucella spp* y encontraremos información relevante como su habitat, condiciones generales de crecimiento, sus síntomas y enfermedades.

3.3.1. *Salmonella enterica*

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

Es quimiorganótrofo, posee la habilidad de metabolizar nutrientes por vía respiratoria y vía fermentativa. Cataboliza D-glucosa y otros carbohidratos produciendo ácido y gas, pero no fermenta lactosa ni sacarosa. El género posee una capacidad de adaptación a condiciones ambientales extremas, sobrevive a periodos largos de congelación, resiste al calor y tiene una respuesta de tolerancia al ácido (ATR), esta última brinda al microorganismo mayor resistencia a estrés osmótico y temperatura. En la Tabla 1 se muestran las condiciones generales de crecimiento y rango de sobrevivencia de *Salmonella spp* (Doyle, M., 2001).

Tabla 1. Condiciones generales de crecimiento de *Salmonella spp.* (Doyle, 2001)

Factor	Óptimo	Rango de sobrevivencia
Temperatura	37°C	5°C – 47°C
pH	6.5 – 7.5	4.5 – 9.5
a_w	0.99	Límite 0.93

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

Debido a esta adaptabilidad, se ha cuestionado la presencia de *Salmonella spp.* en alimentos fermentados, especialmente, en productos que utilizan como materia prima leche cruda. (James, M., 2005). El principal reservorio de *Salmonella spp.* es el tracto intestinal de animales y humanos.

De acuerdo con la NOM-114-SSA1-1994, que describe el método para la detección de *Salmonella* en alimentos, se debe establecer la presencia de estos microorganismos, debido a que la principal causa de infección con *Salmonella spp* es la ingesta de comida o agua contaminada, es importante el uso de las Buenas Prácticas de Manufactura durante la elaboración de los productos alimenticios para evitar la diseminación de la bacteria. Otra causa de infección es debida a contacto persona-persona infectada (Oliver, 1990)

Salmonella enterica es el principal patógeno causante de salmonelosis en humanos y animales en el mundo. La enfermedad se caracteriza por diarrea, dolor abdominal, dolor de cabeza, vómito y náuseas. El período de incubación es de 5-72 h, y la duración aproximada de la enfermedad es de 1-4 días (Doyle, M., 2001; Cliver, D.,1990).

3.3.2. *Staphylococcus aureus.*

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram-positiva, mesófila, anaerobia facultativa, con agrupación característica en racimos, cadenas cortas o diplococos, cuyo hábitat natural son las vías respiratorias especialmente la nariz y garganta, así como la superficie de la piel de seres humanos y otros mamíferos, incluso personas que gozan de buena salud pueden ser portadoras de este microorganismo (Bernard et al., 1984; Brock et al., 1991).

Es un microorganismo patógeno del cual aproximadamente el 50% produce alguna enterotoxina, principalmente las enterotoxinas A y E se encuentran relacionadas con intoxicaciones alimentarias. Es un microorganismo halotolerante y puede resistir condiciones incluso de desecación. En la Tabla 2 se resumen las condiciones de crecimiento y sobrevivencia de *S. aureus* (Adams et al., 1997).

Tabla 2. Condiciones generales de crecimiento de *S. aureus* (Adams et al., 1997).

Factor	Óptimo	Rango de sobrevivencia
Temperatura	35°C – 37°C	7°C – 48°C
pH	6 – 7	4 – 9.8
NaCl	0.5 – 4%	0 – 20%
a_w	0.98 - > 0.99	0.83 - > 0.99

La intoxicación alimentaria por *Staphylococcus aureus* se caracteriza por un periodo de incubación corto, típicamente 2-4 h. Los síntomas predominantes son náusea, vómito, espasmos de estómago, siendo la curación completa en un plazo de 1-2 días. Las toxinas responsables se encuentran en los alimentos y la causa principal de esta intoxicación es debida a que los alimentos no se conservan a las temperaturas adecuadas (Adams et al., 1997).

Los estafilococos enterotoxigénicos pueden encontrarse presentes en los alimentos al momento de su obtención o bien llegar posteriormente a ellos a partir principalmente de los manipuladores. Cuando *S. aureus* se encuentra presente en un alimento y las condiciones de almacenamiento y composición son favorables, éste se multiplica, y al alcanzar niveles por encima de 10⁵ UFC/g, se produce cantidad suficiente de enterotoxina para causar enfermedad. En la NOM-243-SSA1-2010 y NOM-121-SSA1-1994 se estipula como límite ≤100 UFC/g o mL

3.3.3. *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, con capacidad de movilidad mediante flagelos peritricos. 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). En la Tabla 3 se muestran las condiciones generales de crecimiento para *E. coli* (Dos Santos., 2007).

Tabla 3. Condiciones generales de crecimiento para *E. coli*. (Dos Santos., 2007).

Factor	Óptimo	Rango de Sobrevivencia
Temperatura	37°C	7°C – 50°C
pH	6 – 7.5	4.4 – 8
a_w	0.99	0.98

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, G., 2002).

3.3.3.1 *E. coli* EHEC (O:157:H7) (cepas enterohemorrágica)

Produce principalmente Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y Colitis Hemorrágica (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 (Rodríguez, 2002).

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

3.3.3.2 *E. coli* ETEC (cepas enterotoxigénica)

Este serogrupo de *E. coli*, coloniza la mucosa del intestino mediante pili y fimbrias, los cuales tienen diversas formas de antígenos factores de colonización. Su principal mecanismo de patogenicidad es la producción de enterotoxinas, llamadas toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST). 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. La principal fuente de contaminación de agua y alimentos es por material fecal, y la dosis infectiva es de 10^8 UFC/g (Rodríguez, G., 2002).

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 y en pocos casos llega a provocar fiebre y vómito. (Deng, M.Y., et al., 1996).

3.3.4. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes, se describe como un bacilo corto Gram-positivo, no esporulado móvil a 22°C, aerobi. y anaerobio facultativo, intracelular facultativo, con metabolismo fermentativo, productor de ácido, pero no de gas a partir de glucosa, oportunista; mide de 1 a 2 mm de largo por 0.5 mm de ancho, sus extremos son curvos. Se encuentra ampliamente distribuida en el suelo, agua, productos agrícolas, y alimentos procesados (especialmente lácteos), causando infecciones en peces, aves y mamíferos incluyendo al humano. *L. monocytogenes* tiene gran capacidad de adaptación, es altamente resistente a los efectos de la refrigeración, el secado, altas concentraciones de NaCl (hasta 10%) y calentamiento, aunque se inactiva a temperaturas superiores a 75°C. En la Tabla 4 se muestran las condiciones generales de crecimiento para este microorganismo. (Doyle, M., 2001).

Listeria monocytogenes es un organismo no exigente, esto se debe a que se puede reproducir en medios sintéticos simples. El carbohidrato ideal para el crecimiento de *L. monocytogenes* es la glucosa, que no puede ser sustituido como fuente de energía o de carbono por gluconato, xilosa, arabinosa o ribosa. Un medio óptimo para el crecimiento de *L. monocytogenes* debe incluir glucosa, riboflavina y biotina, junto con aminoácidos (isoleucina, leucina, valina y cisteína) y presencia de Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , y PO_4^{3-} , que también se requieren para el crecimiento. Uno de los medio más utilizados para la

detección de *L.monocytogenes* es el medio Fraser ya que es un medio de enriquecimiento que contiene peptonas, extracto de carne y extracto de levadura las cuales proporciona nitrógeno, vitaminas y mienrales,

Tabla 4. Condiciones generales de crecimiento para *Listeria monocytogenes* (Doyle, 2001).

Factor	Óptimo	Rango de Sobrevivencia
Temperatura	30°- 37°C	1°C – 45°C
pH	6 – 8	4.1 – 9.6
a_w	0.97	0.90

Aunque el origen y el modo de transmisión de todas las formas de infección de *L. monocytogenes* es compleja, se ha hecho un intento para rastrear las distintas vías de infección. La listeriosis tradicionalmente ha sido reconocida como una zoonosis, una enfermedad infecciosa de los animales que es transmisible a los seres humanos (Doyle, M., 2001; Jayet al., 2005).

La dosis infecciosa de *L. monocytogenes* depende de varios factores, que incluyen el estado inmunológico del hospedero. La aparición y el curso de la infección dependen de los factores de virulencia y de la dosis infecciosa. Los datos publicados indican que las cantidades de *L. monocytogenes* en el alimento contaminado responsable de casos esporádicos de origen alimentario eran más de 100 UFC/g. Sin embargo, debido a que las técnicas de recuento no son confiables del todo y a que el tiempo transcurrido en el consumo y el análisis del alimento contaminado puede permitir la multiplicación o la muerte de las listerias, es posible que los resultados no siempre sean indicativos de la cantidad de listerias ingeridas. Por consiguiente, estos datos no excluyen la posibilidad de que dosis más bajas sean infecciosas (Doyle, M., 2001). En la NOM-243-SSA1-2010 se estipula la ausencia de *L. monocytogenes* en 25 mL o g.

Los síntomas de la listeriosis incluyen dolor abdominal, vómito, diarrea y fiebre. También puede provocar septicemia, encefalitis, infecciones intrauterinas o cervicales en mujeres

embarazadas, lo cual puede dar lugar al aborto espontáneo o al nacimiento de un bebe muerto o meningitis (meningoencefalitis) en recién nacidos.

3.3.5. *Brucella abortus*

La brucelosis es una zoonosis bacteriana de distribución mundial, que limita el desarrollo ganadero y ocasiona enormes pérdidas a la industria pecuaria, y que representa un verdadero riesgo ocupacional para las personas que trabajan o consumen productos crudos provenientes de animales infectados por bacterias del género *Brucella*, el cual es coco-bacilo Gram-negativo, no esporulado, anaerobio, facultativo, inmóvil, carente de pili o flagelos, no fermentan los azúcares, y es catalasa y oxidasa positivo. Es resistente a la desecación y en consecuencia tiene una sobrevivencia en el medio ambiente muy elevada (Castro et al., 2005). En la Tabla 5 se muestran las condiciones generales de crecimiento para *Brucella abortus* (Doyle, M., 2001).

Tabla 5. Condiciones generales de crecimiento para *Brucella abortus*. (Doyle, 2001).

Factor	Óptimo	Rango de Sobrevivencia
Temperatura	30°- 37°C	25°C – 40°C
pH	7	4 – 7.4
<i>a_w</i>	0.99	0.98

La bacteria generalmente se localiza en los tejidos retículo endotelial, órganos reproductivos, articulaciones y huesos, donde ocasiona infecciones crónicas en el ganado, caracterizadas por bacteremias recurrentes o persistentes que culminan en el aborto en vacas, ovejas y cabras; además de infectar los órganos reproductivos del macho y causarles lesiones de consideración (Probert et al., 2004).

La transmisión de la brucelosis en el humano es a través del contacto directo con secreciones de animales infectados y por el consumo productos y subproductos de origen animal contaminados (queso y leche no pasteurizada, carne cruda y vísceras), lo cual fue reconocido en la primera reunión interamericana de brucelosis, donde se mencionó que la movilización de lácteos hacia zonas urbanas, como parte de la comercialización, ha contribuido en buena medida a la diseminación de la enfermedad,

sin importar qué tan alejados están los sitios de las zonas endémicas. Así mismo, la transmisión puede ser también a través de transfusiones sanguíneas, donación de órganos, trasplante de tejidos, así como también por exposición ocupacional. Los trabajadores de actividades pecuarias y rastros, carniceros, laboratoristas y médicos veterinarios, y otros que están en contacto con animales vivos, cadáveres y subproductos, son la población de mayor riesgo (Castro et al., 2005; Álvarez et al., 2015)

Soares y col. (2015) refieren que la brucelosis en los seres humanos es muy diversa y que se puede presentar en tres formas: aguda, asintomática (o subclínica), producida por cepas de baja virulencia, la cual cursa con síntomas poco aparentes o muy leves acompañados de fatiga en general, que se resuelven sin ningún tratamiento y posteriormente evoluciona a la forma crónica. Sin embargo, la mayoría de los autores coinciden en considerar solo las fases aguda y crónica. La aguda se caracteriza por temperatura de hasta 40°C continua o intermitente, de duración variada, (la fiebre que se presenta en el 95 a 98% de los casos), escalofríos (69-85%), fatiga, acompañada por malestar generalizado y en menor porcentaje, sudores profusos, cefalea, debilidad, dolores generalizados, anorexia, estado de ánimo depresivo, pérdida de peso, además de trastornos reproductivos como orquitis y disfunción eréctil, impotencia sexual en los hombres, e infertilidad y abortos en las mujeres. Puede evolucionar a la forma crónica, la cual presenta complicaciones y puede comprometer cualquier órgano o tejido del cuerpo.

3.4. Métodos dependientes de cultivo y métodos moleculares en microbiología.

Los métodos dependientes de cultivo, se basan en el aislamiento de microorganismos y su identificación fenotípica. Estos métodos son fáciles de implementar y en general de bajo costo, pero muestran algunas limitaciones para algunos tipos de 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, y permite observar la sensibilidad ante diversos agentes antimicrobianos. 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 pueden no ser específicos.

Los métodos moleculares permiten disminuir algunas de las limitaciones de los métodos fenotípicos, 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. Las técnicas de biología molecular consisten en extraer y posteriormente analizar el ADN presente en la muestra. Dentro de las técnicas de análisis de ADN, la reacción de PCR es la de elección por su flexibilidad de adaptación y dentro de este tipo, la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real o qPCR por sus siglas en inglés (Bou et al, 2011) es de las más robustas y la que se empleó en este estudio.

3.5. PCR tiempo real (qPCR)

La técnica de PCR permite amplificar secuencias de ADN *in vitro*, por repetición de los pasos de desnaturalización, hibridación y de elongación a partir de cebadores específicos, con una ADN polimerasa. Esta técnica pudo implementarse extensivamente gracias al descubrimiento de la eubacteria termófila *Thermus aquaticus* (Tagu et al., 2006) de donde provienen los genes para la producción de la Taq polimerasa.

La técnica de la amplificación *in vitro* se basa en la repetición de tres procesos en cada ciclo de la reacción:

1. La desnaturalización de las dos cadenas de ADN a una temperatura elevada (cerca de 95°C) para producir moléculas de ADN monocatenarias.
2. La hibridación de cebadores oligonucleicos complementarios a las secuencias de los extremos de ADN a amplificar (para ello se baja la temperatura a valores normalmente comprendidos entre 40° y 65°, dependiendo de la T_m de los cebadores)
3. La reacción de elongación a partir de los cebadores usando un ADN polimerasa termoestable (para Taq polimerasa la temperatura óptima es de 72°C). Los productos de elongación se desnaturalizan de nuevo por calor y se repite el proceso, de manera que a cada ciclo el número de copias de ADN se duplica obteniéndose 2ⁿ moléculas después de "n" ciclos.

La PCR en tiempo real permite detectar durante la síntesis la aparición de los amplicones mediante la recolección continua de señales de fluorescencia emitidas durante la reacción de PCR a través del tiempo (Dorak, T., 2006). En este método, los procesos

de amplificación y detección se producen de manera simultánea, sin necesidad de realizar ninguna acción adicional, como elaboración y visualización en gel de electroforesis. Además, mediante la detección por fluorescencia se puede medir, durante la amplificación, la cantidad de ADN sintetizado en cada ciclo, (Biosystems, 2005).

La técnica de qPCR ofrece varias ventajas respecto del PCR punto final, entre ellas: amplificación y detección en un sistema integrado, no es necesario realizar una electroforesis después de realizar la reacción de PCR. Se trata de una reacción relativamente rápida, ya que se requiere aproximadamente 1:30 hora por 40 ciclos (Logan, et al, 2009).

3.6. Química TaqMan

Esta técnica de detección para PCR en tiempo real utiliza una sonda fluorogénica para detectar un producto de PCR específico a medida que se acumula durante el tiempo de reacción.

Su funcionamiento es de la manera siguiente, la Figura 3 ilustra el proceso (Applied Biosystems, 2005):

1. Se emplea una sonda de oligonucleótidos con un fluorocromo reportero emisor de energía unido al extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un apagador de energía en el extremo 3'. Mientras la sonda está intacta, la proximidad del apagador reduce enormemente la fluorescencia que emite el fluorocromo reportero ya que absorbe la energía liberada, esto debido a la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET; resonancia de Förster, Förster, V. T. 1948) a través del espacio.
2. La sonda hibrida con la secuencia de interés queda situada entre los cebadores específicos. La Taq polimerasa separa al fluorocromo reportero presente en la sonda, por su acción de 5' nucleasa permitiendo así la emisión de la señal fluorescente.
3. Esta hidrólisis de la sonda:
 - Separa el fluorocromo reportero del apagador, lo que aumenta la emisión del fluorocromo reportero al ser excitado.

– Separa la sonda de la cadena de ADN molde, lo que permite que la extensión de los cebadores continúe hasta el final de la cadena molde, de tal forma que la ausencia de la sonda hibridada permite la amplificación

4. En cada ciclo, se separan más moléculas de fluorocromo reportero de sus respectivas sondas, lo que produce un aumento de la intensidad de la fluorescencia que es proporcional a la cantidad de amplicón producido. Cuanto más alto sea el número inicial de copias del gen blanco, se observará un aumento significativo de la fluorescencia en ciclos más tempranos.

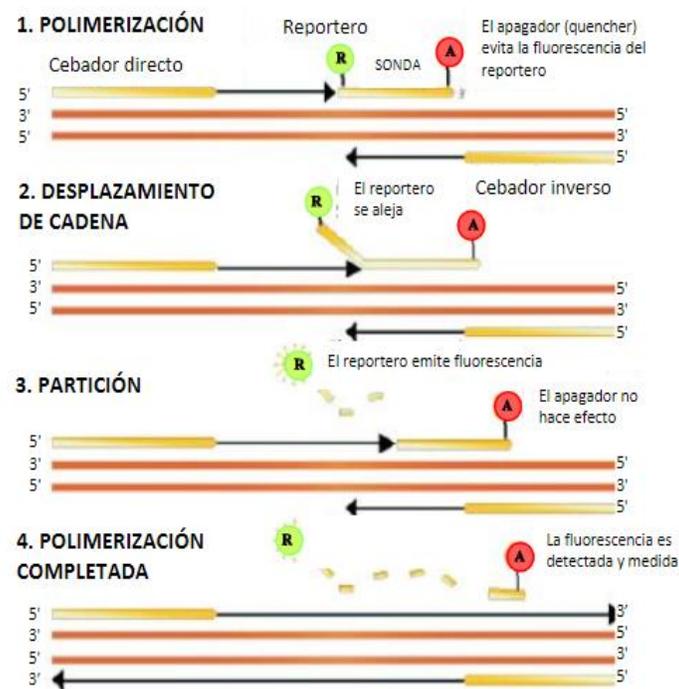


Figura 3: Representación de la química de Taqman. (Applied Biosystems, 2005)

Se utilizan 3 tipos de fluorocromos en el PCR tiempo real: el reportero o donador, el apagador o receptor y el de referencia (ROX). Éste último, es común en todas las reacciones realizadas, no interactúa con los componentes del ensayo y es utilizado para normalizar la señal en el software del equipo. En teoría, cualquier molécula fluorescente puede actuar como reportero en un ensayo de PCR tiempo real. El más utilizado es el 6-FAM (6-carboxifluoresceína), esta molécula es excitada eficientemente a 495 nm, tiene un máximo de emisión cerca de los 520 nm, además se ha utilizado comúnmente debido a que es fácilmente conjugada a los oligonucleótidos y emite una señal fuerte.

Otro de los fluorocromos utilizados como reportero es VIC™ que tiene un máximo de emisión cerca de los 555 nm. Los apagadores, pueden ser una molécula fluorescente o cualquier molécula que pueda absorber energía luminosa dentro del intervalo apropiado de longitud de onda. El apagador utilizado originalmente con el reportero 6-FAM es TAMRA (6-carboxi-tetrametil-rodamina). La molécula de referencia más utilizada es ROX (6-carboxy-X-rodamina) (Dorak, T.,2006).

3.7. Química SYBR Green I®

Dentro de la PCR en tiempo real también se puede utilizar la química de fluoróforo intercalante, el más usado es el de SYBR-Green®. El cuál emite fluorescencia a 520 nm, únicamente cuando está unido al ADN de doble cadena (Figura 4). Este sistema detecta la cantidad total de ADN de doble cadena, sin importar la secuencia, por lo que no es específico.

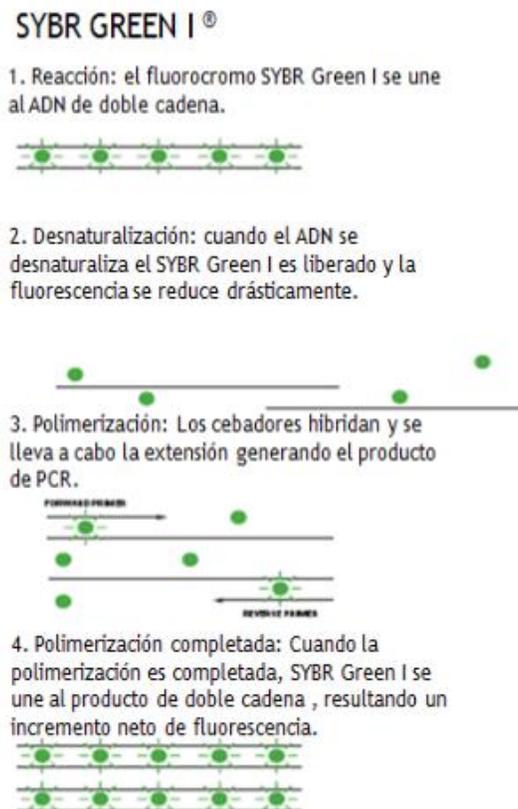


Figura 4: Representación de la química de SYBR Green I (Applied Biosystems, 2005)

3.8. Interpretación de PCR en tiempo real.

El resultado de una PCR en tiempo real se visualiza en un gráfico de amplificación (Figura 4). Donde el eje de abscisas indica el número de ciclos de la PCR y el eje de ordenadas la fluorescencia leída por el termociclador.

La curva de amplificación se constituye de una fase inicial en la cual la fluorescencia producida está por debajo del nivel de detección del termociclador. Una segunda fase donde se da un incremento exponencial de la fluorescencia y una tercera fase donde termina la reacción y permanece constante la fluorescencia (Biosystems A., 2005).

Para el análisis de resultados es necesario definir algunos parámetros:

- La línea base se encuentra en los ciclos iniciales donde solamente se detecta la fluorescencia basal ya que los cambios en la misma no son detectables (Figura 4).
- El umbral señala la zona de aumento exponencial, es decir, cuando el incremento de la fluorescencia es significativo, se representa en el gráfico con una recta horizontal (línea Threshold o Umbral). El umbral es definido por el software, sin embargo, puede ser modificado de manera manual, en todos los casos éste debe situarse en la zona exponencial de la segunda fase (Figura 4).
- Ct (Threshold Cycle). Es el punto de intersección de una curva de amplificación con el umbral. Este punto indica el ciclo en el que la fluorescencia alcanza el valor umbral (figura 4). Cuanto más ADN molde tenga la muestra, más rápido se alcanza este valor, pues será menor el número de ciclos necesarios (Ct menor) para alcanzar el umbral. Si la eficiencia de la reacción es óptima, cada vez que se diluye una muestra 10 veces el valor de Ct aumenta aproximadamente 3.3 ciclos (Biosystems A., 2005)

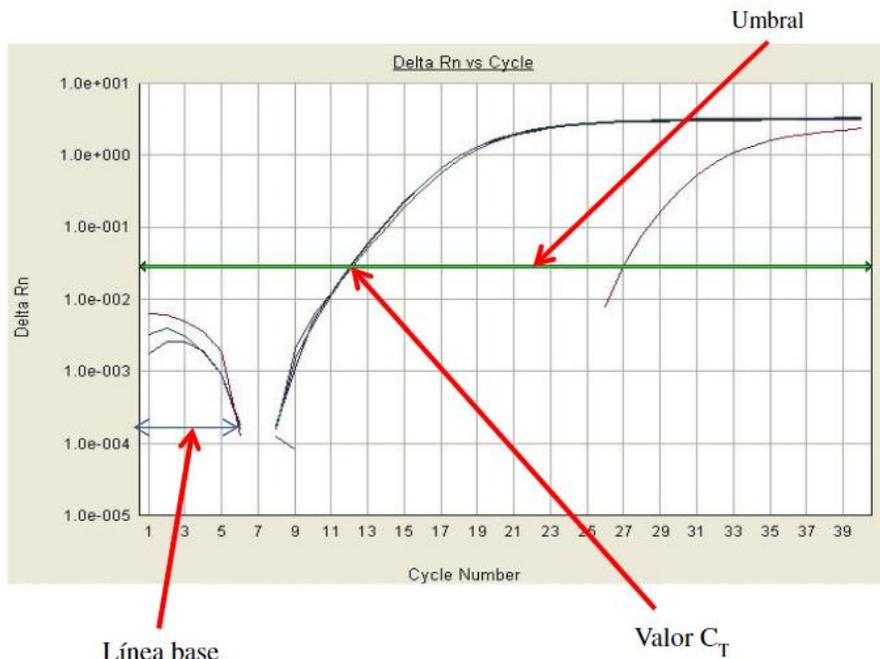


Figura 4. Gráfico de PCR en tiempo real.

3.9. PCR en alimentos

Los métodos dependientes de cultivo requieren de varios días o semanas para obtener resultados, además de que algunas características fenotípicas con las cuales la bacteria es comúnmente identificada no siempre se encuentran expresadas, por lo que dificulta su identificación (Rodríguez, L., 2012). Sin embargo, estos métodos siguen siendo utilizados debido a que son más económicos, no requieren equipos específicos o personal especializado en biología molecular.

La introducción del PCR en tiempo real brinda la oportunidad de una rápida detección de patógenos en alimentos, además de permitir el ahorro en tiempo de obtención de resultados, ofrece mayor sensibilidad, reproducibilidad, especificidad y la disminución de riesgos de contaminación entre las muestras durante la técnica (Fricker, et al, 2007). Entre las desventajas de los métodos moleculares se puede citar, en primer lugar, que requieren equipos y reactivos costosos, estas técnicas también son relativamente complicadas; necesitan personal con experticia en biología molecular, particularmente en lo relacionado al diseño de cebadores y sondas, y en la interpretación de los resultados. Otros factores que limitan la aplicación de PCR destaca la presencia de

sustancias que puedan ejercer un efecto inhibitorio sobre la reacción. Estos pueden actuar a diferentes niveles durante el proceso de extracción y amplificación y, en consecuencia, puede producir la subestimación de la carga bacteriana.

IV. Antecedentes inmediatos

En el 2021-2, Mario Méndez y Osiris Neri, realizaron la caracterización química y microbiológica de los quesos bola de Ocosingo que se utilizaron para el presente análisis, con la finalidad de analizar aspectos microbiológicos y caracterización fisicoquímica de este queso, dichos resultados se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados promedio del análisis químico proximal y caracterización fisicoquímica de la pasta de centro y la corteza de los quesos Bola de Ocosingo (Méndez, M., 2021 y Neri, O., 2022)

Característica	Centro (base húmeda)	Corteza (base húmeda)
Humedad (% m/m)	38.43	33.94
Proteína (% m/m)	23.80	43.04
Carbohidratos (% m/m)	1.73	4.96
Grasa (% m/m)	33.10	5.6
Cenizas (% m/m)	2.81	4.92
pH	3.95 – 5.25	5.62 – 5.74
Acidez (% Ácido láctico)	0.10 – 0.11	0.20 – 0.23
a _w	0.92 – 0.95	0.909 – 0.911

En el centro del queso hay condiciones adecuadas para que la fermentación sea posible, al tener microorganismos capaces de metabolizar la lactosa y requerir valores de a_w altos, como las bacterias ácido lácticas.

La a_w es el parámetro que se define como la cantidad de agua disponible en alimentos, para llevar a cabo reacciones químicas y bioquímicas. Los valores reportados en las muestras van de 0.92 a 0.95, indicando que hay disponibilidad de agua alta, lo que favorece el crecimiento de algunos microorganismos patógenos como *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *Salmonella enterica*. Productores como “La maya”, “Queso Bola de Ocosingo” y “Dorados de la Selva” muestran altos valores de a_w y un intervalo de pH óptimo para el crecimiento de microorganismos indeseables, por tal motivo es indispensable descartar su presencia.

De igual manera, podemos observar en la tabla anterior que los valores de a_w son menores en la corteza que en el centro, esto se debe a que se encuentra más expuesta al medio ambiente además del proceso de secado al que se somete. Es relevante mencionar que los valores de a_w son favorables para la correcta conservación del queso, ya que la función de la corteza es actuar como envase para el centro doble crema. Al reportar valores de a_w menores a 0.92 se sugiere que el crecimiento de microorganismos es poco probable, resultando efectiva la protección al queso interior.

En cuanto al análisis químico composicional se puede observar que el contenido de grasa en la corteza es menor que en el centro, ya que se obtiene de la leche descremada. Por otra parte, el contenido de cenizas está estrechamente relacionado a la cantidad de cloruro de sodio que se utiliza en el proceso de salado, debido a que es el que se añade con mayor concentración. No obstante, también considera los minerales provenientes de la leche como los fosfatos, calcio, magnesio entre otros. Se puede notar que la corteza contiene mayor cantidad de cenizas que el centro, puesto que la proporción de los minerales que quedan en el queso, sobre todo el calcio, es más baja cuanto mayor acidez haya en la pasta ya que, en el proceso de elaboración, el centro se deja acidificar más tiempo que la corteza.

Respecto al análisis microbiológico de dichos estudios, se observó en la Tabla 7 que la cuenta de mesófilos aerobios resultó ser muy alta y que de acuerdo con los parámetros

establecidos con la NOM-243-SSA1-2010 la cuenta de levaduras supera el límite permitido, siendo de 500 UFC/g. Sin embargo, hay que considerar que dicha Norma es para quesos que han sido elaborados a partir de leche pasteurizada. Actualmente, la legislación mexicana no cuenta con parámetro de calidad para quesos elaborados con leche no pasteurizada, por lo que la norma solo se aplicará como referencia. La carga microbiana tan alta se debe a la utilización de leche cruda y posiblemente a las condiciones en las que el queso es elaborado.

Tabla 7. Resultados microbiológicos de los 8 productores analizados, de Queso Bola de Ocosingo (Méndez, M., 2021 y Neri, O., 2022)

DETERMINACIÓN				
Muestra de queso	Mesófilos aerobio (UFC/g)	Mohos (UFC/g)	Levaduras (UFC/g)	Coliformes totales (UFC/g)
Laltic	70×10 ⁴	<10	23×10 ⁵	<10
Regional	67×10 ⁴	<10	14×10 ⁶	<10
La Peña	10×10 ⁴	<10	85×10 ³	1.5×10 ³
Queshill	43×10 ⁴	<10	40×10 ⁵	<10
La Maya	22×10 ⁵	<10	75×10 ³	<10
Santa Rosa	24×10 ⁵	<10	14×10 ⁵	<10
Queso Ocosingo	63×10 ⁶	<10	70×10 ³	<10
Dorados de la Selva	16×10 ⁶	<10	24×10 ⁴	<10
NOM-243-SSA1-2010	--	500	500	≤100

En el 2019, Camacho Mata realizó el aislamiento de algunas BAL las cuales se identificaron por secuenciación del ADNr 16S completo. Las seis cepas aisladas del queso se identificaron como *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus paracasei* (a partir de 2020, *Lactobacillus plantarum* se reclasificó como *Lactiplantibacillus plantarum* y

Lactobacillus paracasei como *Lacticaseibacillus paracasei* (Zheng et al., 2020)), ambos reportados en quesos (Licitra & Carpino, 2014).

Estos antecedentes, utilizando métodos tradicionales, indican la presencia de una carga alta de microorganismos, sin embargo, no se buscó la presencia de microorganismos patógenos como *Brucella spp*, *Listeria monocytogenes* o *Salmonella enterica*, por mencionar algunos, u otras bacterias ácido lácticas que pudieran estar presente en el producto. Por lo que, en el 2022, Ingrid Hernández realizó un análisis del metagenoma bacteriano del queso bola de Ocosingo, con la finalidad de conocer la diversidad bacteriana que se encontraba en el queso. Se encontró que la comunidad bacteriana del queso bola de Ocosingo está conformada mayoritariamente por *Firmicutes* y una proporción importante de *Proteobacterias*. El género dominante, con más del 60% de abundancia, es *Streptococcus*, bacteria láctica acidófila. (Hernández, I., 2022)

Además de las bacterias que con anterioridad se encontraron en mayor cantidad, se muestran en la Tabla 8 los géneros que serán analizados en el presente proyecto con su respectivo porcentaje de abundancia relativa, tal como lo reportó en su momento Hernández I. Cabe menciona que el análisis realizado no indica que se trata específicamente de especie patógenas, pues Hernández solo realizó la identificación hasta el género.

Tabla 8. Porcentaje de abundancia relativa de cada género respecto al 100% encontrados en el Queso Bola de Ocosingo mediante el análisis del metagenoma bacteriano (Hernández, I., 2022)

Género	Porcentaje de abundancia relativa (%)
<i>Escherichia</i>	1.14
<i>Listeria</i>	0.04
<i>Salmonella</i>	0.12
<i>Staphylococcus</i>	0.012
<i>Brucella</i>	0.001

V. Justificación

Debido a que la materia prima utilizada en el queso de Ocosingo es leche cruda y, a pesar de que el queso es sometido a un proceso de maduración de 21 días como mínimo, surge la necesidad de determinar la presencia de 1 microorganismos que puedan poner en riesgo la salud de quien lo consume.

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

El alcance de este proyecto involucra la evaluación de quesos representativos de ocho productores diferentes de la región, por lo que es de mucha utilidad contar con una metodología que permita el análisis de un gran número de muestras en poco tiempo.

VI. Hipótesis

Si se partió de leche de ganado sano, se dejó madurar la pasta del núcleo del queso y se llevaron a cabo buenas prácticas higiénicas, no deberían encontrarse bacterias patógenas. Sin embargo, si las condiciones de elaboración del producto no fueron higiénicas y el a_w es alto (debido al poco tiempo de maduración), podría haber presencia de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* o *Salmonella enterica*,

VII. Objetivos

7.1. Objetivo General

Determinar la presencia de *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* EHEC (O:157), *E. coli* ETEC (cepas enteropatógenas), *Listeria monocytogenes* y *Brucella abortus* en muestras representativas de quesos de ocho productores diferentes colectados del municipio de Ocosingo, Chiapas, mediante PCR en tiempo real, utilizando la química Taq Man®.

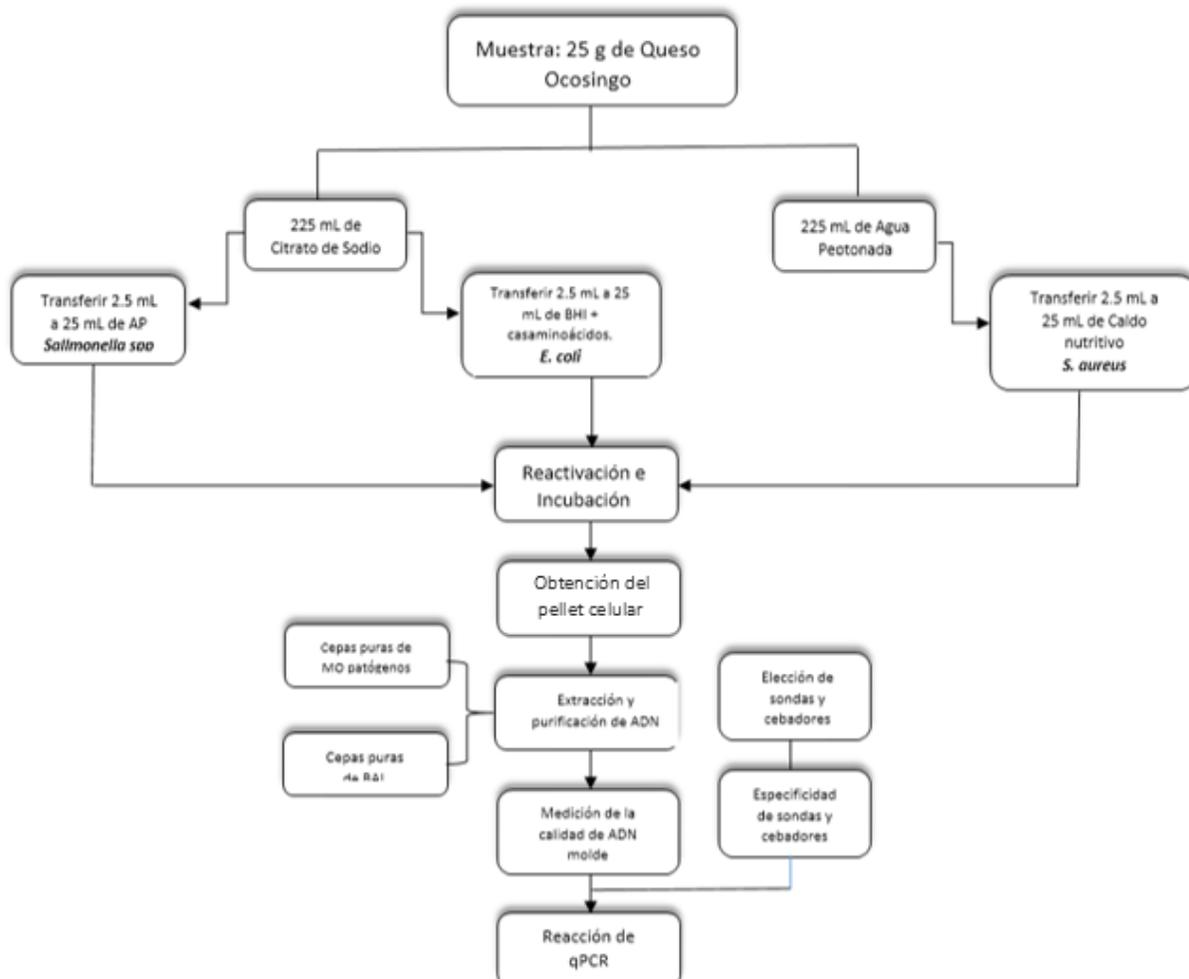
7.2. Objetivos Particulares

- Implementar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) tiempo real, para determinar la presencia de los siguientes microorganismos patógenos en muestras de queso Bola de Ocosingo; *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* EHEC (O:157), *E. coli* ETEC (cepas enteropatógenas), *Listeria monocytogenes* y *Brucella abortus*.

- Verificar la especificidad de cebadores y sondas con cepas puras de otras bacterias diferentes a los géneros de estudio.
- Analizar 16 muestras de Queso Bola, por medio de la técnica de PCR en tiempo real.

VIII. Metodología

8.1. Diagrama de Bloques



8.2. Procesamiento de muestras de Queso bola de Ocosingo

El procesamiento de las unidades de muestreo de queso bola de Ocosingo, que incluye el enriquecimiento en medios y condiciones específicas para cada bacteria, fue realizado por Mariana Sánchez Araiza durante su proyecto de Estancia Estudiantil en el semestre 2020-2.

Debido a el confinamiento inicial durante la pandemia, Mariana Sánchez solamente realizó el paso de enriquecimiento. Se recuperaron los botones celulares por centrifugación y posteriormente se guardaron a -20°C. El presente trabajo partió de la lisis celular de estos botones. A continuación, se describe el procedimiento realizado por Sánchez en 2020.

Se analizaron ocho productores de queso bola de Ocosingo (“Queso Ocosingo”, “Laltic”, “La Maya”, “La Peña”, “Regional”, “Dorados de la Selva”, “Queshill” y “Santa Rosa”) de cada uno se analizaron dos piezas (análisis por duplicado), se realizó un análisis visual de cada muestra al momento de recepción, así como al momento del procesamiento, realizándose un registro de las muestras con características inusuales y materia extraña presente.

El procesamiento se realizó en zona aséptica (campana de flujo laminar). La muestra se cortó, se le retiró la corteza con un cuchillo de uso exclusivo para retirar la corteza y se separó de la zona interna del queso, la corteza se desechó. Posteriormente se cortó con un cuchillo diferente la parte interna en fragmentos y se disminuyó el tamaño de partícula en un procesador de alimentos (Oster), con lo que se homogenizó la muestra. Finalmente, la muestra ya procesada se guardó en bolsas de 25 g y se almacenaron a -70°C (Revco).

8.3. Recuperación del paquete celular a partir del queso Bola de Ocosingo

Se descongelaron las bolsas que contenían 25 g de la unidad de ensayo a analizar en las siguientes condiciones: 4–8°C por 18 horas y no más de 24 horas, según lo marcado la NOM-110-SSA1-1994, el contenido de las unidades de ensayo se introdujo en bolsas para Stomacher. Para el análisis de *E. coli*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes* se agregaron 225 mL de citrato de sodio al 2%, pH 8; mientras que para el análisis de *S.aureus* y *Brucella spp* se agregaron 225 mL de agua peptonada, pH 7. En ambos casos se agregó 1 mL de neutrasas (NovoDisk) para facilitar la degradación del queso y ayudar a la separación de la grasa y se incubó por 1 hora a 45°C.

Pasado el tiempo de incubación, se homogenizó cada bolsa por 5 minutos a velocidad alta en el Stomacher (Seward 400 circulator). Del contenido de la bolsa, se traspasaron 30–40 mL a tubos Falcon estériles de 50 mL, teniendo especial cuidado en que la menor cantidad de grasa posible fuera transferida al tubo, dichos tubos fueron centrifugados

posteriormente a 10000 xg a una temperatura de 4°C por 10 minutos, se realizó dicho procedimiento por duplicado. Después se tomaron 2.5 mL de la fase intermedia para inocular los medios de cultivo necesarios para el crecimiento de cada microorganismo de interés de acuerdo con la Tabla 9.

Posteriormente, los medios se inactivaron por calor, se obtuvieron los pellets por medio de centrifugación y se lavaron con solución salina. Los paquetes celulares se conservaron a -20°C para su posterior extracción de ADN mediante el kit Mericon.

8.4. Material biológico

Los microorganismos utilizados como referencia para este proyecto fueron obtenidas de diversos lugares. Las cepas de *S. aureus*, *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *L. fermentum* y *L. paracasei* pertenecen a la colección de microorganismos del laboratorio 312 de la Facultad de Química, UNAM. Por otro lado, *E. coli* ETEC fue donada por el Dr. Armando Navarro Ocaña del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina, UNAM. Tanto *E.coli* O157:H7, como *Brucella abortus* fueron obtenidas del cepario de la Facultad de Química-UNAM. Estos microorganismos fueron cultivados en los medios y condiciones óptimas como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Microorganismos utilizados para el análisis y condiciones de enriquecimiento.

Microorganismo	Medio de Cultivo	Condiciones	Referencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	Caldo nutritivo	37 °C, 48 h, 250 rpm	Salto, B.I. (2013)
<i>Salmonella spp</i>	Agua peptonada	37 °C, 24 h, 250 rpm	Hernández, A. I. (2012)
<i>E. coli</i>	BHI+casaminoácidos (2%)	37 °C, 24 h, estático	Mejía, E.H. (2013)
<i>Brucella abortus</i>	Caldo Brucella + anfotericina B (1 µg/ml) y vancomicina (20 µg/ml)	37 °C, 1 semana, estático	Torres, F. (2013)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Caldo Fraser	37 °C, 48 h, 250 rpm	Becerra, M.A. (2013)
<i>Lactiseibacillus paracasei</i>	Medio MRS	37 °C, 16 h, 250 rpm	Becerra, M.A. (2013)
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Medio MRS	37 °C, 16 h, 250 rpm	Becerra, M.A. (2013)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Medio MRS	37 °C, 16 h, 250 rpm	Becerra, M.A. (2013)
<i>Enterococcus faecium</i>	Medio MRS	37 °C, 16 h, 250 rpm	Urrieta, J. (2018)

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

Una vez transcurrido el tiempo de incubación de cada microorganismo, se llevó a cabo la inactivación por calor y la obtención del paquete celular. Se realizó una inactivación por calor a 80°C, 20 min, posteriormente se centrifugó en una centrifuga Beckman (rotor JA-20) a 8000 rpm a 4°C por 10 min, luego el pellet celular se resuspendió en 1 mL de solución salina estéril al 0.85% y pH 7, se transfirió a un tubo de microcentrífuga, el cual se centrifugó a 14000 rpm a 4°C durante 15 min. en una centrífuga de mesa Beckman. Finalmente se eliminó el sobrenadante por decantación; el paquete celular se conservó a -20°C hasta la posterior extracción de ADN.

8.6. Extracción y cuantificación de ADN

Se empleó un kit comercial de extracción y purificación de ADN Mericon Food (QIAGEN), basado en la ruptura celular con detergentes iónicos y con enzimas (lisozima 10 µg/mL y proteinasa K 20 µg/mL). La purificación se da por adsorción del ADN a una membrana de sílica, además de realizan lavados para eliminar sustancias que puedan inhibir la reacción de PCR, por ejemplo: proteínas. Posteriormente, el ADN se eluye con buffer EB (QIAGEN, 2010).

Para la cuantificación de ADN obtenido se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Scientific) en formato nanogota en el cual se midió la absorbancia 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 su pureza. Una vez determinada la concentración de ADN, las muestras se almacenaron en congelación (-20°C).

8.7. Secuencias de Sondas y Cebadores

Los cebadores y sondas que se emplearon corresponden a los genes que se muestran en la Tabla 10. Los reactivos se mandaron a sintetizar en la empresa Integrated DNA Technologies™.

Tabla 10. Genes encontrados en la bibliografía para la elección de sondas y cebadores para *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella abortus*, *E. coli* EHEC (O:157), *E. coli* ETEC.

Microorganismo	Gen blanco	Secuencia cebadores 5' – 3'	Secuencia Sonda 5' – 3'	Observaciones / Referencia
<i>Salmonella enterica</i>	<i>invA</i> (proteína de invasión de células del epitelio intestinal)	Dir-ACCGTGGTCCAGTTTATCGTTATT Inv-GGGCATACCATCCAGAGAAAATCG	FAM-TCCGCGACACGTTCTG	Síntesis ex profeso. ABI Custom TaqMan Gene Expression Assay. Gen reportado por Malorny B. <i>et al.</i> (2007)
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>nucA</i> (termonucleasa)	Dir-CCTGAAGCAAGTGCATTTACGAAAA Inv-CGCTAAGCCACGTCCATATTTATCA	FAM-CTCGACTTCAATTTTC	Síntesis ex profeso. ABI Custom TaqMan Gene Expression Assay. Gen reportado por Ruiz-Perez <i>et al.</i> (2005)
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>hly</i> (listeriolisina)	Dir- AAGGTGCTACTTTTAACCGGAAAA Inv- CATTGTCTTTTAAGAAGTTTGTTGTATAGG CA	FAM-CACCAGGAGTTCCC	Síntesis ex profeso. ABI Custom TaqMan Gene Expression Assay. Gen reportado por Kim J. <i>et al.</i> (2006)
<i>Brucella</i> spp.	<i>per</i> (perosamina sintetasa)	Dir- GTTTAGTTTCTTTGGGAACAAGACAA Inv-GAGGATTGCGCTAGCA	FAM-TACGACCGGTGAAGCGGGATG	Se sintetizarán cebadores y sonda de acuerdo a lo reportado por Bounaadja L. <i>et al.</i> (2009)
<i>Escherichia coli</i> ETEC	<i>eltBI</i> (toxina termolábil subunidad A)	Dir- GAGTACTTCGATAGAGGAACTCAAATGAA T Inv- TCATCATATCTGACAAAGCCGGTTT	FAM-CCTCTCGCGTGATCAT	Síntesis ex profeso. ABI Custom TaqMan Gene Expression Assay. Gen reportado por Nada R.A. <i>et al.</i> (2010)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>eae</i> (intimina)	Dir- CATTGATCAGGATTTTTCTGGTGATA Inv- CTCATGCGGAAATAGCCGTTA	VIC- ATAGTCTCGCCAGTATTCGCCACC AATACC	Se sintetizarán cebadores y sonda de acuerdo a lo reportado por la European Food Safety Authority (2009)

8.8. Especificidad de sondas y cebadores

Se realizó por sexto triplicado la reacción de qPCR utilizando como molde el ADN de las cepas de referencia, tanto de bacterias patógenas, como de otras comúnmente presentes en el queso bola de Ocosingo, utilizando las sondas y cebadores para los genes blanco que se indican en la Tabla 10.

8.9. PCR punto final.

Se llevó a cabo esta reacción para amplificar la región V3 del gen ribosomal 16s utilizando los cebadores reportados por Ercolini, D., (2004), cuyas secuencias se muestran en la Tabla 11.

Una vez cuantificado el ADN se realizan los cálculos para tener una concentración final de 100 ng en cada tubo de reacción. La reacción se lleva a cabo en un volumen total de 50 µL en el termociclador ABI 7500 de Applied Biosystems, las concentraciones de reactivos y condiciones utilizadas para esta reacción, se encuentran en la Tabla 12 y 13 respectivamente.

Tabla 11. Secuencia de cebadores de la región V3 del gen ribosomal 16s utilizadas para PCR punto final.

Cebador	Secuencia 5'→ 3'	Posición
338 dir	ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG	338-357
518 rev	ATT ACC GCG GCT GCT GG	518-534

Los componentes de reacción se muestran en la Tabla 12.

Mezcla de reacción: 50µL.

Tabla 12. Concentración de reactivos para la reacción de PCR punto final.

Reactivo	C_{inicial}	C_{final}	Vol. p/1 reacción (µL)
Agua grado Biología Molecular	---	---	28.41
10X Buffer (TAE)	10X	1X	5
Cebador Forward	10 µM	300 nM	1.5
Cebador Reverse	10 µM	300 nM	1.5
dNTPs	10 mM	0.2 mM	1
Enzima	2.5 U/µL	1U	0.4
ADN	20 ng/µL	100 ng	12.19
Volumen total de reacción			50

Los tubos de reacción se llenaron con las cantidades indicadas y se corrieron los ciclos mostrados en la tabla 13.

Tabla 13. Condiciones de reacción del PCR punto final

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

Desnaturalización inicial	94 °C	5 m
Calentamiento inicial	Desactivado	

Loop 1			
		Temperatura (°C)	Tiempo (min)
30 ciclos	Desnaturalización	94.0 °C	1 min 00 s
	Acoplamiento	65.0 °C	1 min 00 s
	Extensión	72.0 °C	3 min 00 s

Loop 2			
		Temperatura (°C)	Tiempo (min)
10 ciclos	Desnaturalización	94.0	1
	Acoplamiento	55.0	1
	Extensión	72.0	3

Extensión final	72.0 °C	10 min
Temperatura de conservación final	4 °C	Indefinido

8.10. Evaluación de la calidad amplificable del ADN molde.

Se determinó la calidad amplificable de ADN obtenido a través de la electroforesis realizada durante 40 minutos a 90 V de los amplicones de la región V3 del gen 16s ADNr obtenidos a partir de la reacción de PCR punto final, en gel de agarosa al 2%. El gel se tiñó con bromuro de etidio 0.5 µg/ml. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron: GeneRuler DNA y NZYDNA Ladder VI, Batch 108081 (Mejía, E., 2013).

8.11. Análisis de unidades de ensayo

Después de realizar los procedimientos descritos en los puntos 7.2, 7.3, 7.5 y 7.6, se llevó a cabo el análisis de 80 muestras: dos extracciones independientes, y cada extracción por duplicado, mediante la técnica de PCR tiempo real, el llenado de las placas se realizaron en la Campana de PCR Purifer PCR *Enclosure* Modelo 3740002.

Las condiciones de ciclado para la qPCR del análisis de *Salmonella spp*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella abortus*, *E.coli ETEC* y *E. coli O157:H7*, fueron las señaladas por Life Technologies para el equipo Applied Biosystems 7500, con un volumen total de reacción de 20µL, las cuales se describen en la Tabla 14.

Tabla 14. Condiciones de amplificación para PCR tiempo real (Termociclador Applied Biosystems 7500).

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

Tabla 15. Ejemplo de mezcla de reacción para los genes específicos: *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella abortus*, *E. coli ETEC*, *E coli O157:H7* en PCR tiempo real.

Reactivo	Conc. inicial	Conc. final	Volumen a adicionar
1. Agua grado biología molecular	--	--	6.08
2. Buffer y enzima	2X	1x	10
3. Cebador F	100µM	300nM	0.6
4. Cebador R	100µM	300nM	0.6
5. Fluoroforo	100µM	180nM	0.72
6. -ADN	--	--	2
Volumen Final			20µL

IX. Resultados y Discusión

Los resultados y su análisis se presentan en dos partes: La primera etapa consiste en la prueba de especificidad de las sondas y cebadores, y la confirmación de que el método de extracción de ADN es el conveniente para la obtención de ADN de calidad amplificable.

La segunda etapa consiste en el análisis de las 16 muestras de Queso Bola de Ocosingo de los 8 productores diferentes.

9.1. Evaluación de la calidad de ADN.

Se realizó la evaluación de la pureza del ADN extraído de cepas puras y de los paquetes celulares obtenidos después del paso de enriquecimiento para cada bacteria patógena para evitar resultados falsos negativos, los cuales se pueden dar por no haber obtenido

un ADN de calidad amplificable o por interferencias causadas por inhibidores presentes en la matriz o el método de extracción.

Esto se determinó midiendo la relación A_{260}/A_{280} , se considera que un ADN de pureza óptima tiene un valor entre 1.8-2.0, también se determinó la concentración de ADN con el valor de absorbancia a 260 nm. Los resultados se muestran en la Tabla 16, y los resultados completos se encuentran en el anexo A

Tabla 16. Concentraciones promedio de ADN de *Salmonella spp* (Cepa de referencia) y muestras de Queso bola, después del enriquecimiento.

Unidad de ensayo	Concentración promedio de las extracciones (ng/μL)	Relación A_{260}/A_{280} promedio de las extracciones
<i>Salmonella enterica</i>, referencia.	285.85	1.84
<i>S. aureus</i>, referencia.	30.70	1.99
<i>Listeria monocytogenes</i>, referencia.	25.45	1.99
<i>Brucella abortus</i>, referencia.	83.45	1.94
<i>E. coli</i> ETEC, referencia.	293.45	1.88
<i>E. coli</i> O157:H7, referencia	181.45	1.92
6 Quesos al azar para <i>Salmonella enterica</i>	9.82	1.85
6 Quesos al azar para <i>S. aureus</i>	17.31	1.87
6 Quesos al azar para <i>L. monocytogenes</i>	21.73	1.79
6 Quesos al azar para <i>Brucella abortus</i>	21.30	1.81
6 Quesos al azar para <i>E. Coli</i> ETEC y O157:H7	34.31	1.79

Los resultados de las Tabla 16 sugieren que el método de extracción utilizado es adecuado para obtener ADN en cantidad y pureza requeridas, la relación A_{260}/A_{280} indica que el ADN obtenido no está contaminado con proteínas.

Observando las tablas 26, 27, 28 20 y 30 la cuales se encuentran en el anexo A, se identificaron algunas muestras como, por ejemplo:21, 26, 37, 40, 44, 53, 87,105 y 121, por mencionar algunas, cuya concentración y pureza del ADN extraído del enriquecimiento a partir de queso de Ocosingo, son bajos, esto se puede deber a una posible contaminación del material genético por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas, obteniendo así una absorbancia A_{280}/A_{260} menor a 1.80. Para saber si el ADN tenía calidad amplificable, se realizó la técnica de PCR en punto final, de algunas de las muestras que tuvieron un valor de $A_{260}/A_{280} < 1.80$ elegidas al azar.

Se amplificó la región V3 del gen ribosomal 16S del queso bola de Ocosingo elegidas al azar y de algunas cepas puras utilizadas en este estudio (*Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella abortus*, *E. coli* EHEC (O:157), *E. coli* ETEC). Se seleccionó dicho blanco de amplificación, debido a que esta región del genoma es altamente conservada en bacterias, y funciona como un excelente control de extracción, para poder determinar si se obtuvo ADN de calidad amplificable. De este experimento se obtuvieron los resultados de las Figuras 5 y 6.

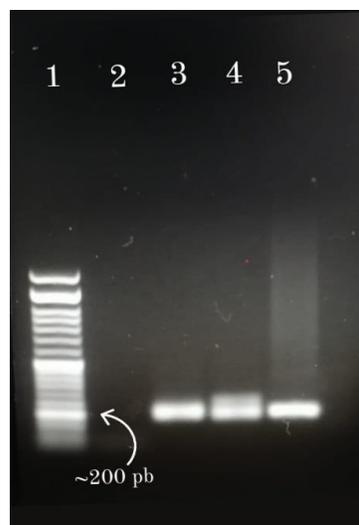


Figura 5. Amplificación de la región V3 del gen ribosomal 16S en el gel agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Carriles:

1: NZYDNA Ladder VI.

2: Control negativo (NTC).

3 y 4: Amplicones obtenidos del ADN de las unidades de ensayo del productor Laltic (muestra 21) y La Maya (muestra 53) respectivamente.

5: Control positivo, cepa pura *Salmonella enterica*.



Figura 6. Amplificación de la región V3 del gen ribosomal 16S en el gel agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Carriles:

1; GeneRuler DNA 2: Control negativo (NTC).

3,4 y 5: Amplicones obtenidos del ADN de las unidades de ensayo del productor Santa Rosa (muestra 26), Laltic (muestra 44) y Queshill (muestra 90) respectivamente.

6: Control positivo, cepa pura *S.aureus*.

7: Control positivo, cepa pura *E. coli ETEC*.

8: Control positivo, cepa pura *E.coli O:157:H7*.

Los geles de agarosa de la Figura 5 y 6, indican que sí se extrajo ADN de calidad amplificable a partir del paso de enriquecimiento de las unidades de Queso bola de Ocosingo. Ya que en todos los casos se obtuvo un amplicón de aprox. 200 pb. Cabe

aclarar que este resultado no indica la presencia de dicha bacteria patógena, sino que demuestra que se cuenta con ADN proveniente de bacterias, el cual podrá servir para la detección específica por PCR en tiempo real de los microorganismos patógenos en muestras representativas de quesos de ocho productores.

9.2. Validación de la especificidad método.

Con este experimento se buscó validar el método y corroborar la especificidad tanto de sondas como de cebadores para los genes blanco elegidos probándolos contra ADN de diferentes microorganismos patógenos y no patógenos. Los microorganismos no patógenos utilizados fueron *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lactocaseibacillus paracasei*, *Lactobacillus fermentum*, se incluyeron en la validación ya que forman parte de la microbiota natural del queso. Se incluyeron estos controles negativos para corroborar que en caso de tener ADN de estas bacterias en la reacción de qPCR éste no interferiría o generaría alguna señal de amplificación, debido a que no cuentan con los genes blanco que sí contienen los microorganismos patógenos y cuya presencia es única en ellos.

En la tabla 17, se muestran los ciclos umbral (Ct) promedio de los controles positivos: *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella abortus*, *Escherichia coli* ETEC y *Escherichia coli* O157:H7 (ADN de las cepas puras) utilizados en el análisis por qPCR, los cuales también fungieron como control negativo junto con las bacterias ácido lácticas ya mencionadas en este experimento. En la primera columna se muestran las bacterias elegidas control positivo para cada corrida, con su respectivo gen blanco, mientras que en la primera fila se observan los microorganismos analizados con el mismo gen blanco.

Tabla 17. Ciclos umbral (Ct) promedio de los controles positivos para la corroboración de la especificidad de sondas y cebadores de cada microorganismo patógeno.

		Ct del amplicón obtenido								
Cebadores Sonda	<i>Salmonella enterica</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Brucella spp</i>	<i>E. coli</i> ETEC	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>Salmonella enterica (invA)</i>	12.32	> 39	NA	> 36	> 36	> 35	> 34	> 33	> 36	> 35
<i>S. aureus (nucA)</i>	> 38	14.51	> 39	> 37	> 36	> 39	> 36	> 37	> 39	> 37
<i>L. monocytogenes (hly)</i>	> 38	NA	13.97	NA	NA	NA	NA	> 39	NA	> 37
<i>Brucella spp (per)</i>	NA	NA	NA	12.47	> 37	> 38	NA	NA	NA	NA
<i>E. coli</i> ETEC (<i>e/txB1</i>)	> 37	NA	NA	> 36	11.71	> 29	> 33	> 35	> 36	> 37
<i>E. coli</i> O157:H7 (<i>eae</i>)	NA	NA	NA	> 36	> 31	12.12	> 32	> 35	> 36	> 37
NA: No hubo amplificación.										

Los resultados de la tabla anterior sugieren que todos los cebadores y sondas son específicos para cada microorganismo patógeno, ya que no se obtuvo un valor de ciclo umbral cercano al obtenido del control positivo analizado en cada corrida.

9.3. Efecto de la concentración de ADN molde

Debido a que en algunos casos la concentración de ADN obtenido a partir del enriquecimiento era menor a 10 ng/μL y no se podría alcanzar los 100 ng por reacción, se evaluó el Ct que se obtendría al utilizar 10 ng en la reacción.

En las figuras 7, 8, 9, 10, 11 y 12, se muestran los gráficos de amplificación mediante la técnica PCR tiempo real, de las cepas control de este estudio y en la tabla 19 los valores de Ct correspondientes. Con base a la literatura sabemos que cuanto mayor sea el número de copias blanco en la muestra se alcanzará la cantidad de fluorescencia en el valor umbral más rápidamente, el valor de C_T obtenido será menor. Si la eficiencia de la reacción es óptima, cada vez que se diluye una muestra 10 veces el valor de C_T aumenta aproximadamente 3.3 ciclos (Dorak, T., 2006).

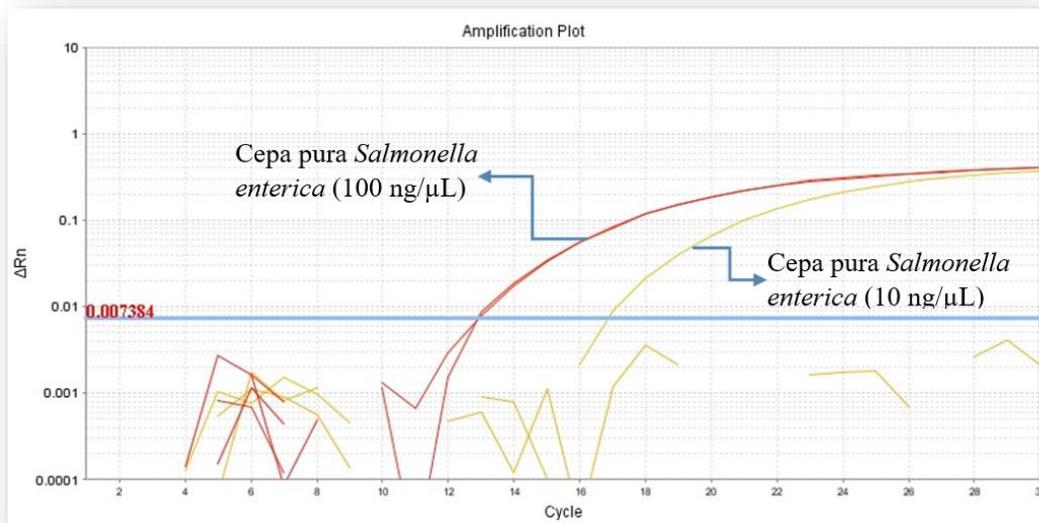


Figura 7: Amplificación por qPCR con ADN de *Salmonella enterica*.

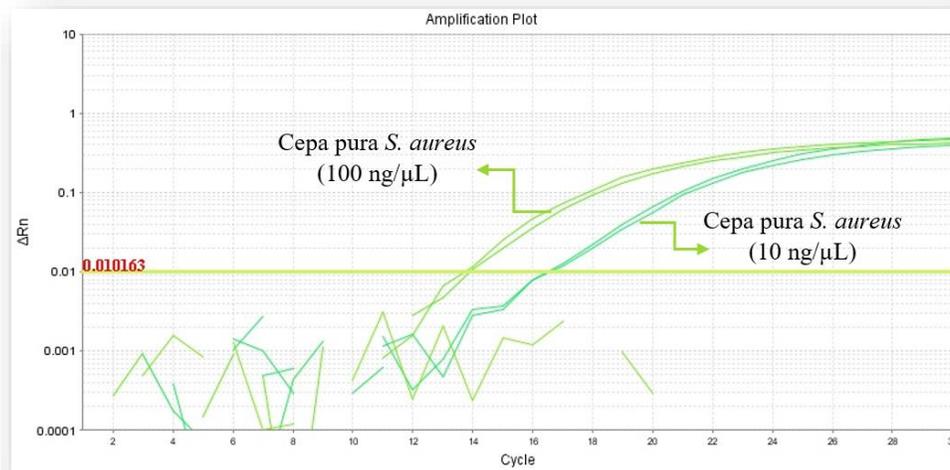


Figura 8: Amplificación por qPCR con ADN de *S. aureus*.

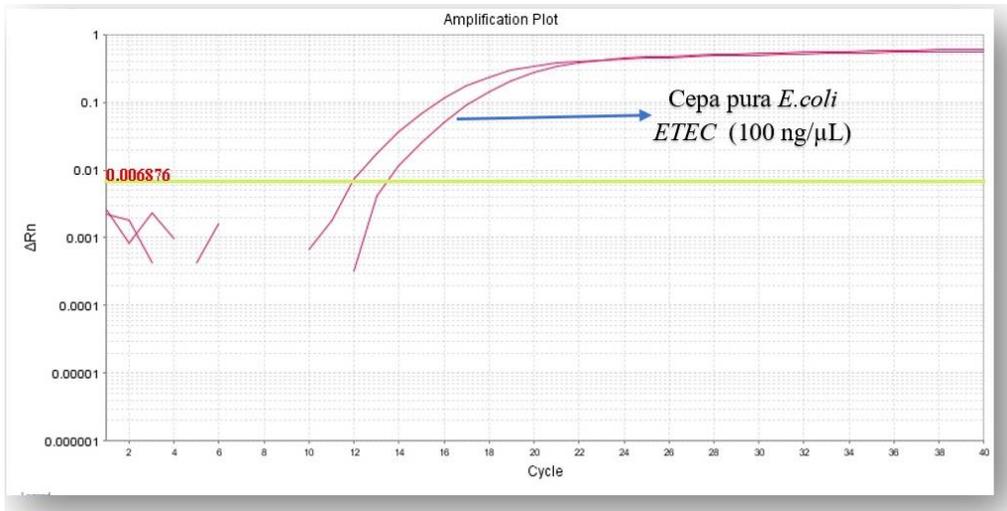


Figura 9: Amplificación por qPCR con ADN de *E.coli* *ETEC*

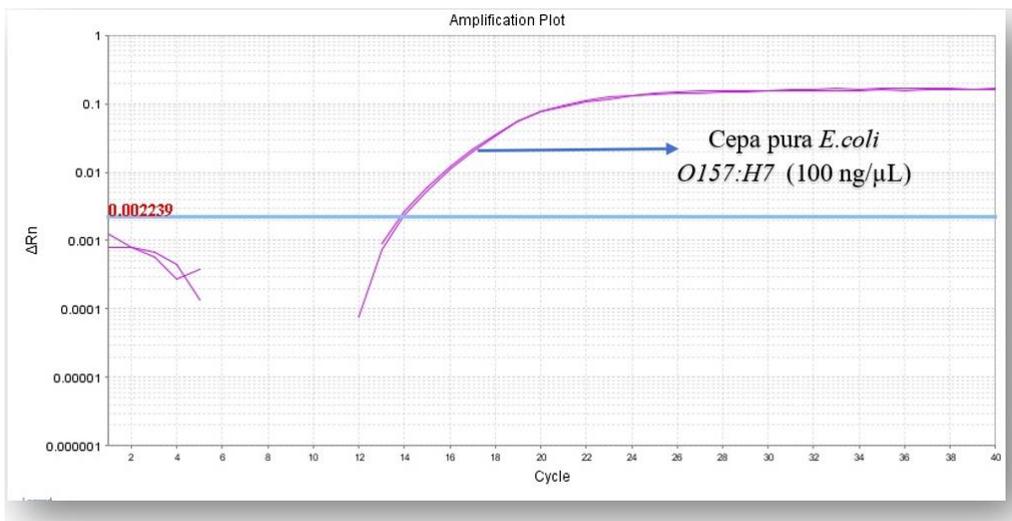


Figura 10: Amplificación por qPCR con ADN de *E.coli* *O157:H7*.

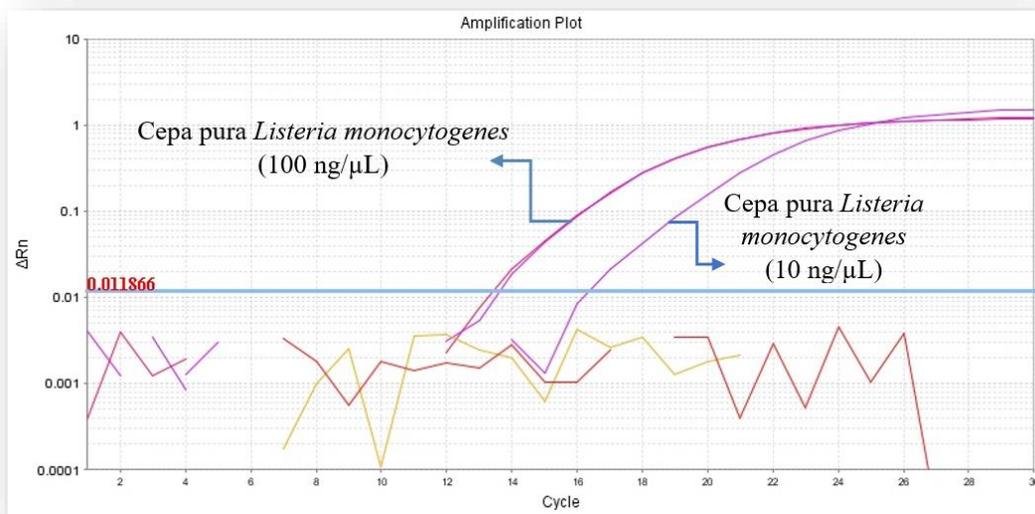


Figura 11: Amplificación por qPCR con ADN de *Listeria monocytogenes*.

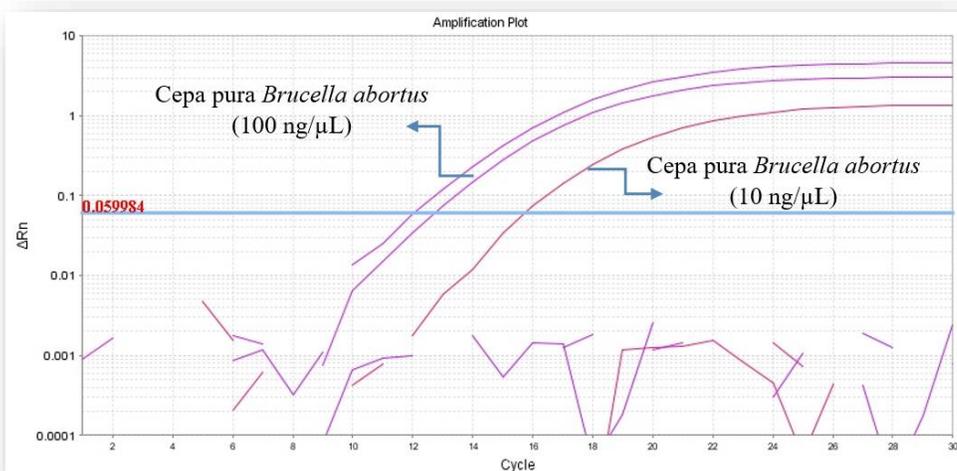


Figura 12: Amplificación por qPCR con ADN de *Brucella abortus*.

Tabla 18. Valores de los promedios de Ct obtenidos para el gen específico *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* ETEC, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Brucella abortus* respectivamente.

Muestra	C _T para 100 ng de ADN	C _T para 10 ng de ADN
Cepa pura de <i>Salmonella enterica</i>	12.94 ± 0.03	16.32 ± 0.4
Cepa pura de <i>Staphylococcus aureus</i>	13.96 ± 0.07	16.68 ± 0.05
Cepa pura de <i>E. coli</i> ETEC	12.79 ± 0.3	---
Cepa pura de <i>E. coli</i> O157:H7	13.93 ± 0.09	---
Cepa pura de <i>Listeria monocytogenes</i>	13.56 ± 0.18	16.82 ± 0.3
Cepa pura de <i>Brucella abortus</i>	12.55 ± 0.33	15.57 ± 0.25
NTC	NA	NA

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

NA=No hubo amplificación

Se observó amplificación de los genes blanco en las cepas puras a partir de 100 y 10 ng de ADN molde.

Los valores de C_T obtenidos para *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Brucella abortus* (cepas puras) cuando éstas se diluyeron 10 veces, mostraron un aumento aproximado de 3.3 ciclos, tal como lo reportado en la literatura, de esta manera se comprueba la eficiencia de la reacción y la capacidad de amplificación aún con una baja cantidad de molde.

9.4. Análisis de las unidades de ensayo de Queso bola de Ocosingo.

Las unidades de ensayo de Queso Bola de Ocosingo se analizaron por qPCR para la detección de cepas patogénicas de *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*

ETEC, *E coli O157:H7*, *Listeria monocytogenes* y *Brucella abortus*, con el fin de asegurar la inocuidad microbiológica del producto, la cual puede verse afectada por las condiciones de maduración, la elaboración del producto y las condiciones de higiene en la ordeña y elaboración del producto.

En las tablas 19, 20, 21, 22, 23 y 24 muestran un resumen en los valores de Ct promedio obtenidos para el análisis de cada microorganismo patógeno. Con base a trabajos anteriores (Hernández, I. 2012. y Mejía, E., 2013) se determinó que un Ct mayor a 28 se considera negativo.

Tabla 19. Ciclos umbral promedio y desviación estándar de las 32 unidades de ensayo para el gen de *Salmonella spp.* obtenidas por qPCR.

Número de muestra	Unidad de ensayo	Ct promedio*
5	Queso 1: Dorados de la selva	29.07
6	Queso 1.2: Dorados de la selva	32.95
7	Queso 2: Dorados de la selva	31.57
8	Queso 2.2: Dorados de la selva	33.30
21	Queso 1: Santa Rosa	28.38
22	Queso 1.2: Santa Rosa	34.89
23	Queso 2: Santa Rosa	32.51
24**	Queso 2.2: Santa Rosa	33.39
37	Queso 1: Laltic	29.14
38**	Queso 1.2: Laltic	38.09
39	Queso 2: Laltic	31.31

40	Queso 2.2: Laltic	35.53
53	Queso 1: La Maya	27.27
54	Queso 1.2: La Maya	33.80
55	Queso 2: La Maya	34.94
56	Queso 2.2: La Maya	33.73
69	Queso 1: La Peña	34.38
70	Queso 1.2: La Peña	33.43
71	Queso 2: La Peña	30.48
72	Queso 2.2: La Peña	33.63
85	Queso 1: Queshill	26.55
86	Queso 1.2: Queshill	30.85
87	Queso 2: Queshill	31.25
88	Queso 2.2: Queshill	32.39
101**	Queso 1: Regional	35.25
102	Queso 1.2: Regional	32.56
103	Queso 2: Regional	31.75
104	Queso 2.2: Regional	32.89
117	Queso 1: Queso Ocosingo	23.81
118	Queso 1.2: Queso Ocosingo	34.85
119	Queso 2: Queso Ocosingo	32.06
120	Queso 2.2 Queso Ocosingo	33.68

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

** Muestras en las que se utilizaron 10 ng de ADN molde

Tabla 20. Ciclos umbral promedio y desviación estándar de las 32 unidades de ensayo para el gen de *S.aureus* obtenidas por qPCR.

Número de muestra	Unidad de ensayo	C_t promedio*
9	Queso 1: Dorados de la selva	NA
10	Queso 1.2: Dorados de la selva	33.32
11	Queso 2: Dorados de la selva	32.39
12	Queso 2.2: Dorados de la selva	32.37
25	Queso 1: Santa Rosa	29.99
26	Queso 1.2: Santa Rosa	29.08
27	Queso 2: Santa Rosa	32.01
28	Queso 2.2: Santa Rosa	32.82
41	Queso 1: Laltic	37.22
42	Queso 1.2: Laltic	38.67
43	Queso 2: Laltic	NA
44	Queso 2.2: Laltic	38.2
57	Queso 1: La Maya	37.21
58	Queso 1.2: La Maya	36.86
59	Queso 2: La Maya	33.86
60	Queso 2.2: La Maya	26.09
73	Queso 1: La Peña	39.62

74	Queso 1.2: La Peña	35.21
75	Queso 2: La Peña	39.19
76	Queso 2.2: La Peña	38.97
89	Queso 1: Queshill	35.97
90	Queso 1.2: Queshill	31.28
91**	Queso 2: Queshill	35.06
92	Queso 2.2: Queshill	38.62
105**	Queso 1: Regional	NA
106	Queso 1.2: Regional	39.16
107	Queso 2: Regional	39.34
108	Queso 2.2: Regional	38.19
121	Queso 1: Queso Ocosingo	38.01
122	Queso 1.2: Queso Ocosingo	NA
123	Queso 2: Queso Ocosingo	NA
124	Queso 2.2: Queso Ocosingo	35.45

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

** Muestras en las que se utilizaron 10 ng de ADN molde

NA= No hubo amplificación

.

Tabla 21. Ciclos umbral promedio y desviación estándar de las 32 unidades de ensayo para el gen de *E.coli* O157:H7 obtenidas por qPCR.

Número de muestra	Unidad de ensayo	C_t promedio*
129	Queso 1: Dorados de la selva	34.75
130	Queso 1.2: Dorados de la selva	33.07
131	Queso 2: Dorados de la selva	32.34
132	Queso 2.2: Dorados de la selva	32.62
133	Queso 1: Santa Rosa	32.61
134	Queso 1.2: Santa Rosa	31.77
135	Queso 2: Santa Rosa	30.33
136	Queso 2.2: Santa Rosa	31.45
137**	Queso 1: La Peña	34.49
138	Queso 1.2: La Peña	31.17
139	Queso 2: La Peña	31.49
140	Queso 2.2: La Peña	31.64
141	Queso 1: Queshill	29.98
142	Queso 1.2: Queshill	32.31
143	Queso 2: Queshill	30.63
144	Queso 2.2: Queshill	31.16
145	Queso 1: Regional	31.85
146	Queso 1.2: Regional	30.07

147	Queso 2: Regional	33.48
148	Queso 2.2: Regional	33.34
149	Queso 1: Queso Ocosingo	27.36
150	Queso 1.2: Queso Ocosingo	32.33
151	Queso 2: Queso Ocosingo	34.55
152	Queso 2.2: Queso Ocosingo	29.43
153	Queso 1: Queso Ocosingo	32.53
154	Queso 1.2: La Maya	34.54
155	Queso 2: La Maya	NA
156	Queso 2.2: La Maya	32.13
157**	Queso 1: Laltic	33.38
158	Queso 1.2: Laltic	32.68
159	Queso 2: Laltic	32.55
160	Queso 2.2: Laltic	29.06

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

** Muestras en las que se utilizaron 10 ng de ADN molde

NA= No hubo amplificación

Tabla 22. Ciclos umbral promedio y desviación estándar de las 36 unidades de ensayo para el gen de *E.coli* ETEC obtenidas por qPCR.

Número de muestra	Unidad de ensayo	C_t promedio*
129	Queso 1: Dorados de la selva	35.89
130	Queso 1.2: Dorados de la selva	35.15
131	Queso 2: Dorados de la selva	34.43
132	Queso 2.2: Dorados de la selva	NA
133	Queso 1: Santa Rosa	33.36
134	Queso 1.2: Santa Rosa	32.95
135	Queso 2: Santa Rosa	31.73
136	Queso 2.2: Santa Rosa	NA
137**	Queso 1: La Peña	33.34
138	Queso 1.2: La Peña	32.46
139	Queso 2: La Peña	31.70
140	Queso 2.2: La Peña	NA
141	Queso 1: Queshill	31.40
142	Queso 1.2: Queshill	33.43
143	Queso 2: Queshill	31.41
144	Queso 2.2: Queshill	33.43
145	Queso 1: Regional	33.88
146	Queso 1.2: Regional	33.61

147	Queso 2: Regional	NA
148	Queso 2.2: Regional	NA
149	Queso 1: Queso Ocosingo	32.01
150	Queso 1.2: Queso Ocosingo	31.13
151	Queso 2: Queso Ocosingo	30.75
152	Queso 2.2: Queso Ocosingo	29.40
153	Queso 1: La Maya	33.65
154	Queso 1.2: La Maya	33.30
155	Queso 2: La Maya	29.55
156	Queso 2.2: La Maya	33.04
157**	Queso 1: Laltic	33.89
158	Queso 1.2: Laltic	32.26
159	Queso 2: Laltic	32.20
160	Queso 2.2: Laltic	27.46

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

** Muestras en las que se utilizaron 10 ng de ADN molde

NA= No hubo amplificación

Tabla 23. Ciclos umbral promedio y desviación estándar de las 36 unidades de ensayo para el gen de *Listeria monocytogenes* obtenidas por q-PCR.

Número de muestra	Unidad de ensayo	C_t promedio*
13	Queso 1: Dorados de la selva	NA
14	Queso 1.2: Dorados de la selva	38.67
15	Queso 2: Dorados de la selva	NA
16	Queso 2.2: Dorados de la selva	39.58
29	Queso 1: Santa Rosa	35.84
30	Queso 1.2: Santa Rosa	38.42
31**	Queso 2: Santa Rosa	38.81
32	Queso 2.2: Santa Rosa	38.38
45	Queso 1: Laltic	NA
46	Queso 1.2: Laltic	38.7
47	Queso 2: Laltic	NA
48	Queso 2.2: Laltic	37.89
61	Queso 1: La Maya	NA
62	Queso 1.2: La Maya	NA
63	Queso 2: La Maya	NA
64	Queso 2.2: La Maya	NA
77	Queso 1: La Peña	38.50
78**	Queso 1.2: La Peña	NA

79	Queso 2: La Peña	37.65
80**	Queso 2.2: La Peña	NA
93	Queso 1: Queshill	NA
94	Queso 1.2: Queshill	NA
95	Queso 2: Queshill	35.41
96	Queso 2.2: Queshill	NA
109	Queso 1: Regional	NA
110	Queso 1.2: Regional	38.54
111	Queso 2: Regional	39.54
112**	Queso 2.2: Regional	NA
125	Queso 1: Queso Ocosingo	NA
126	Queso 1.2: Queso Ocosingo	NA
127**	Queso 2: Queso Ocosingo	32.20
128	Queso 2.2: Queso Ocosingo	37.46

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

** Muestras en las que se utilizaron 10 ng de ADN molde

NA= No hubo amplificación

Tabla 24. Ciclos umbral promedio y desviación estándar de las 36 unidades de ensayo para el gen de *Brucella abortus* obtenidas por q-PCR.

Número de muestra	Unidad de ensayo	C_t promedio*
1	Queso 1: Dorados de la selva	NA
2	Queso 1.2: Dorados de la selva	NA
3	Queso 2: Dorados de la selva	NA
4	Queso 2.2: Dorados de la selva	NA
17	Queso 1: Santa Rosa	NA
18	Queso 1.2: Santa Rosa	NA
19	Queso 2: Santa Rosa	NA
20	Queso 2.2: Santa Rosa	NA
33	Queso 1: Laltic	NA
34	Queso 1.2: Laltic	NA
35	Queso 2: Laltic	NA
36**	Queso 2.2: Laltic	NA
49	Queso 1: La Maya	NA
50	Queso 1.2: La Maya	NA
51	Queso 2: La Maya	NA
52	Queso 2.2: La Maya	NA
65	Queso 1: La Peña	NA
66**	Queso 1.2: La Peña	NA

67	Queso 2: La Peña	NA
68	Queso 2.2: La Peña	NA
81	Queso 1: Queshill	NA
82	Queso 1.2: Queshill	NA
83	Queso 2: Queshill	NA
84	Queso 2.2: Queshill	NA
97	Queso 1: Regional	NA
98	Queso 1.2: Regional	NA
99	Queso 2: Regional	NA
100**	Queso 2.2: Regional	NA
113	Queso 1: Queso Ocosingo	NA
114	Queso 1.2: Queso Ocosingo	NA
115	Queso 2: Queso Ocosingo	NA
116**	Queso 2.2: Queso Ocosingo	NA

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

** Muestras en las que se utilizaron 10 ng de ADN molde

NA= No hubo amplificación

En la Figura 13 se presentan la curva de amplificación para *Salmonella enterica*, y las muestras de las unidades de ensayo que presentaron un valor de Ct < 28.

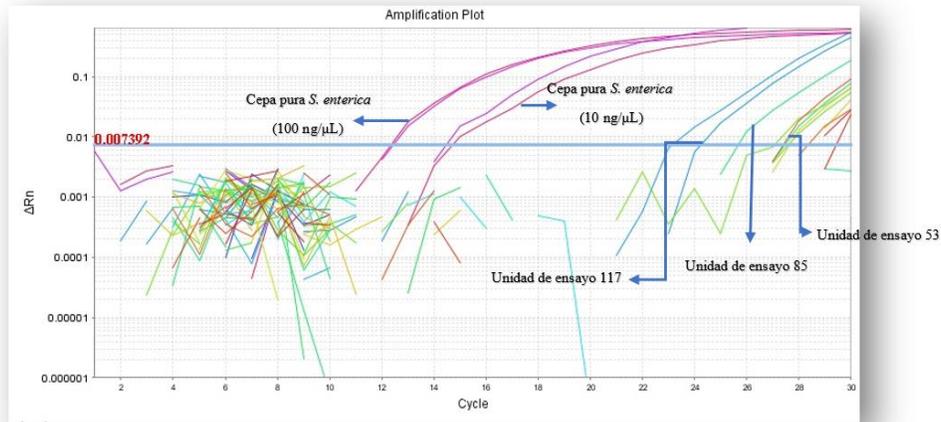


Figura 13. Gráfica de la amplificación de qPCR de los controles positivos de *S. enterica* y las 32 unidades de ensayo de Queso Bola de Ocosingo, para detección de *S. enterica*.

En la Figura 14 se presentan la curva de amplificación para *S. aureus*, y las muestras de las unidades de ensayo con resultado positivo.

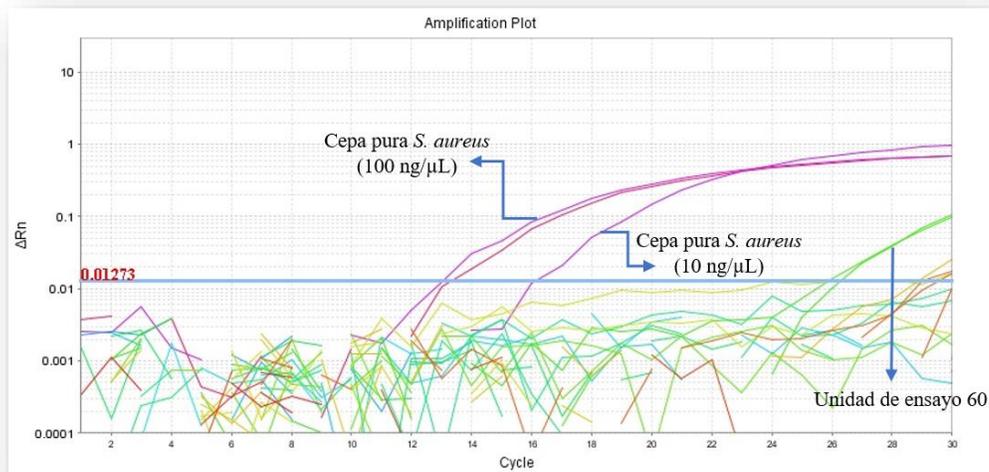


Figura 14. Gráfica de la amplificación de qPCR de los controles positivos de *S. aureus* y las 32 unidades de ensayo de Queso Bola de Ocosingo, para detección de *S. aureus*.

En las figuras 15, 16, 17 y 18 se presentan la curva de amplificación para *E. coli* ETEC, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Brucella* respectivamente, con las muestras de las unidades de ensayo.

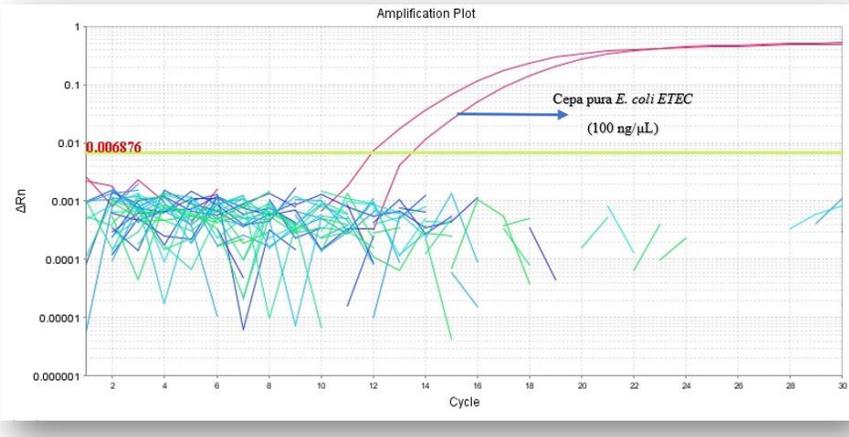


Figura 15. Gráfica de la amplificación de qPCR de los controles positivos de *E. coli* ETEC y las 16 unidades de ensayo de Queso Bola de Ocosingo, para detección de *E.coli* ETEC.

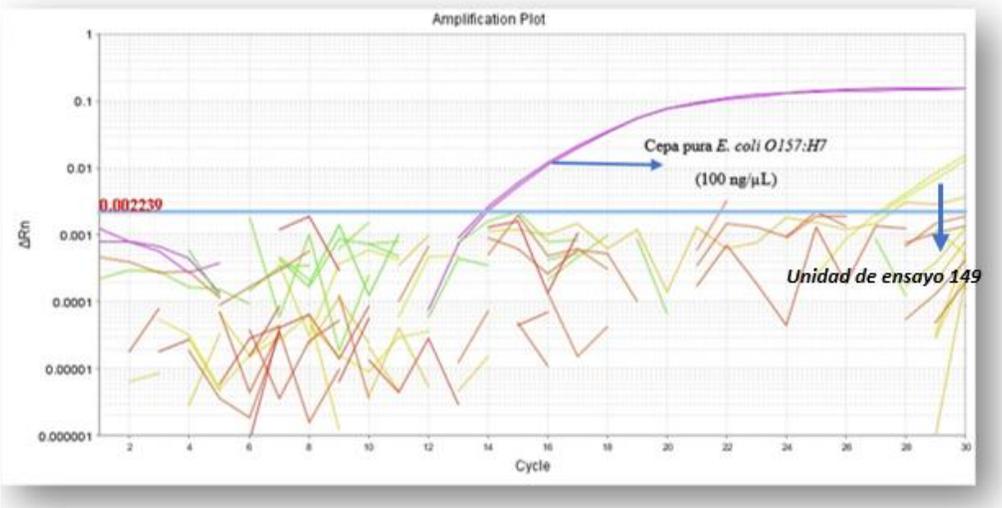


Figura 16. Gráfica de la amplificación de qPCR de los controles positivos de *E. coli* O157:H7 y las 16 unidades de ensayo de Queso Bola de Ocosingo, para detección de *E.coli* O157:H7

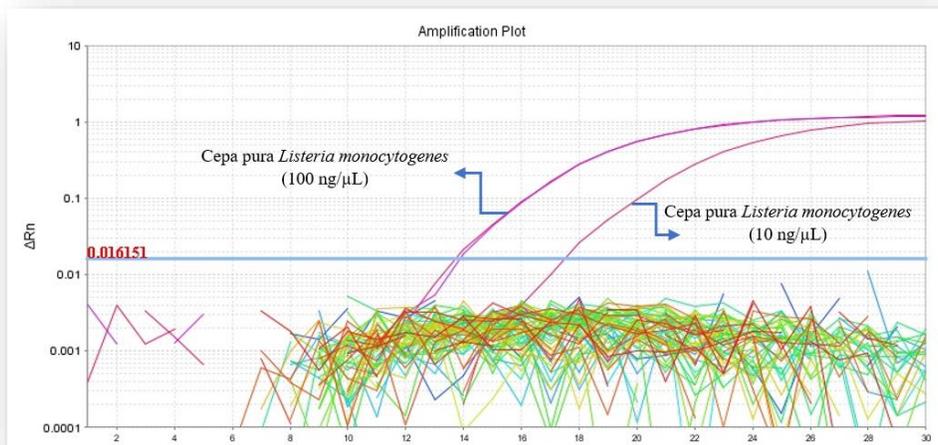


Figura 17. Gráfica de la amplificación de qPCR de los controles positivos de *Listeria monocytogenes* y las 16 unidades de ensayo de Queso Bola de Ocosingo, para detección de *Listeria monocytogenes*.

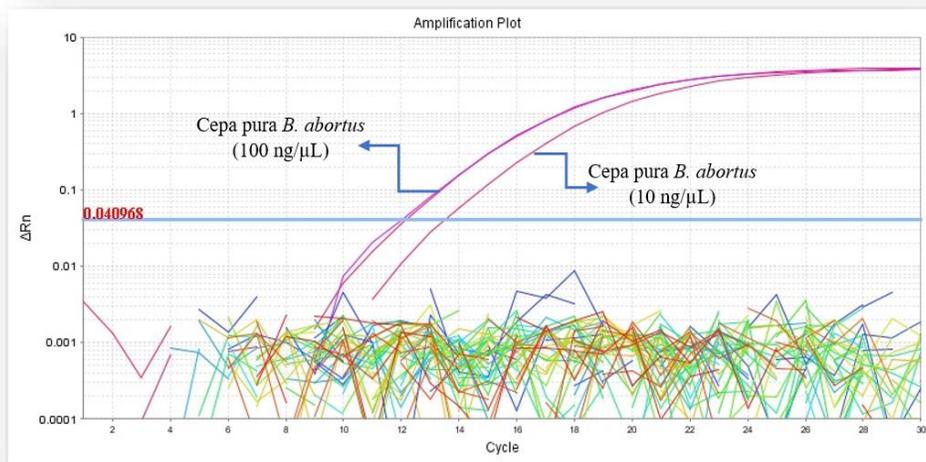


Figura 18. Gráfica de la amplificación de qPCR de los controles positivos de *Brucella abortus* y las 16 unidades de ensayo de Queso Bola de Ocosingo, para detección de *Brucella abortus*

Como se mencionó anteriormente, las muestras 53, 85 y 117 presentaron amplificación para *Salmonella enterica*. La muestra 60 presentó amplificación para *S. aureus*. Estos resultados sugieren en primera instancia la presencia de ADN de *Salmonella enterica* y/o *S. aureus* que no fueron capaces de crecer o aumentar el número de bacterias mediante la etapa de enriquecimiento, quizá debido a que no se encontraban viables. De igual manera, con base a la tabla 25, podemos observar que en todos los quesos antes mencionados sólo una unidad resultó positiva y las demás muestras resultaron negativas, por lo cual, la decisión final es que los productores tienen resultados negativos para *Salmonella enterica*, *S. aureus* y *E. coli* O:157:H7

Tabla 25. Interpretación de resultados de la técnica de PCR tiempo real.

<i>Resultados PCR</i>						
Unidad de ensayo 1	+	+	+	+	-	Extracción 1
	+	+	+	-	-	Extracción 2
Unidad de ensayo 2	+	+	-	-	-	Extracción 1
	+	-	-	-	-	Extracción 2
Decisión final	Positivo	Positivo	Repetir	Negativo	Negativo	

P=Positivo N=Negativo

No obstante, se recomienda realizar pruebas microbiológicas a dichos quesos, en diferentes etapas de la elaboración con la finalidad de conocer la fuente de contaminación y las concentraciones en las cuales estos microorganismos se encuentran viables en algún punto del proceso, debido a que como se ha mencionado anteriormente

la materia prima utilizada no contempla algún tratamiento térmico. Esto implica un punto crítico en la inocuidad del alimento.

Analizando la tabla 25 y las muestras restantes pertenecientes a *Salmonella enterica*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *E. coli* ETEC, *Listeria monocytogenes* y *Brucella abortus* que fueron analizadas, no poseen un C_t entre 11 y 15 obtenidos con las cepas puras viables, por lo que dichos resultados sugieren que estas muestras serían negativas para *Salmonella enterica*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *E. coli* ETEC, *Listeria monocytogenes* y *Brucella abortus*, estos resultados se muestran en la Tabla 26.

Tabla 26. Resultados de la técnica de PCR tiempo real.

Productor MO	Queso Ocosingo	Laltic	La maya	La peña	La regional	Dorados de la selva	Queshill	Santa Rosa
<i>Salmonella enterica</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<i>S. aureus</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<i>L. monocytogenes</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<i>Brucella spp</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<i>E. coli</i> ETEC	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<i>E. coli</i> O157:H7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

El proceso de maduración es de gran importancia en el aseguramiento de la inocuidad del queso, ya que los microorganismos presentes desempeñan un papel importante durante el proceso de elaboración y la maduración, estos transforman la lactosa en ácido láctico contribuyendo así en el aumento de la acidez, que funciona como un agente inhibidor de cierta población microbiana. Además de que existe evidencia que sugiere que la microbiota presente en el queso produciría bacteriocinas, lo que contribuyen a la inocuidad del producto.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se concluye que el Queso bola de Ocosingo es seguro para su consumo respecto a la ausencia de *Salmonella enterica*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *E. coli* ETEC, *Listeria monocytogenes* y *Brucella abortus*.

X. Conclusiones

- El método de extracción utilizado permite obtener ADN bacteriano con una pureza adecuada y de calidad amplificable, tanto de cepas puras como de los paquetes celulares obtenido después de la etapa de enriquecimiento del queso bola de Ocosingo,
- El juego de sondas y cebadores para la detección del gen *invA*, el gen *per*, el gen *nucA*, el gen *hly*, el gen *EltBI*, el gen *eae*, permitieron la detección específica de *Salmonella enterica*, *Brucella abortus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *E.coli ETEC* y de *E.coli O157:H7* , respectivamente, mediante la técnica de qPCR
- Se detectó la presencia de ADN de *Salmonella enterica* en las muestras 53, 85 y 117 y *S. aureus*, en la muestra 60 sin embargo lo resultados sugieren que este ADN corresponde material genético de microorganismos no viables, por lo tanto, se considera un resultado negativo y sugiere su inocuidad con respecto a estos microorganismos patógenos
- No se detectó la presencia de ADN de, *Listeria monocytogenes*, *Brucella abortus*, *E.coli O157:H7* y *E. coli ETEC* en los 16 quesos de Queso Bola de Ocosingo analizados, lo que sugiere su inocuidad con respecto a estos microorganismos patógenos.

Bibliografía

- Adams, M. y Moss, M., 1997. *Microbiología de los Alimentos*. Zaragoza España: Acribia.
- Agudelo, L.M.A, & Cesín, V.A. (2013). Evaluación socioeconómica de los productores de queso Bola de Ocosingo, Chiapas. En Cavallotti, B., Ramírez, B., Cesín, A., Rojo G., & Marcof, C. (Eds.). *Seguridad Alimentaria y Producción Ganadera en Unidades Campesinas*. (pp.173-184). México: Universidad Autónoma Chapingo.
- Álvarez O. M.G., Saldaña F. C., Ballesteros E. M. R., Martínez V. I. O., López M. A., Briones L.E., Morales L. A. 2015b. Comparación de las pruebas: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), serología y hemocultivo con respecto a sensibilidad y especificidad, para la detección de *Brucella* spp en muestras humanas. *Gac Med Mex* 151:620-7
- Becerra, M.B., 2013. Detección de *Listeria monocytogenes* en queso Cotija artesanal madurado. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. Mexico, D.F.
- Bernard, D., 1984. *Tratado de Microbiología*. 3ª edición. Barcelona: Salvat Editores.
- Biosystems, A. (2005). *Real-Time PCR systems, Chemistry Guide*. AB, 2-3
- Castro, A., González, R., Prat M. I., 2005. Brucelosis: una revisión práctica. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 39 (2), 203-216.
- 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.
- Cervantes, F., Villegas, A., Cesín, A. y Espinoza, A. 2013. *Los quesos mexicanos genuinos. Patrimonio cultural que debe rescatarse*. 2ª edición. Guadalajara: Biblioteca Básica de Agricultura.
- Cervantes, F., Villegas, A., & Espinoza, A. (2014). *Atlas de los quesos mexicanos genuinos*. 3ª edición. Biblioteca Básica de Agricultura. Estado de México, México.
- Cliver, D., 1990. *Foodborne diseases*. San Diego: Academic Press, 185-199.
- Dorak, T., 2006. *Real-time PCR*. UK: Taylor & Francis group, 3-29, 45-47.

- 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=FFFF37B3B1226106B46D984E3B064DD1.tdx2?sequence=1> [Último acceso el 29 de agosto de 2022].
- Doyle, M., 2001. *Food Microbiology: Fundamentals and frontiers*. 2ª edición. Washington; ASM, 141-178.
- 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.
- Ercolini, D., (2004). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of microbial Methods*, 56, 297-334
- Flores, G. y Herrera, R., 2005. *Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico*. Salud Pública de México [En línea] (Actualizado al 11 de mayo de 2010). Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003636342005000500010&lng=es&tlng=es
- Fox, P., Guinee, T., Cogan, T., y McSweeney, P. 2000. *Fundamentals of cheese science*. USA: Aspen, 484-500.
- Fricker, M., Messelhauber, U., Busch, U., Scherer, S. y Ehling-Schulz, M., 2007. Diagnostic Real-Time PCR Assays for the Detection of Emetic *Bacillus cereus* Strains in Foods and Recent Food-Borne Outbreaks. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1892–1898.
- González, C. A., Torres L. M., y Vallejo C. B. 2004. Tecnificación del proceso artesanal para la obtención de queso fresco mexicano. CIAD, AC CONACYT.
- Hernández, I. 2012. Detección de *Salmonella spp* en queso Cotija artesanal madurado por PCR tiempo real. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. México, D.F.

- Hernández, I., 2022. Análisis del metagenoma bacteriano del queso bola de Ocosingo. Tesis (en revisión) de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. México, CDMX.
- INAFED, Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal
- James, M. 2005. *Modern Food Microbiology*. 7ª edición. New York: Food Science Text, 619-625.
- Logan, J., Edwards, K., y Saunde, N., 2009. *Real-Time PCR: Current technology and applications*. Horizon Scientific Press.
- López, R., Hernández-Montes, A., y Santos-Moreno, A. 2015. *Caracterización socio técnica del Queso Bola de Ocosingo, Chiapas*. Ciencias Naturales y Agropecuarias, 345-353.
- Malorny, B., Rahn. K., Helmuth. R., 2007. A real-time PCR for the detection of Salmonella Enteritidis in poultry meat and consumption eggs. *Journal of Microbiological Methods*, 70, 245-251.
- Mejía, E.H., 2013. 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. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. México, D.F.
- Méndez, M., 2021. Composición química proximal y caracterización microbiológica de quesos artesanales de Ocosingo. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. México, D.F.
- Nada, A., Armstrong. A., 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, 134-142.
- Neri, O., 2022. Composición química y características microbiológicas de un queso artesanal Chiapaneco: El Queso Bola de Ocosingo. Tesis de Licenciatura en Química de alimentos, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. México, D.F.

- 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.
- NOM-251-SSA1-2009 Norma Oficial Mexicana. Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios.
- 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].
- Perez. M., et al. 2005. Analysis of S hexose carrier expression *Staphylococcus aureus* during wine fermentation: both low- and high-affinity Hxt transporters are expressed. *FEMS Yeast Res* 5(4-5):351-61.
- Probert, S.W., Schrader, N. K., Khuong, Y. N., Bystrom, L.S., Graves, H, M. 2004. Real Time PCR Assay for Detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*, *Journal of Clinical Microbiology* 42:3, 1290-1294.
- QIAGEN®, 2010. *Manual de alimentos DNeasy® mericon™*. [En línea] (Actualizado al 9 de septiembre de 2010). Disponible en https://digitalinsights.qiagen.com/?intcmp=home_appl_6 [Último acceso 15 de marzo de 2021]
- Ramírez, M., 2011. *Importancia del establecimiento de programa de Buenas prácticas de manufactura (BPM) en la industria quesera*. [En línea] (Actualizado al 27 de Junio de 2011). Disponible en: <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-leche/industrialechera/articulos/industria-quesera-t3431/472-p0.htm> [Último acceso 3 de septiembre de 2021]
- Rodríguez, G., 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Revisión, *Salud Pública de México*, 44(5), 464-475.
- Rodriguez, L., 2012. *Real-Time PCR in Food Science: Current Technology and Applications*. España: Caister Academic Press, 5.

- Salto, B. I., 2013. Identificación y cuantificación de *Staphylococcus aureus* en Queso Cotija artesanal madurado. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. Mexico, D.F.
- Soares, C. D. P. O. C., Teles, J. A. A., Santos, A. F. D., Silva, S.O.F., Cruz, M.V.R.A., Silva-Júnior, F.F.D. 2015. Prevalence of *Brucella spp* in humans. *Revista latinoamericana de enfermagem*, 23(5), 919-926.
- Tagu, D. y M. Christian (2006) Fundamentos de las Técnica de Biología Molecular, Zaragoza: Acribia.
- Torres, F., 2013. Detección de *Brucella spp.* mediante la técnica de PCR en tiempo real en Queso Cotija artesanal madurado. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. México, D.F.
- Urrieta, J., (2018), Análisi multilocus de *Enterococcus faecium* aislados del Queso de Ocosingo. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. México, CDMX.
- Villegas, G. A., 2004. *Tecnología Quesera*. México: Editorial Trillas S.A. de C.V.
- Villegas, G. A.; Cervantes E. F. 2011. La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanales mexicanos. *Estudios Sociales*, Santo Domingo, (19),. 38,. 145-164. Disponible en:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S018845572011000200006&script=sci_arttext&tlng=en [Último acceso 10 de septiembre de 2021]
- Villegas, A.,& Cervantes, F. (2017). De quesos mexicanos tradicionales y sus imitaciones. 1ª ed. México: Universidad Autónoma Chapingo.

ANEXO A. Concentraciones promedio de ADN de los microorganismos patógenos (cepas de referencia) y muestras de Queso bola, después del enriquecimiento.

Tabla 27. Concentraciones promedio de ADN de *Salmonella spp* (Cepa de referencia) y muestras de Queso bola, después del enriquecimiento.

Número de muestra	Unidad de ensayo	Concentración promedio de las extracciones (ng/μL)	Relación A ₂₆₀ /A ₂₈₀ promedio de las extracciones
	<i>Salmonella enterica</i> , referencia.	285.85	1.84
5	Queso 1: Dorados de la selva	13.4	1.69
6	Queso 1.2: Dorados de la selva	3.2	1.89
7	Queso 2: Dorados de la selva	6.7	1.80
8	Queso 2.2: Dorados de la selva	1.5	2.2
21	Queso 1: Santa Rosa	8.9	1.50
22	Queso 1.2: Santa Rosa	3.2	2.00
23	Queso 2: Santa Rosa	6.5	1.79
24	Queso 2.2: Santa Rosa	1.1	1.90
37	Queso 1: Laltic	8.2	1.61
38	Queso 1.2: Laltic	1.5	2.1
39	Queso 2: Laltic	15.2	1.72
40	Queso 2.2: Laltic	5.75	1.65

53	Queso 1: La Maya	14.85	1.68
54	Queso 1.2: La Maya	12.85	1.85
55	Queso 2: La Maya	31.9	1.77
56	Queso 2.2: La Maya	9.35	1.78
69	Queso 1: Peña	18.15	1.64
70	Queso 1.2: Peña	3.05	1.80
71	Queso 2: Peña	7.05	1.69
72	Queso 2.2: Peña	4.45	1.74
85	Queso 1: Queshill	10.05	1.50
86	Queso 1.2: Queshill	4.95	1.59
87	Queso 2: Queshill	6.7	1.6
88	Queso 2.2: Queshill	3.9	1.74
101	Queso 1: Regional	1.1	1.95
102	Queso 1.2: Regional	7.75	1.68
103	Queso 2: Regional	7.2	1.69
104	Queso 2.2: Regional	5.5	1.69
117	Queso 1: Queso Ocosingo	10.5	1.66
118	Queso 1.2: Queso Ocosingo	124.05	1.77
119	Queso 2: Queso Ocosingo	4.15	1.58

120	Queso 2.2: Queso Ocosingo	5.6	1.75
-----	---------------------------	-----	------

Tabla 27. Concentraciones promedio de ADN de *Staphylococcus aureus* (control positivo) y muestras de Queso bola, obtenido después enriquecimiento.

Número de muestra	Unidad de ensayo	Concentración promedio de las extracciones (ng/ μ L)	Relación A ₂₆₀ /A ₂₈₀ promedio de las extracciones
	<i>Staphylococcus aureus</i> , referencia.	30.70	1.99
9	Queso 1: Dorados de la selva	3.9	2.2
10	Queso 1.2: Dorados de la selva	83.95	1.88
11	Queso 2: Dorados de la selva	55.25	1.88
12	Queso 2.2: Dorados de la selva	51.65	1.89
25	Queso 1: Santa Rosa	34.5	1.88
26	Queso 1.2: Santa Rosa	12	1.90
27	Queso 2: Santa Rosa	99.4	1.90
28	Queso 2.2: Santa Rosa	29.45	1.88
41	Queso 1: Laltic	7.35	2.0
42	Queso 1.2: Laltic	15.9	1.88

43	Queso 2: Laltic	17.2	1.88
44	Queso 2.2: Laltic	17.15	1.92
57	Queso 1: La Maya	77.1	1.85
58	Queso 1.2: La Maya	61.3	1.87
59	Queso 2: La Maya	112.2	1.87
60	Queso 2.2: La Maya	106.85	1.85
73	Queso 1: Peña	20.55	1.92
74	Queso 1.2: Peña	4.2	1.94
75	Queso 2: Peña	5.2	1.87
76	Queso 2.2: Peña	172.1	1.88
89	Queso 1: Queshill	23.05	2.15
90	Queso 1.2: Queshill	13	1.91
91	Queso 2: Queshill	3.30	2.20
92	Queso 2.2: Queshill	2.75	2.21
105	Queso 1: Regional	4.6	1.55
106	Queso 1.2: Regional	4.9	1.60
107	Queso 2: Regional	20.05	2.14
108	Queso 2.2: Regional	42.25	1.85
121	Queso 1: Queso Ocosingo	6.35	1.6
122	Queso 1.2: Queso Ocosingo	6.30	1.81

123	Queso 2: Queso Ocosingo	25.8	1.90
124	Queso 2.2: Queso Ocosingo	14.75	1.85

Tabla 28. Concentraciones promedio de ADN de *Listeria monocytogenes* (controles cepas de referencia) muestras de Queso bola, obtenido del enriquecimiento.

Número de muestra	Unidad de ensayo	Concentración promedio de las extracciones (ng/μL)	Relación A ₂₆₀ /A ₂₈₀ promedio de las extracciones
	<i>Listeria monocytogenes</i> , referencia.	25.45	1.99
13	Queso 1: Dorados de la selva	13.65	1.51
14	Queso 1.2: Dorados de la selva	8.4	2.01
15	Queso 2: Dorados de la selva	5.7	1.64
16	Queso 2.2: Dorados de la selva	5.4	2.08
29	Queso 1: Santa Rosa	5.8	2.06
30	Queso 1.2: Santa Rosa	5.3	1.98
31	Queso 2: Santa Rosa	2.65	1.81
32	Queso 2.2: Santa Rosa	4.6	2.20
45	Queso 1: Laltic	6.7	1.38
46	Queso 1.2: Laltic	5.8	2.12
47	Queso 2: Laltic	4	1.75
48	Queso 2.2: Laltic	2.5	1.60
61	Queso 1: La Maya	28.8	1.58

62	Queso 1.2: La Maya	125.85	1.85
63	Queso 2: La Maya	28.2	1.81
64	Queso 2.2: La Maya	68.65	1.90
77	Queso 1: Peña	5.15	1.31
78	Queso 1.2: Peña	3.6	2.30
79	Queso 2: Peña	4.5	1.89
80	Queso 2.2: Peña	1.95	2.10
93	Queso 1: Queshill	6.8	1.61
94	Queso 1.2: Queshill	5.05	1.99
95	Queso 2: Queshill	3.1	2.04
96	Queso 2.2: Queshill	5.65	1.77
109	Queso 1: Regional	8.7	1.31
110	Queso 1.2: Regional	6.2	2.10
111	Queso 2: Regional	3.1	1.68
112	Queso 2.2: Regional	4.35	2.03
125	Queso 1: Queso Ocosingo	4	2.02
126	Queso 1.2: Queso Ocosingo	4	2.21
127	Queso 2: Queso Ocosingo	1.3	2.40
128	Queso 2.2: Queso Ocosingo	5.2	2.10

Tabla 29. Concentraciones promedio de ADN de *Brucella abortus* (controles cepas de referencia) muestras de Queso bola, obtenido del enriquecimiento.

Número de muestra	Unidad de ensayo	Concentración promedio de las extracciones (ng/μL)	Relación A ₂₆₀ /A ₂₈₀ promedio de las extracciones
	<i>Brucella abortus</i> , cepa de referencia	83.45	1.94
1	Queso 1: Dorados de la selva	22.4	1.69
2	Queso 1.2: Dorados de la selva	11.95	1.97
3	Queso 2: Dorados de la selva	16.55	1.74
4	Queso 2.2: Dorados de la selva	13	2.04
17	Queso 1: Santa Rosa	22.95	1.85
18	Queso 1.2: Santa Rosa	14.75	2,16
19	Queso 2: Santa Rosa	31.35	1.81
20	Queso 2.2: Santa Rosa	8.15	2.4
33	Queso 1: Laltic	23	1.73
34	Queso 1.2: Laltic	21.5	1.96
35	Queso 2: Laltic	13.05	2.02
36	Queso 2.2: Laltic	3.5	2.75
49	Queso 1: La Maya	6.2	1.33
50	Queso 1.2: La Maya	4.1	2.15
51	Queso 2: La Maya	37.6	1.76
52	Queso 2.2: La Maya	3.9	2.4
65	Queso 1: Peña	33.05	1.52
66	Queso 1.2: Peña	1.4	2.24
67	Queso 2: Peña	28.7	1.83

68	Queso 2.2: Peña	18.55	2.03
81	Queso 1: Queshill	8.05	2.08
82	Queso 1.2: Queshill	7.85	2.4
83	Queso 2: Queshill	20.25	1.8
84	Queso 2.2: Queshill	9.85	2.05
97	Queso 1: Regional	18.75	1.76
98	Queso 1.2: Regional	19.7	1.94
99	Queso 2: Regional	17.5	1.78
100	Queso 2.2: Regional	1.5	2.13
113	Queso 1: Queso Ocosingo	9.05	2.17
114	Queso 1.2: Queso Ocosingo	7.8	1.67
115	Queso 2: Queso Ocosingo	22.1	1.8
116	Queso 2.2: Queso Ocosingo	1.25	2.07

Tabla 30. Concentraciones promedio de ADN de *E.coli* O157:H7 y ETEC (controles cepas de referencia) muestras de Queso bola, obtenido del enriquecimiento.

Número de muestra	Unidad de ensayo	Concentración promedio de las extracciones (ng/μL)	Relación A ₂₆₀ /A ₂₈₀ promedio de las extracciones
	<i>E.coli</i> ETEC, referencia.	293.45	1.88
	<i>E. coli</i> O157:H7, referencia.	181.45	1.92
129	Queso 1: Dorados de la selva	96.2	1.81
130	Queso 1.2: Dorados de la selva	100.7	1.79
131	Queso 2: Dorados de la selva	182.95	1.84
132	Queso 2.2: Dorados de la selva	195.55	1.82
133	Queso 1: Santa Rosa	19.4	1.77
134	Queso 1.2: Santa Rosa	15.2	1.79
135	Queso 2: Santa Rosa	110.9	1.84
136	Queso 2.2: Santa Rosa	103.55	1.87
137	Queso 1: Laltic	1.2	1.80
138	Queso 1.2: Laltic	7.95	1.72
139	Queso 2: Laltic	16.1	1.71
140	Queso 2.2: Laltic	37.45	1.82

141	Queso 1: La Maya	44	1.78
142	Queso 1.2: La Maya	7.55	1.83
143	Queso 2: La Maya	19.3	1.87
144	Queso 2.2: La Maya	52.95	1.88
145	Queso 1: Peña	44	1.78
146	Queso 1.2: Peña	7.55	1.83
147	Queso 2: Peña	388.2	1.95
148	Queso 2.2: Peña	484.85	1.88
149	Queso 1: Queshill	19.3	1.87
150	Queso 1.2: Queshill	25	1.84
151	Queso 2: Queshill	40.55	1.87
152	Queso 2.2: Queshill	9.8	1.97
153	Queso 1: Regional	50.4	1.84
154	Queso 1.2: Regional	40.5	1.85
155	Queso 2: Regional	10.5	1.99
156	Queso 2.2: Regional	93.85	1.92
157	Queso 1: Queso Ocosingo	1.7	1.51
158	Queso 1.2: Queso Ocosingo	4.2	1.79
159	Queso 2: Queso Ocosingo	115.4	1.89
160	Queso 2.2: Queso Ocosingo	14.1	1.98