



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

PROGRAMA PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

**EVALUACIÓN DE LA INOCUIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS QUESOS  
FRESCOS EN LA REGIÓN DE LA CHONTALPA, TABASCO**

**JAVIER CUSTODIO HERNÁNDEZ**

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO

2016

La presente **Tesis** titulada: “**Evaluación de la inocuidad microbiológica de los quesos frescos en la región de la Chontalpa, Tabasco**”, realizada por el alumno: **Javier Custodio Hernández**, bajo la dirección del **Consejo Particular** indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

POSTGRADO EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:

Dr. Juan Manuel Zaldívar Cruz

ASESOR:

Dr. Luis Manuel Vargas Villamil

ASESORA:

Dra. Adriana Contreras Oliva

ASESORA:

Dra. Ruby Alejandra Valdez Ojeda

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO A 29 DE FEBRERO DE 2016

# EVALUACIÓN DE LA INOCUIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS QUESOS FRESCOS EN LA REGIÓN DE LA CHONTALPA, TABASCO

Javier Custodio Hernández  
COLEGIO DE POSTGRADUADOS

## RESUMEN

La inocuidad de alimentos ha cobrado importancia hoy en día debido a que muchos alimentos al ser ingeridos pueden causar enfermedades conocidas como Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA's). Muchos de los agentes causantes de deterioro en los alimentos son microorganismos, destacando las bacterias y los hongos. Entre éstos se reportan *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi*, como causantes de enfermedades en quesos frescos. etc. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la inocuidad microbiológica de los quesos frescos: Crema o Sopero, Doble Crema y Oaxaca de la Región de la Chontalpa en el estado de Tabasco. Para ello se colectaron 15 muestras de quesos elaborados en 7 diferentes queserías pertenecientes a la Región de la Chontalpa, Tabasco, en el sureste mexicano. Las muestras fueron seleccionadas por un muestreo no probabilístico por conveniencia. Se emplearon los métodos de microbiología recomendados por la NOM-243-SSA-2010, para aislamiento y caracterización de las bacterias patógenas del tipo enterobacterias (*Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Escherichia coli*). Posteriormente se identificaron utilizando la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los resultados de la microbiología básica mostraron la presencia de colonias características de *Salmonella* spp., *E. coli* y *Listeria* en todos los quesos analizados. Por otra parte, con la amplificación por medio de la PCR solamente se obtuvieron amplificadores para el aislado L01 correspondiente a *Listeria* y S13, S14 correspondientes a *Salmonella*.

**Palabras claves:** microorganismos patógenos; quesos frescos; PCR; Inocuidad.

# MICROBIOLOGICAL SAFETY ASSESSMENT OF THE FRESH CHEESES IN THE REGION OF THE CHONTALPA, TABASCO

## ABSTRACT

Food safety has become important nowadays since many foods when ingested can cause diseases known as diseases transmitted by food (eta's). many of the agents causing deterioration in food are microorganisms, including bacteria and fungi. among those reported *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi*, as the cause of diseases in fresh cheeses. etc. so the objective of this study was to assess the microbiological safety of fresh cheeses: Crema o Sopero, Doble Crema and Oaxaca in the region of the Chontalpa in the State of Tabasco. This collected 15 samples of cheese made in 7 different cheese factories belonging to the region the chontalpa, tabasco, in southeastern Mexico. the samples were selected by sampling non-probability for convenience. the microbiology methods recommended by the nom-243-ssa-2010, were used isolation and characterization of pathogenic bacteria of the Enterobacteriaceae type (*Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Escherichia coli*). subsequently they were identified using the polymerase chain reaction technique. Basic Microbiology results showed the presence of characteristic colonies of subsequently they were identified using the polymerase chain reaction (PCR) technique. Basic Microbiology results showed the presence of characteristic colonies of *Salmonella* spp., *E. coli* and *Listeria* in all cheeses analyzed. On the other hand, by means of the PCR amplification only were obtained with amplified for the isolated L01 corresponding to *Listeria* and *Salmonella* for S13, S14.

**Keywords:** pathogenic microorganisms; fresh cheeses; PCR; safety.

## **DEDICATORIAS**

Doy gracias a Dios el cual ha sido mi ayuda y refugio en todos los momentos de mi vida y sin el cual no podría haber hecho nada, a mi esposa Ana María la cual me ha apoyado y ha sabido estar en todos los momentos buenos y malos y a mis hijos Eunice y Javier preciosos regalos que Dios me ha prestado.

También con mucho cariño y amor a mi Madre Violeta Hernández Hernández que ha estado conmigo en todo momento. Y la cual nos ha impulsado hacer mejores, a la memoria de mi padre Isauro Custodio Ramos por todo su apoyo y comprensión que en vida nos supo dar.

## **AGRADECIMIENTOS**

A los millones de mexicanos (as) que pagan impuestos, quienes a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el Colegio de Postgraduados, han afianzado parte de mí formación académica

Al Colegio de Postgraduados Campus Tabasco, por permitirme realizar mi tesis dentro de sus instalaciones, haberme brindado todas las facilidades necesarias para llevar a cabo esta investigación.

Al Dr. Juan Manuel Zaldívar Cruz, quien me aceptó como su estudiante de maestría del PROPAT, Por su apoyo incondicional en todo momento para que esta tesis se terminara, su amistad, y su ejemplo que enseña la dedicación y profesionalismo; lo cual ha servido para que sea fuente de inspiración de seguirme preparando.

A los profesores que fueron parte importante en la realización de este posgrado de Maestría en Ciencias, por sus experiencias de enseñanza que formaron en mis nuevas ideas de ver las cosas.

A mi Consejo Particular, Dra. Ruby Alejandra Valdez Ojeda (CICY), Dra. Adriana Contreras Oliva (Colegio Postgraduados Campus Córdoba), y al Dr. Luis Manuel Vargas Villamil, por sus valiosas contribuciones y apoyo brindado en el la realización de este trabajo, Gracias.

A la Dra. Elizabetha Hernández Domínguez y al Dr. Alejandro Nila por permitir hacer estancia de investigación en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto Tecnológico Superior de Acayucan, por sus facilidades para el uso de espacios y equipos en los experimentos de PCR y por sus enseñanzas en el área de Biología Molecular.

A los compañeros de la generación Otoño 2013 con los que compartí algunas clases por su aprecio sincero: Adriana, Juan Carlos, Lenin, Wander, Sofía, Nestor, José del Carmen.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	1
1. OBJETIVOS .....	4
2.1. Objetivo general .....	4
1.2. Objetivos específicos .....	4
CAPÍTULO I. INOCUIDAD MICROBIOLÓGICA DE TRES VARIEDADES DE QUESOS FRESCOS ELABORADOS EN QUESERÍAS DEL SURESTE DE TABASCO; MÉXICO.	5
1.1. INTRODUCCIÓN .....	8
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	10
1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	13
1.4. CONCLUSIONES .....	16
1.5. LITERATURA CITADA .....	17
CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS EN QUESOS FRESCOS MEDIANTE PCR PROBANDO DIFERENTES CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN .....	22
2.1. INTRODUCCIÓN .....	25
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	33
2.4. CONCLUSIONES .....	38
2.5. LITERATURA CITADA .....	39
CAPITULO 3. CONCLUSIONES GENERALES .....	42

## ÍNDICE DE TABLAS.

INTRODUCCIÓN .....	1
1. OBJETIVOS .....	4
2.1. Objetivo general .....	4
1.2. Objetivos específicos .....	4
CAPÍTULO I. INOCUIDAD MICROBIOLÓGICA DE TRES VARIEDADES DE QUESOS FRESCOS ELABORADOS EN QUESERÍAS DEL SURESTE DE TABASCO; MÉXICO.	5
1.1. INTRODUCCIÓN .....	8
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	10
1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	13
Tabla 1. Crecimiento en placa presentado en los tres tipos de quesos frescos; Empleando medios selectivos y diferenciales para <i>Salmonella</i> spp .....	15
Tabla 2. Crecimiento en placa presentado en los tres tipos de quesos frescos; empleando medios selectivos y diferenciales para <i>E. coli</i> spp. y <i>Listeria</i> spp. ....	16
1.4. CONCLUSIONES .....	16
1.5. LITERATURA CITADA .....	17
CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS EN QUESOS FRESCOS MEDIANTE PCR PROBANDO DIFERENTES CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN .....	22
2.1. INTRODUCCIÓN .....	25
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
Tabla. 3 Muestras de quesos colectados y nomenclatura de aislados microbiológicos para confirmación por PCR. ....	27
Tabla 4. Primers empleados en las reacciones de PCR para amplificación de ADN de bacterias patógenas en estudio.....	28
Los reactivos empleados en las reacciones de PCR son: Loading Buffer, DNTPS, Accu Taq LA DNA polimerase, Accu Taq LA 10X Buffer, 10X Buffer, Red Taq DNA polimerase, marcador de peso molecular; bromuro de etidio, gel de agarosa, fenol saturado, cloroformo, Trizma hydrochloride, ácido acético glacial, bromuro de etidio, EDTA, Primers u oligonucleótidos; alcohol etílico, alcohol isoamilico, agua tetradestilada todos se adquirieron de (Sigma–Aldrich <sup>R</sup> ), todos estos reactivos son de grado biología molecular. ....	28
Tabla 5. Condiciones de amplificación y mezcla de reactivos en los ensayos de PCR..	32

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	33
Figura 1. Amplificación de ADN perteneciente a <i>Listeria</i> (L01), empleando gradiente de temperatura de alineamiento de (50°C a 65°C) Pozos 1:50°C, Pozo 3: 52.9°C (en los 8 carriles contenía el ADN amplificado de L01 perteneciente a <i>Listeria monocytogenes</i> ) Identificación de <i>Listeria</i> de 10 aislados .....	33
Figura 2. Amplificación de muestras de ADN de <i>Listeria</i> 11 aislados. Pozos (primer peine). 1: Marcador de PM de 1 Kb. 2: control negativo (agua tetradestilada), 3: control positivo (L01), 4:L02, 5:L03, 6:L04, 7:L05, 8:L06 Pozos (Segundo peine). 1: Marcador de PM de 1 Kb. 2: control negativo, 3: control positivo (L01), 4: L07, 5:L08, 6:L09, 7:L10, 8:L11 .....	34
Figura 3. Amplificación del ADN molde del aislado L01 empleando un gradiente de temperatura 50-65°C. Los 8 Pozos del primer peine se empleó la Taq polimerasa casera. En el segundo peine en donde se utilizaron 4 pozos Llevo la Accu Taq DNA Polymerase .....	35
Figura 4. Amplificación del ADN molde del aislado de <i>Listeria</i> (L01) empleando un gradiente de temperatura 50-65°C. En los 8 pozos del primer peine, en donde se observa en los pozos 7 y 8 un débil amplificado a la temperatura de alineamiento de 53°C y 50°C respectivamente. ....	36
Figura 5. Amplificación de 5 de los aislados de ADN molde de <i>Salmonella</i> spp., con su par de oligonucleótidos. 1: control negativo, 2: S01, 3: S06, 4: S09, 5:S13, 6: S14.....	37
2.4. CONCLUSIONES .....	38
2.5. LITERATURA CITADA .....	39
CAPITULO 3. CONCLUSIONES GENERALES .....	42

## INDICE DE FIGURAS.

- Figura 1. Amplificación de ADN perteneciente a *Listeria* (L01), empleando gradiente de temperatura de alineamiento de (50°C a 65°C) Pozos 1:50°C, Pozo 3: 52.9°C (en los 8 carriles contenía el ADN amplificado de L01 perteneciente a *Listeria monocytogenes*) Identificación de *Listeria* de 10 aislados .....33
- Figura 2. Amplificación de muestras de ADN de *Listeria* 11 aislados. Pozos (primer peine). 1: Marcador de PM de 1 Kb. 2: control negativo (agua tetradestilada), 3: control positivo (L01), 4:L02, 5:L03, 6:L04, 7:L05, 8:L06 Pozos (Segundo peine). 1: Marcador de PM de 1 Kb. 2: control negativo, 3: control positivo (L01), 4: L07, 5:L08, 6:L09, 7:L10, 8:L11 .....34
- Figura 3. Amplificación del ADN molde del aislado L01 empleando un gradiente de temperatura 50-65°C. Los 8 Pozos del primer peine se empleó la Taq polimerasa casera. En el segundo peine en donde se utilizaron 4 pozos Llevo la Accu Taq DNA Polymerase .....35
- Figura 4. Amplificación del ADN molde del aislado de *Listeria* (L01) empleando un gradiente de temperatura 50-65°C. En los 8 pozos del primer peine, en donde se observa en los pozos 7 y 8 un débil amplificado a la temperatura de alineamiento de 53°C y 50°C respectivamente. ....36
- Figura 5. Amplificación de 5 de los aislados de ADN molde de *Salmonella* spp., con su par de oligonucleótidos.1: control negativo, 2: S01, 3: S06, 4: S09, 5:S13, 6: S14.....37



## INTRODUCCIÓN

Los quesos frescos son ampliamente consumidos en países de América Latina en un 80% según Saxer *et al* (2004); en México es el tipo de queso más consumido. El INEGI (2014) tiene registrado que en México operaban 3,473 queserías, sin embargo, la mayoría de ellos son elaborados de manera artesanal y con utensilios rudimentarios y a pequeña escala (Soto-Beltrán *et al.*, 2015). Además de que la mayoría de los queseros fabrican los quesos con leche cruda (sin pasteurizar).

Los quesos frescos son de pasta blanda, alto contenido de humedad (55-58%), baja concentración de sal (1.4-1.6%) y pH casi neutro (5-6.3), por lo que estas características y la riqueza en nutrientes los hace un excelente sustrato para el desarrollo de microorganismos patógenos, además de que en México se comercializan en los mercados sin los mínimos cuidados de seguridad higiénica y bajo condiciones ambientales (Soto-Beltrán *et al.*, 2015, Soni *et al.*, 2010).

Los microorganismos patógenos que se han asociado a los quesos frescos; son principalmente las bacterias del tipo *Salmonella* spp, *Listeria* spp. y *Escherichia coli* spp., las cuales han sido consideradas como las más dañinas en cuanto a la Salud Pública se refiere (Omiccioli *et al.*, 2009). Hassanien (2014) y Soto-Beltrán (2015) las reportan en los quesos frescos mexicanos. Los quesos frescos y los productos de leche han sido asociados con brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) donde principalmente se han detectados 3 tipos de bacterias: *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157 (Omiccioli *et al.*, 2009, Kabuki *et al.*, 2004, Soni *et al.*, 2004, Soto-Beltrán *et al.*, 2015).

La bacteria *Escherichia coli*, es gram negativa, no formadora de esporas, pertenece a la familia de las enterobacterias, forma parte de la flora del tracto intestinal de los humanos, su presencia en los alimentos indica una contaminación por materia fecal y se le responsabiliza de varias enfermedades infecciosas; cierto tipo de *E. coli* es productor de Verotoxinas, las de los serogrupos O157, O26 y O111 y son designadas como enterohemorrágicas (Arslam y Ösdemir, 2013). En tanto que el género *Listeria*

presenta ocho especies *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. murria* y *L. dentrificans*; pero únicamente dos especies de este género son patogénicas: *L. monocytogenes* asociada con infección en humanos y animales y *L. ivanovii* asociada únicamente con infección en animales. *Listeria monocytogenes* produce una enfermedad bacteriana llamada listeriosis, es un cocobacilo Gram positivo (Torres *et al.*, 2005). Así mismo, el género *Salmonella* tiene dos especies, *S. bongori* (anteriormente subespecies V) y *S. entérica* subdividida en seis subespecies. Todos los serotipos comúnmente encontrados pertenecen a la subespecie I de *S. entérica*; La *S. bongori* y serotipos de las seis subespecies de *S. entérica* pueden ser aislados de humanos, aunque los aislamientos de *S. bongori* y *S. entérica* VI son raros; En tanto que varios serotipos se restringen a adaptarse en ciertos hospedadores y provocar enfermedades; ejemplo *Dublin* en ganado, *Tiphy* en humanos, *Gallinarum* en aves de corral, y más serotipos causan enfermedades en animales tanto de sangre fría y de sangre caliente (Janda y Abbott., 2005); Además la bacteria de *Salmonella* es un Bacilo Gram negativo, aerobio, no esporulado (NOM-114-SSA1-1994).

Por otra parte, los métodos de detección de microorganismos patógenos empleando microbiología básica requieren el uso de medios de cultivo de enriquecimiento y selectivos, para su aislamiento; además que requieren de pruebas bioquímicas para su identificación lo cual implica tiempo y trabajo en el laboratorio para su aislamiento y días posteriores para la identificación (Amagliani *et al.*, 2004, Valderrama *et al.*, 2015).

El avance de la tecnología ha permitido desarrollar métodos que permitan la detección y identificación de microorganismos trasmisores de enfermedades por los alimentos en periodos cortos de tiempo, los que se llaman “métodos de detección rápida”, dentro de los cuales está la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP o PCR) que es una técnica conocida y establecida de amplificación de ácidos nucleicos, utilizada previamente para la detección de microorganismos patógenos (Zhao *et al.*, 2014). La técnica de PCR amplifica una copia o pocas de ácido desoxirribonucleico (ADN o DNA) en varias órdenes de magnitud. Los experimentos basados en PCR son

extensivamente usados para evaluar la presencia o ausencia de los microorganismos patógenos en los alimentos (Valderrama *et al.*, 2015).

La presente investigación surge debido a que no existe trabajos que evalúen la inocuidad microbiológica de los quesos frescos en la Región de la Chontalpa, Tabasco, empleando como criterio la presencia o ausencia de las bacterias *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Escherichia coli* spp., en tres tipos de quesos frescos (Sopero o Crema, Doble crema, Oaxaca) muestreados en expendios y queserías de 7 lugares distintos de fabricación (queserías).

# 1. OBJETIVOS

## 2.1. Objetivo general

Identificar la presencia o ausencia de microorganismos patógenos en los quesos frescos que se elaboran y venden en la zona de la Chontalpa, Tabasco, mediante el empleo de técnicas microbiológicas convencionales y pruebas confirmatorias por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

## 1.2. Objetivos específicos

- Seleccionar queserías para la colecta de los quesos frescos (queserías y expendios).
- Determinar la presencia de coliformes totales mediante el empleo de técnicas microbiológicas.
- Detectar la presencia o ausencia de *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria*, por técnicas microbiológicas.
- Confirmar la presencia de cepas detectadas y aisladas de *L. monocytogenes*, *E. coli* O157: H7, *Salmonella*; mediante el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

## CAPÍTULO I. INOCUIDAD MICROBIOLÓGICA DE TRES VARIEDADES DE QUESOS FRESCOS ELABORADOS EN QUESERÍAS DEL SURESTE DE TABASCO; MÉXICO

J. Custodio- Hernández<sup>a</sup>, A. Contreras- Oliva<sup>b</sup>, R. A. Valdez- Ojeda<sup>c</sup>, L. M. Vargas-Villamil<sup>d</sup>, J. M. Zaldívar- Cruz<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup>Colegio de Postgraduados, Campus-Tabasco. Periférico Carlos A. Molina Km 3.5. Carretera Cárdenas Huimanguillo. H. Cárdenas Tabasco. C.P 86500.

<sup>b</sup>Instituto Tecnológico Superior de Acayucan. Carretera Costera del Golfo Km 216.4. Col. Michapan. Acayucan, Veracruz. C.P. 96100.

<sup>c</sup>Colegio de Postgraduados Campus Córdoba. Carretera Fed. Córdoba-Veracruz; Km 348 Congregación Manuel León, Amatlán de los Reyes, Ver. Cordoba, Veracruz. C.P. 94946.

<sup>d</sup>Centro de Investigación Científica de Yucatán. Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán. C.P. 97200

### RESUMEN

Los quesos frescos son muy consumidos en México representado por un 80% y gozan de ser muy populares en países de América Latina (Saxer *et al.*, 2013). Estos quesos se elaboran con leche cruda (sin pasteurizar) y de manera artesanal; además con los mínimos cuidados de higiene; por lo que han sido asociado con brotes de enfermedades por intoxicación alimentaria en el consumo de leche y productos de leche en los Estados Unidos (MacDonald *et al.*, 2005).

Estudios realizados por Omiccioli *et al.*, (2008) mostraron que las bacterias como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli* O157H:7; se encuentran entre las bacterias patógenas de intoxicación alimentaria más peligrosas en cuanto a salud humana se refiere. Por otro lado, Hassanien *et al.*, (2014), reportaron que *L. monocytogenes*, *S. enteritis* y *E. coli* tienen la capacidad de sobrevivir y crecer en leche cruda y pasteurizada por más de 16 días almacenada a 4°C.

Por lo que el objetivo de este estudio fue aislar e identificar las cepas de bacterias patógenas de *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* y *Listeria spp.*; para comprobar el grado de inocuidad microbiológica que guardan los quesos frescos. Se emplearon los

métodos microbiológicos sugeridos por la NOM-243-SSA-2010 y 15 muestras de tres tipos de quesos frescos (QF): Crema o Sopero, Doble Crema y Oaxaca; colectados en queserías y expendios pertenecientes al sureste del estado de Tabasco. El método empleado para la toma de la muestra fue un muestreo no probabilístico por conveniencia. De los resultados del crecimiento en los medios XLD, VB, Sulfito Bismuto, 100% de las muestras de quesos presentaron cepas características de *Salmonella spp.*, mientras que en agar Mac Conkey, 80% de las cepas presentaron morfología colonial características de las cepas de *E. coli*. En agar Soya Tripticaseína con extracto de levadura al 0.6% empleado para el aislamiento de cepas de *Listeria* se observó crecimiento del 100% en todas las muestras colectadas de los quesos. Los resultados obtenidos en cuanto al crecimiento de *E. coli* son similares a los encontrados por Soto-Beltrán *et al.*, (2015). Así mismo, los crecimientos obtenidos de cepas características de *Salmonella* fueron mayores a los obtenidos por Soto-Beltrán *et al.*, (2015) y Miranda *et al.*, (2009). El grado de inocuidad microbiológica que presentaron los 3 tipos de QF estudiados, rebasa los límites permisibles por la NOM-243; por lo que sería conveniente realizar otros estudios microbiológicos como la carga microbiana del ambiente y también de la leche, para así poder establecer recomendaciones en las Buenas Prácticas de Manufactura de Quesos y Buenas Prácticas de Producción de Quesos.

**Palabras claves:** Quesos frescos; bacterias patógenas; leche cruda; inocuidad

## **ABSTRACT**

### **Adstrac**

fresh cheeses are very consumed Mexico represented by a 80% and are very popular in countries of America Latin (Saxer *et al.*, 2013). These cheeses are made with raw milk (unpasteurized) and handmade; In addition to the minimum care hygiene; so you have been associated with outbreaks of diseases by food poisoning in the consumption of milk and dairy in the United States (MacDonald *et al.*, 2005).

studies carried out by Omiccioli et al., (2008) They showed that bacteria such as *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* and *Escherichia coli* O157H:7; they are among the most dangerous food poisoning pathogenic bacteria in human health is concerned. on the other hand Hassanien et al., (2014), They reported that *L. monocytogenes*, *S. enteritidis* y *E. coli* they have the ability to survive and grow in raw and pasteurized milk for more than 16 days stored at to store 4°C.

the objective of this study was to isolate and identify the strains of pathogenic bacteria of *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* y *Listeria spp.*; to check the degree of microbiological safety keeping fresh cheeses. the microbiological methods suggested were used by the NOM-243-SSA-2010 and 15 samples of three types of fresh cheeses (QF): Crema o Sopero, Doble Crema y Oaxaca; collected in cheese & outlets belonging to the southeast of the State of Tabasco. the method used for the sampling was a sampling non-probability for convenience. the results of the growth in the average XLD, VB, bismuth sulfite, 100% samples of cheeses presented features strains of *Salmonella spp.* While agar Mac conkey strains showed colonial morphology characteristics of the strains of *E. coli* an In trypticase soy agar with 0,6% yeast extract used for isolation of listeria strains was observed growth of the 100% in all the samples collected from the cheese. the results obtained in terms of the growth of *E. coli* they are similar to those found by Soto-Beltrán et al., (2015). Likewise, growths obtained from characteristics of salmonella strains were higher than those obtained by Soto-Beltrán et al., (2015) y Miranda et al., (2009). the degree of microbiological safety who presented the 3 types of qf studied, exceeded the permissible limits for the It would be useful to perform other microbiological studies such as the microbial load of the environment and also milk, so to establish recommendations on good practices in manufacture of cheeses and good practices of production of cheeses

**keywords:** fresh cheese; pathogenic bacteria; raw milk; safety

## 1.1. INTRODUCCIÓN

En México la agroindustria lechera (AIL) es la más importante del sector de alimentos con 18.5% del PIB de la industria alimentaria y el 0.6% del PIB del país (Poméon y Cervantes, 2010). La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), reportó que en el año 2014 la producción nacional de leche fue de 11,129,622 litros y una producción nacional de 240, 657 toneladas de diferentes tipos de quesos (SIAP, 2015). Por consiguiente, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) en 2014 consignó que en el país operaban 3,473 unidades procesadoras de lácteos (queserías). Las variedades de quesos que son muy consumidas en México son los quesos frescos, representado por un 80%; además, de que son muy populares en países de América Latina (Saxer *et al.*, 2013); Sin embargo, muchos de los quesos frescos elaborados en México, son elaborados de manera artesanal y con leche sin pasteurizar (Reséndiz *et al.*, 2012), tal es el caso del queso Oaxaca, Este se considera un queso imprescindible que no puede faltar en una gran variedad de recetas de comidas mexicanas (Villanueva-Carbajal *et al.*, 2012). Sin embargo, la variedad de quesos frescos presenta altos contenidos de humedad, lo que beneficia la proliferación de microorganismos patógenos. Ya que, el crecimiento de los microorganismos es influido por la disponibilidad del agua, pH y concentración de sal; tanto mayor es el contenido de agua, mayor la susceptibilidad a que los quesos sean contaminados por microorganismos patógenos (Beresford *et al.*, 2001). Diversos son los agentes patógenos que se han vinculado con la contaminación de los alimentos lácteos, entre ellos se ha reportado *Listeria*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. Respecto a esto, Omiccioli *et al.*, 2008, catalogó a las bacterias *Escherichia coli* O157, *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* entre las bacterias patógenas más peligrosas que dañan la salud humana por el consumo de alimentos contaminados; De la misma manera, Hassanien *et al.*, (2014) menciona que *L. monocytogenes*, *S. enteritidis* y *E. coli*; tienen la capacidad de sobrevivir y crecer por más de 16 días en leche cruda y pasteurizada, y almacenada a 4°C. Así, De este modo, *L. monocytogenes* desde la década de los 80 ha sido vinculada con grandes brotes de listeriosis transmitidas por productos lácteos (Franco *et al.*, 2002). Un estudio hecho por Kabuki *et al.*, (2004), asoció el crecimiento

de *Listeria* a los quesos frescos latinos elaborados tanto de leche pasteurizada como de leche cruda; del mismo modo, Tomasula *et al.*, (2014), comenta que en Estados Unidos se emplea leche pasteurizada para la eliminación de bacterias patógenas; sin embargo, a pesar de su uso en la fabricación comercial de los quesos frescos, éstos no están exentos de que hayan sido retirados ocasionalmente; debido a la contaminación ambiental por *L. monocytogenes*; por otra parte, la bacteria perteneciente al género de *Salmonella*, ha sido relacionada a la contaminación de los quesos elaborados con leche cruda; causando así, salmonelosis. Esta llega a los quesos por contaminación a partir de las manos del ordeñador, heces de los animales, contaminación del equipo de ordeño, aguas contaminadas y una inadecuada pasteurización (Albarracin *et al.*, 2006). De la misma manera; *S. enteritidis* se le ha implicado con brotes de infecciones por el consumo de quesos blandos estilos mexicano elaborados con leche cruda en Los Angeles, California (MacDonald *et al.*, 2005). Además, a las vacas lecheras se les ha vinculado con ser un reservorio de las bacterias patógenas transmitidas por alimentos; esto incluye a la *Salmonella* spp. (Callaway *et al.*, 2005). Por otra parte; la *E. coli* produce Shiga-toxina, causante de severas enfermedades en humanos, que pueden ser provocadas por intoxicación alimentaria y que han aparecido en todo el mundo; esta bacteria presente en las heces de los bovinos son la mejor fuente de contaminación de los alimentos, especialmente la del serotipo O157:H7 la cual ha sido relacionada en casos de brotes en humanos (Pradel *et al.*, 2008; Espie *et al.*, 2005). La leche cruda es considerada como un medio para la transmisión de este patógeno. También la leche y diferentes productos lácteos, incluyendo los quesos, están relacionados en los brotes de la bacteria de *E. coli* del serotipo O157:H7 (Rodríguez *et al.*, 2004). Cabe mencionar que, aunque la NOM-243-SSA-2010, reporta un máximo permisible de 100 UFC/g de *E. coli*, se ha encontrado que el riesgo de contaminación por el serotipo O157:H7 es alto, porque se requiere una dosis infectiva baja como de 10-20 UCF/g (Bolton *et al.*, 1996).

En el estado de Tabasco la producción de leche fue de 99,599 litros en el año 2014 (SIAP, 2015) y cuenta con 134 queserías registradas (Castro *et al.*; 2007, INEGI 2014). Sin embargo, la manera de la elaboración es un factor de riesgo en la salud, ya que la mayoría de las queserías trabajan sin aplicar las Buenas Prácticas de Manufactura para

la elaboración de los productos lácteos, además, emplean leche cruda para la fabricación de los quesos (Castro *et al.*, 2007). Por otra parte; dentro de los quesos frescos, que son muy aceptados en esta región, están los quesos Crema o Sopero, queso Doble Crema y queso Oaxaca; tanto el queso Crema o Sopero y Doble Crema son caracterizados por pertenecer al grupo de los quesos de pasta blanda, fresca y prensada; en tanto que, al queso Oaxaca, se le clasifica también como fresco de pasta blanda e hilada (Cervantes-Escoto *et al.*, 2008).

Por lo que, el objetivo de este estudio fue aislar y conservar las cepas de bacterias patógenas de *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, con el empleo de los métodos microbiológicos sugeridos por la NOM-243-SSA-2010 y así poder establecer la calidad de la inocuidad microbiológica en los productos de origen lácteos en queserías y expendios pertenecientes al sureste del estado de Tabasco.

## **1.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Muestras.**

Se colectaron 15 muestras de tres tipos de quesos: queso Sopero o Crema, queso Oaxaca, queso Doble Crema; en siete queserías pertenecientes a los municipios de Huimanguillo y Cárdenas, Tabasco.

### **Identificación de las muestras**

Las muestras se compraron en las presentaciones que se expendían, etiquetándose y rotulando con los datos de la hora de recolección, fecha y nombre del expendio o quesería y empacándose en bolsas estériles (ZiplocR), almacenándose de 5-8°C en nevera con hielo para inmediatamente ser llevada al laboratorio de Ingeniería de los alimentos del Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, para ser procesadas con los análisis microbiológicos correspondientes, el mismo día de su recolección.

## **Diseño Estadístico**

La elección de las queserías a muestrear se realizó por un tipo de muestreo no probabilístico por conveniencia. El muestreo se realizó durante la estación de otoño del año 2014 en los meses de octubre a diciembre.

## **Métodos microbiológicos de aislamiento.**

Para la determinación y aislamiento de las bacterias *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* en las muestras de quesos frescos propuestos para esta investigación, se aplicaron los medios de cultivo y las condiciones de aislamiento recomendados por la NOM-243-SSA1-2010. Para el aislamiento de las especies de bacterias estudiadas se realizó un procedimiento de homogenización por 60 segundos en condiciones estériles empleando una licuadora (Osterizer<sup>R</sup>) realizándolo a baja velocidad y seguidamente sometiéndolo a un proceso de enriquecimiento e incubándose en el tiempo y la temperatura indicada en la NOM-243-SSA1-2010 para cada microorganismo. Posteriormente se procedió con la siembra microbiológica mediante estrías en las placas conteniendo el agar sólido selectivo para cada microorganismo a estudiar.

## **Medios de Cultivo**

Los diversos medios de cultivos que se emplearon fueron los siguientes: agua peptonada tamponada (BD Difco<sup>TM</sup>), caldo Lauril sulfato de sodio (BD Bioxon<sup>R</sup>), caldo verde brillante bilis al 2% (BD Bioxon<sup>R</sup>), Mac conkey (BD Bioxon<sup>R</sup>), caldo cistina selenita (BD Difco<sup>TM</sup>), caldo tetrionato (BD Bioxon<sup>R</sup>), agar sulfito bismuto (BD Bioxon<sup>R</sup>), agar verde brillante (VB) (BD Bioxon<sup>R</sup>), agar xilosa lisina dexosicolato (XLD) (BD Bioxon<sup>R</sup>), caldo de soya tripticaseína (BD Bioxon<sup>R</sup>) con 0.6 % de extracto de levadura (BD Bioxon<sup>R</sup>).

## **Análisis microbiológicos para el aislamiento de los microorganismos.**

### ***Escherichia coli.***

Para la determinación y aislamiento de *E. coli* en los quesos, se empleó el método de diluciones en tubos múltiples; el cual está basado en la propiedad de los microorganismos Coliformes de producir gas fermentando lactosa; por lo que se realizó la prueba presuntiva para coliformes. Se preparó una dilución de la muestra con agua peptonada tamponada (BD Difco™) como diluyente, empleando 10 g de muestra de la parte externa e interna del queso en 90 mL del diluyente en frasco de boca ancha, se homogenizó y se transfirió 1 mL a tubos Durham que contenían 9 mL de caldo lauril sulfato de sodio (BD Bioxon<sup>R</sup>) como medio de enriquecimiento selectivo. Se realizaron diluciones desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-3}$ . Los tubos se incubaron entre 24 y 48 h a 35°C (si se obtiene formación de gas en las primeras 24 h, no es necesario esperar 24 h mas). De los tubos que fueron positivos a la formación de gas se tomaron dos asadas y se inoculó por triplicado en los tubos Durham que contenían caldo verde brillante bilis al 2% (BD Bioxon<sup>R</sup>) como medio de confirmación, e incubándose de 24 a 48 h a 35°C. Los tubos que dieron positivos a la formación de gas, fueron sembrados tomando 1 asada y estriando en placas que contenían el medio agar sólido Mac conkey (BD Bioxon<sup>R</sup>) en repeticiones dobles e incubándose a 35°C de 24 a 48 h.

### ***Salmonella spp.***

Se empleó como caldo de preenriquecimiento 225 mL de agua de peptona tamponada al 2 % p/v (BD Difco™), y en un frasco de boca ancha se le agregó 25 g de distintas partes del queso, se homogenizó en licuadora en condiciones estériles y posteriormente se incorporó al frasco de boca ancha e incubó a 35°C por 24 h; seguidamente se inoculó 1 mL del caldo de preenriquecimiento en 6 tubos que contenían 10 mL de caldo cistina selenita (BD Difco™) y otros 6 tubos con 10 mL de caldo tetrionato (BD Bioxon<sup>R</sup>) conteniendo éste 2 mL de una solución de yodo-yoduro 1% por cada 100 mL de caldo de tetrionato (BD Bioxon<sup>R</sup>), para su incubación a 35°C por 24 h. Los tubos que dieron positivos se sembraron por estrías en placas conteniendo los siguientes

medios de cultivo: agar sulfito bismuto (BD Bioxon<sup>R</sup>), agar verde brillante (VB) (BD Bioxon<sup>R</sup>), agar xilosa lisina dexosicolato (XLD) (BD Bioxon<sup>R</sup>) e incubándose a 35 °C por 24 h haciéndose la siembra en placas por repeticiones dobles de cada agar sólido empleado.

### ***Listeria* spp.**

Se realizó un procedimiento de enriquecimiento en el cual se emplearon 25 g de la parte interna y externa del queso depositándose en un frasco de boca ancha que contenía 225 mL de caldo de soya tripticaseína (BD Bioxon<sup>R</sup>) con 0.6 % de extracto de levadura (BD Bioxon<sup>R</sup>) también llamado medio (ASTEL) o medio de enriquecimiento (EB) se homogenizó e incubó a 30°C por 48 h; después del periodo de incubación se tomó una asada y sembró por estrías en placas conteniendo el medio sólido e incubó a 35 °C por 24 horas.

### **Almacenamiento de las cepas.**

Se almacenaron bajo refrigeración a 4°C en medios Mac conkey y medio Astel para *E. coli* y *Listeria*, respectivamente y en verde bilis brillante para *Salmonella* spp.

## **1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En los Cuadros 1 y 2 se reportan el crecimiento microbiológico que estuvo presente en los diversos medios de cultivos empleados. De las 15 muestras de quesos analizados, para el aislamiento de *E. coli*, el 80% presentaron crecimiento en los medios líquidos de caldo lauril sulfato de sodio y caldo verde bilis brillante (Cuadro 2), mostrando el desarrollo de colonias con coloración rosadas-rojizas y la formación del halo transparente; propias de las colonias de *E. coli*, en medio sólido Mac conkey como reporta Pérez *et al.*, (2003). En tanto que las muestras 08, 09 y 10; pertenecientes a los quesos tipo Crema o Soper, Doble Crema y Oaxaca respectivamente; que corresponden a una misma quesería; no presentaron formación de gas debido al nulo

desarrollo de microorganismos fermentadores de lactosa, por lo que; fueron descartadas para ser sembradas en el medio sólido Mac conkey; aunque se consideraron como negativas a *Escherichia coli*, si fueron positivas a la presencia de *Salmonella* spp. y *Listeria* spp.; esta incidencia encontrada de *Escherichia coli* es similar a la reportada en queso fresco artesanal mexicano por Díaz-Cinco *et al.*, (1998); A pesar de que la NOM-243-SSA1-2010 especifica un límite permisible para la presencia de *Escherichia coli* de  $\leq 100$  UFC/gr o mL en quesos frescos, se obtuvieron cuentas de este microorganismo mayores a los límites permitidos, las cuales rebasaban las 150 UFC/g en el 80% de las muestras, en la determinación de esta bacteria; sin embargo, Hassanien *et al.*, (2014) comenta que el riesgo de adquirir una infección por *Escherichia coli* es alta, ya que una dosis baja de 10 a 20 UFC/g de la *Escherichia coli* del serotipo O157H7 es suficiente para provocar severos daños a la salud; además el desarrollo de la bacteria de *Escherichia coli* se detectó tanto en quesos comprados directamente en el lugar de producción (queserías) y en los quesos que se adquirieron de expendios, por otra parte, la determinación del crecimiento de *Salmonella* estuvo presente en los tres tipos de medios empleados en un (15/15) 100% de las muestras analizadas; presentando características específicas en cada uno de los medios de crecimiento seleccionados, así por ejemplo; en el medio selectivo VB, presentaron coloración roja del medio las muestras: 01, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 (Cuadro 1) característica de las bacterias de *Salmonella* spp, según lo reportan BD<sup>R</sup>; las demás bacterias coloreaban el medio de color amarillo. En tanto que las muestras 01, 07, 08, 09, 11, 12 y 13, inoculadas en medio SB, presentaron colonias negras con brillo metálico. Las muestras 10,14, 04, 06, 15, 02, crecieron colonias de color verde, gris y marrón; características morfológicas propias de las bacterias de *Salmonella*, tal como lo reporta (Soto *et al.*, 2014). Asimismo, las muestras sembradas en el medio solido XLD que presentaron características morfológicas iguales a las bacterias de *Salmonella* fueron 08, 10, 11, 13, 15 (Cuadro 1); respecto a este microorganismo la NOM-243-SSA1-2010, especifica que el crecimiento de *Salmonella* spp. en los quesos frescos debe de estar ausente, por lo que el 100% de las muestras de quesos frescos analizadas están fuera de especificación por que presentan el desarrollo de este patógeno y por lo tanto son consideradas como no seguras para su consumo. En el

medio de cultivo para *Listeria* spp., las 15 muestras analizadas presentaron crecimiento (Cuadro 2); lo cual es indicativo del crecimiento y desarrollo de bacterias enteropatógenas, la NOM-243, estipula que en quesos frescos la *Listeria* spp. debería estar ausente.

**Tabla 1. Crecimiento en placa presentado en los tres tipos de quesos frescos; Empleando medios selectivos y diferenciales para *Salmonella* spp**

Quesería de procedencia	Muestra	Tipo de queso	Lugar de colecta (expendio/quesería)	Medios para <i>Salmonella</i> spp.		
				VB <sup>1</sup>	XLD <sup>2</sup>	SB <sup>3</sup>
1	01	Doble Crema	Expendio	+	+	+
2	02	Doble Crema	Expendio	+	+	+
1	03	Sopero	Expendio	+	+	+
1	04	Oaxaca	Expendio	+	+	+
3	05	Doble Crema	Quesería	+	+	+
3	06	Sopero	Expendio	+	+	+
3	07	Oaxaca	Quesería	+	+	+
4	08	Doble Crema	Quesería	+	+	+
4	09	Sopero	Quesería	+	+	+
4	10	Oaxaca	Quesería	+	+	+
5	11	Doble Crema	Expendio	+	+	+
5	12	Oaxaca	Expendio	+	+	+
6	13	Oaxaca	Expendio	+	+	+
7	14	Doble Crema	Expendio	+	+	+
7	15	Oaxaca	Expendio	+	+	+

VB<sup>1</sup> agar verde bilis brillante.

XLD<sup>2</sup> agar xilosa lisina dexosicolato.

SB<sup>3</sup> agar sulfito bismuto.

+ Crecimiento positivo

**Tabla 2. Crecimiento en placa presentado en los tres tipos de quesos frescos; empleando medios selectivos y diferenciales para *E. coli* spp. y *Listeria* spp.**

Quesería de procedencia	Muestra	Tipo de queso	Lugar de colecta (expendio/quesería)	Medio para <i>E. coli</i> spp.	Medio para <i>Listeria</i> spp.
				Mac conkey	ASTEL <sup>4</sup>
1	01	Doble Crema	Expendio	+	+
2	02	Doble Crema	Expendio	+	+
1	03	Sopero	Expendio	+	+
1	04	Oaxaca	Expendio	+	+
3	05	Doble Crema	Quesería	+	+
3	06	Sopero	Expendio	+	+
3	07	Oaxaca	Quesería	+	+
4	08	Doble Crema	Quesería	No sembrada	+
4	09	Sopero	Quesería	No sembrada	+
4	10	Oaxaca	Quesería	No sembrada	+
5	11	Doble Crema	Expendio	+	+
5	12	Oaxaca	Expendio	+	+
6	13	Oaxaca	Expendio	+	+
7	14	Doble Crema	Expendio	+	+
7	15	Oaxaca	Expendio	+	+

+ Crecimiento positivo

ASTEL<sup>4</sup> agar soya de tripticaseína con extracto de levadura al 0.6%

#### 1.4. CONCLUSIONES

En lo que respecta a la presencia de *Escherichia coli* en el 80% de las muestras estuvo presente el crecimiento de esta bacteria, rebasando los límites permitidos por la NOM-243-SSA1-2010; lo cual los hace no seguros para su consumo; a pesar de que las muestras 08, 09, 10 se consideran negativas a la presencia de este microorganismo patógeno, no se descartan como inocuas, ya que, dieron positivo a la presencia de *Salmonella* spp. y *Listeria* spp.; En cuanto a la presencia de *Salmonella* spp. se detectó en el 100% de las muestras, lo cual indica que los quesos de los tipos Sopero o Crema, Doble Crema y Oaxaca, representan un riesgo para las salud por su consumo, ya que

la *Salmonella* provoca salmonelosis. Así mismo, el crecimiento y desarrollo de la bacteria en el medio de cultivo ASTEL recomendado por la NOM-243 para *Listeria* spp. estuvo presente en el 100% de las muestras, además de que para este microorganismo la NOM-243 establece que debe estar ausente. En general podemos concluir que el crecimiento de las bacterias aquí estudiadas es indicativo de una contaminación de bacterias enteropatógenas y que rebasan los límites permisibles y que todas ellas son caracterizadas por causar enfermedades gastrointestinales; y en consecuencia consumir quesos frescos representa un riesgo para la salud; aunque el crecimiento y desarrollo de bacterias enteropatógenas es evidente en los tipos de quesos estudiados sería conveniente realizar otros estudios microbiológicos como la carga microbiana del ambiente y también de la leche, para así poder establecer recomendaciones en las BPM (Buenas Prácticas de Manufactura y BPO (Buenas Prácticas de Ordeña) y con ello detectar todos los posibles puntos de contaminación en la cadena de producción de los Quesos Frescos; también con los resultados obtenidos muestran que los quesos no son contaminados postproducción si no que aun los quesos comprados directamente de queserías presentaron crecimientos microbianos considerables.

## **AGRADECIMIENTOS**

Javier Custodio-Hernández es becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y alumno de la Maestría en Ciencias en Producción Agroalimentaria en el Trópico del Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco.

## **1.5. LITERATURA CITADA**

Albarracín, F. Y.; Sarmiento, P.; Carrascal A. K.; Mercado, M. (2006). “Estimación de la proporción de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp en quesos frescos (queso de hoja, cuajada) y queso Doble Crema producidos y comercializados en el Municipio de Pamplona, Norte de Santander”. Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. 4 (2): 30-41.

- Beresford, T. P.; Fitzsimons, N.A.; Brennan, N. L.; Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal* 11: 259–274.
- Callaway, T. R.; Keen, J. E.; Edrington, T. S.; Baumgard, L. H.; Spicer, L.; Fonda, E. S.; Griswold, K. E.; Overton, T. R.; Van Amburgh, M. E.; Anderson, R. C.; Genovese K. J.; Poole T. L.; Harvey R. B.; Nisbet, D. J. (2005). Fecal Prevalence and Diversity of *Salmonella* Species in Lactating Dairy Cattle in Four States. *Journal of Dairy Science* 88: 3603–3608.
- Castro-Georgana, V.; Díaz-Rodríguez A. M.; Torres-Torres, B. (2007). Análisis de la calidad sanitaria de las queserías y los quesos en el Estado de Tabasco en el periodo del 2002-2005. *Salud en Tabasco*. 3 (1): 560-567.
- Diaz-Cinco, M.; Acedo, E.; Leon DA. (1998). Survival of *Brucella abortus* in Mexican whites soft cheese processing. *Recent Res Dev Nutr Res*. 2: 47–57.
- Espie, E.; Vaillant, V.; Kurkdjian, P. M.; Grimont, F.; Schaller, R. M.; De Valk; H.; Rozand, C. V. (2005). *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. *Epidemiol. Infect.* 134:143–146.
- Cervantes-Escoto, F.; Villegas-de Gante, A.; Cesín-Vargaz, A.; Espinoza-Ortega, A. (2008). Los quesos genuinos mexicanos patrimonio cultural que debe rescatarse. Universidad Autónoma de Chapingo. 1ª. Edición. Mexico, D.F.: Mundi-Prensa.
- Franco, C. M.; Menéndez, S.; Quinto, E. J.; Fente, C. A.; Vázquez, B. I.; Domínguez, L.; Cepeda, A. (2002). Evolución de *L. monocytogenes* y *L. Innocua* durante la elaboración y madurado del queso tipo "Arzúa": efecto del tratamiento con sorbato potásico. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 3(4): 236-240.

Hassanien, R. M. F.; Mahgoub, S. A.; El-Zahar, K. M. (2014). Soft cheeses supplemented with black cumin oil: Impact on food borne pathogens and quality during storage. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 21:280-288.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2015). Elaboración de derivados y fermentos lácteos. Directorio Estadístico Nacional de Unidades Económicas. [<http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mapa/denue/Cuantificar.aspx>. Consultado: 12 de septiembre del 2015.]

Janda, J. M., Abbott, S. L., (2005). The Family Enterobacteriaceae. In Emanuel Goldman, E., Green, L. H. (Eds.), *Practical Handbook of Microbiology* (2 da ed., pp.217 - 228). New York: Taylor & Francis Group.

MacDonald, P. D. M.; Whitwam, R. E.; Boggs, J. D.; MacCormack, J. N.; Anderson, K L.; Reardon, J. W.; Saah, J. R.; Graves, L. M.; Hunter, S. B.; Sobel J. (2005). Outbreak of Listeriosis among Mexican Immigrants as a Result of Consumption of Illicitly Produced Mexican-Style Cheese. *The Infectious Diseases Society of America*. 40:677–82

Miranda, J. M.; Mondragón, A.; Vázquez, B. I.; Fente, C. A.; Cepeda, A.; Franco, C. M. (2009). Microbiological quality and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from conventional and organic “Arzuá-Ulloa” cheese. *CyTA – Journal of Food*. 7 (2): 103–110.

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

NORMA Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos.

SAGARPA, Boletín de leche enero-marzo 2014. Pp.1-67

Saxer, S.; Miescher Schwenninger, S.; Lacroix, Ch. (2013). Characterization of the microflora of industrial Mexican cheeses produced without added chemical preservatives. *LWT – Food Science and Technology*. 53. pp. 314-320.

Soto-Beltran, M.; Gerba, Ch. P.; Porto-Fett, A.; Luchansky, J.B.; Chaidez, C. (2015). Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from small Mexican retail markets of queso fresco. *International Journal of Environmental Health Research*. 25 (2): 140-148.

Rodriguez, E.; Arques, L. J.; Nuñez, M.; Gaya, P.; Medina, M. (2005). Combined Effect of High-Pressure Treatments and Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria on Inactivation of *Escherichia coli*O157:H7 in Raw-Milk Cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 71(7):339-340.

Pradel, N.; Bertin, Y.; Martin, Ch.; Livrelli, V. (2008). Molecular Analysis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Hemolytic-Uremic Syndrome Patients and Dairy Samples in France. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(7): 2118–2128.

Perez Reytor, D. C.; Campos Ramos, L. Y.; Domínguez Vázquez, I.; Sosa Espinosa, A., E. (2003). Verificación rápida de la pureza microbiológica de bancos de *Escherichia coli* K12. *Biotecnología Aplicada* 20:231-237.

- Kabuki, D. Y.; Kauye A. Y.; Wiedmann, M.; Boor, K.J. (2004). Molecular Subtyping and Tracking of *Listeria monocytogenes* in Latin-Style Fresh-Cheese Processing Plants. *Journal Dairy Science*. 87:2803–2812
- Omiccioli, E.; Amagliani, G.; Brandi, G.; Bruce, I. J.; Magnani, M. (2009). Simultaneous direct detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* o157 in milk samples by magnetic extraction and multiplex PCR. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*. 17:195–213.
- Villanueva-Carvajal, A.; Esteban-Chavez, M.; Espinoza-Ortega, A.; Arriaga-Jordan, C. M.; Dominguez-Lopez, A. (2012). Oaxaca cheese: Flavour, texture and their interaction in a Mexican traditional pasta filata type cheese. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 10:63–70.

## **CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS EN QUESOS FRESCOS MEDIANTE PCR PROBANDO DIFERENTES CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN**

J. Custodio- Hernández<sup>a</sup>, E. Hernández-Domínguez<sup>b</sup>, A. Contreras- Oliva<sup>c</sup>, R. A. Valdez-Ojeda<sup>d</sup>, L. M. Vargas- Villamil<sup>a</sup>, J. M. Zaldívar-Cruz<sup>a\*</sup>,

<sup>a</sup>Colegio de Postgraduados, Campus-Tabasco. Periférico Carlos A. Molina Km 3.5. Carretera Cárdenas Huimanguillo. H. Cárdenas Tabasco. C.P 86500.

<sup>b</sup>Instituto Tecnológico Superior de Acayucan. Carretera Costera del Golfo Km 216.4. Col. Michapan. Acayucan, Veracruz. C.P. 96100.

<sup>c</sup>Colegio de Postgraduados Campus Córdoba. Carretera Fed. Córdoba-Veracruz; Km 348 Congregación Manuel León, Amatlán de los Reyes, Ver. Cordoba, Veracruz. C.P. 94946.

<sup>d</sup>Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida Yucatán. C.P. 97200

### **RESUMEN**

Los quesos frescos son muy consumidos en países de América Latina en un 80%; pero representan un riesgo para la salud humana, ya que su elaboración es de manera artesanal y con los mínimos cuidados de higiene, además de que son elaborados con leche sin pasteurizar. Diversas son las bacterias patógenas que sean relacionado a su crecimiento en los productos de leche y a los quesos frescos; en el estado de Tabasco se producen una variedad de quesos frescos, y tienen gran aceptación entre los consumidores, por con el fin de evaluar la inocuidad microbiológica de 3 tipos de quesos frescos (Sopero, Doble crema, Oaxaca) provenientes de 7 queserías asentadas en la región Sureste del estado de Tabasco (Región de la Chontalpa), se realizó la identificación y detección por la técnica de PCR a los 42 aislados microbiológicos, que fueron previamente obtenidos por los métodos de aislamientos de la NOM-243-SSA-2010 para las bacterias patógenas de *Escherichia coli* spp., *Salmonella* spp. y *Listeria* spp.; para lo cual se seleccionaron 3 pares de Primers que amplificaron un fragmento de ADN del gen de interés de las bacterias en estudio, quedando de la siguiente

manera JSAF y JSAR amplifica para el gen *InvA* de *Salmonella enterica*., JLIF y JLIR, que amplifica para el gen *hlyA* perteneciente a *Listeria monocytogenes*, JECF y JECR amplifican al gen *RfbE* de la *Escherichia coli* O157; por lo que, en este estudio, los 42 aislados microbiológicos fueron probados a diferentes condiciones de amplificación en las reacciones de PCR y empleando 3 protocolos de extracción de ADN, para buscar su identificación y detección; obteniéndose un amplificado débil del aislado L01 correspondiente a *Listeria monocytogenes*, además se obtuvieron amplificados de banda débil en dos aislados: S13, S14; pertenecientes a *Salmonella enterica*.

**Palabras clave:** Quesos frescos, bacterias patógenas, PCR, Primers, inocuidad microbiológica.

## **ABSTRACT**

fresh cheeses are very consumed in countries of Latin american in a 80%; but they represent a risk to human health, since its production is handmade and with minimum care of hygiene, besides that they are made with milk unpasteurized. various are the pathogenic bacteria that are related to their growth in milk products and fresh cheeses; a variety of fresh cheeses are produced in the State of Tabasco, and have great acceptance among consumers, by in order to evaluate microbiological 3 kinds of fresh cheese safety (Sopero, Doble crema, Oaxaca) 7 cheese factories in the Southeast region of the State of Tabasco (the chontalpa region), from was the identification and detection by PCR technique to the microbiological isolates 42, which were previously obtained by isolates of the NOM-243-SSA-2010 methods for pathogenic bacteria of *Escherichia coli* spp., *Salmonella* spp. y *Listeria* spp.; were selected for which 3 pairs of primers that amplified a fragment is selected for which DNA of the gene of interest in study of bacteria, leaving follows JSAF and JSAR amplifies to the gene *InvA* of salmonella enterica., JLIF and JLIR, which amplifies for belonging to listeria monocytogenes *hlyA* gene, JECF and JECR amplified gene of *Escherichia coli* O157 *RfbE*; so, in this study, the microbiological isolates 42 were tested at different conditions of pcr amplification reactions and using 3 DNA extraction protocols, to find its

identification and detection; obtaining a weak of the isolated corresponding to listeria monocytogenes L01 amplified, also were amplified weak band in two isolated: S13, S14; belonging to salmonella

**Keywords:** fresh cheeses, pathogenic bacteria, PCR, primers, microbiological safety.

## 2.1. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos patógenos transmitidos por los alimentos pueden ser: bacterias, virus y hongos, así como también un número considerable de parásitos, los cuales también son capaces de contaminar a los seres humanos por la vía del agua (Xihong *et al.*, 2013). Particularmente en los lácteos, las bacterias del tipo *Escherichia coli* O157H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp han sido consideradas como las más dañinas en cuanto a la salud pública se refiere (Omiccioli *et al.*, 2012). Arrese y Arroyo (2012), han vinculado el desarrollo de *L. monocytogenes* en quesos elaborados con leche cruda. Por otro lado, *E. coli*, es causante de infecciones diarreicas y colitis hemorrágica; además produce la toxina shiga. Esta bacteria es ampliamente distribuida en todo el mundo y encontrada en las heces de los bovinos. El serotipo mayormente asociado a brotes de enfermedades es la del tipo O157:H7 (Pradel *et al.*, 2008). Los métodos microbiológicos convencionales de detección e identificación para microorganismos patógenos transmitidos por los productos lácteos, requieren del empleo de medios de enriquecimiento selectivos y diferenciales (Jeyasekaran *et al.*, 2011; NOM-243-SSA-2010; Pradel *et al.*, 2008), lo cual hace que sean tardados y laboriosos. Por ejemplo, para detectar la presencia o ausencia de *Listeria*, se requieren más de 5 días en su aislamiento y días adicionales para identificar la especie (Amagliani *et al.*, 2004); En tanto que para el aislamiento de *E. coli*. se requieren de 3 a 4 días y más de 3 días para identificar la especie (Kasnowski *et al.*, 2008); Así mismo, para el aislamiento e identificación de la *Salmonella* se requiere un procedimiento de cuatro etapas básicas y tarda de 3 a 7 días, siendo así una labor intensa y laboriosa (Löfström *et al.*, 2009)., De allí que se requieran métodos rápidos de detección en patógenos transmisores de enfermedades por los alimentos; como los basados en los ácidos nucleicos que reducen grandemente el factor tiempo (Valderrama *et al.*, 2015), y que además ofrecen especificidad y sensibilidad en la detección de microorganismos patógenos que son transmitidos por los alimentos (Amagliani *et al.*, 2004, Kotzekidou y Parthena., 2013). El método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es la técnica más conocida y establecida de amplificación de ácidos nucleicos para la detección de microorganismos patógenos (Zhao *et al.*, 2014). La técnica de PCR amplifica una copia

o pocas de DNA en varias órdenes de magnitud, los experimentos basados en PCR son extensivamente usados para evaluar la presencia o ausencia de los microorganismos patógenos en los alimentos (Valderrama *et al.*, 2015). Por ejemplo, algunas de las aplicaciones de PCR en la detección de *Listeria* en quesos blanco criollo, es la que reporta Merida *et al.*, (2010), en donde se identificaron muestra positivas a *Listeria*. Asimismo, Pradel *et al.*, (2008), empleo la técnica de PCR para detectar *E. coli* en muestras de leche, del mismo modo, se reportan estudios de detección de *Salmonella* por PCR en quesos frescos por los siguientes autores Soto-Beltrán *et al.*, (2015), Albarracin *et al.*, (2006). Por lo que el objetivo de este estudio fue identificar y detectar la presencia de bacterias patógenas en los aislados microbiológicos previamente obtenidos por los métodos de aislamiento microbiológico de la NOM-243-SSA-2010 de quesos frescos; mediante el empleo de diferentes condiciones de amplificación, y probando 3 métodos de extracción de ADN para realizar las Reacciones de PCR.

## **2.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Muestras de Cultivos bacterianos**

Se emplearon 42 aislados microbiológicos de muestras de quesos frescos; Estos materiales fueron trasladados al laboratorio del Instituto Tecnológico de Acayucan del municipio de Acayucan, Veracruz en donde se realizaron los experimentos de biología molecular, ver Tabla 3.

**Tabla. 3 Muestras de quesos colectados y nomenclatura de aislados microbiológicos para confirmación por PCR.**

Número de muestra	Tipo de queso	Quesería de procedencia	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>	<i>Escherichia coli</i>
01	Doble	Q 1	S01	L01	E01
02	Doble	Q 2	S02	L02	E02
03	Sopero	Q 1	S03	L03	E03
04	Oaxaca	Q 1	S04	L04	E04
05	Doble	Q 3	S05	L05	E05
06	Sopero	Q 3	S06	L06	E06
07	Oaxaca	Q 3	S07	L07	E07
08	Doble	Q 4	S08	L08	**
09	Sopero	Q 4	S09	L09	**
10	Oaxaca	Q 4	S10	L10	**
11	Doble	Q 5	S11	L11	E11
12	Oaxaca	Q 5	S12	L12	E12
13	Oaxaca	Q 6	S13	L13	E13
14	Doble	Q 7	S14	L14	E14
15	Oaxaca	Q 7	S15	L15	E15

\*\*No presentes en muestras

### Selección de Primers u oligonucleótidos

Para el diseño y la síntesis de los Primers, se realizó una búsqueda y revisión de artículos publicados, en donde se reporta la detección e identificación de las bacterias patógenas del interés de este estudio; Designando los pares de Primers selectivos que codifican para los genes del serotipo O157H7 (*rfbE*), invasión (*InvA*), listeriolisina O (*hlyA*) pertenecientes a las bacterias *Escherichia coli* O157, *Salmonella entérica* y *Listeria monocytogenes*; respectivamente., La secuencia de los primers seleccionados se mandaron a sintetizar a (Sigma Aldrich<sup>R</sup>), los cuales son reportados en la Tabla 4.

**Tabla 4. Primers empleados en las reacciones de PCR para amplificación de ADN de bacterias patógenas en estudio.**

Microorganismo	Gen	Nombre	Primers u Oligonucleótido	Tamaño (pb)	Fuente
<i>Salmonella enterica</i>	<i>InvA</i>	JSAF	5'-CGCGGCCCGATTTTCTCTGGA-3'	321	Khan <i>et al.</i> , 2007.
		JSAR	5'-AATGCGGGGATCTGGGCGACAAG-3'		
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>hlyA</i>	JLIF	5'-TTGCCAGGAATGACTAATCAAG-3'	172	Amagliani <i>et al.</i> , 2004.
		JLIR	5'-ATTCAGTGAAGCCATTTTCGTC-3'		
<i>Escherichia coli</i> 0157	<i>rfbE</i>	JECF	5'-TGGCATGACGTTATAGGCTAC-3'	217	Omiccioli <i>et al.</i> , 2008
		JECR	5'-CCTCTGCGGTCCTAGTTAGA-3'		

### Reactivos químicos

Los reactivos empleados en las reacciones de PCR son: Loading Buffer, DNTPS, Accu Taq LA DNA polimerase, Accu Taq LA 10X Buffer, 10X Buffer, Red Taq DNA polimerase, marcador de peso molecular; bromuro de etidio, gel de agarosa, fenol saturado, cloroformo, Trizma hydrochloride, ácido acético glacial, bromuro de etidio, EDTA, Primers u oligonucleótidos; alcohol etílico, alcohol isoamilico, agua tetradestilada todos se adquirieron de (Sigma–Aldrich<sup>R</sup>), todos estos reactivos son de grado biología molecular.

### Métodos de extracción de los templados de ADN

Para la extracción y purificación del ADN templado (ADN molde), provenientes de los 42 aislados microbiológicos de los 3 tipos de quesos frescos: Oaxaca, Doble Crema, Soper o Crema; para ser amplificados por la reacción in vitro de PCR, se probaron 3 protocolos diferentes de extracción y purificación del ADN molde, utilizando cultivos

microbiológicos de no más de 1 día de inoculación. Estos métodos fueron probados con diferentes condiciones de amplificación en la estandarización de las reacciones de PCR.

### **Protocolo 1: Extracción de ADN por el método físico-mecánico.**

El ADN genómico se extrajo por el método descrito por Amagliani *et al.*, (2004), sometiendo las células a una lisis celular. Se extrajo una asada del cultivo microbiológico de interés, depositándola en el fondo de un tubo Eppendorf<sup>R</sup> de 2 mL conteniendo 1.5 mL de agua estéril, para posteriormente someterse al calentamiento a 100°C por un tiempo de 10 min, inmediatamente después se sometieron a 4°C por 5 min para ser centrifugada a 13000 g a 4°C por 5 min en un centrifuga (BIO RAD 300), posteriormente el debri fue eliminado en el pellet formado. El líquido claro sobrenadante es el ADN genómico de interés el cual se diluyó en 100 µL de agua estéril; para almacenarse a -20°C.

### **Protocolo 2: Extracción de ADN por método mejorado Fenol/Cloroformo.**

Se depositó una UFC de los aislados microbiológicos en 3 mL de caldo Luria Bertani (LB) en tubos con tapa de 10 mL, agitándose a 270 rpm a 37°C por 19 h en un agitador (311SD Labnet<sup>R</sup>), posteriormente se obtuvo y se recuperó el pellet por centrifugación a 13,000 g a 10°C por 2 min, se lavó el pellet dos veces con 400 µL de Buffer STE (100 mM NaCl, 10 mM Tris Cl pH 8.0 y 1 mM EDTA), después de cada lavado, nuevamente se centrifugó a 13,000 g por 2 min, posteriormente se volvió a resuspender el pellet en 200 µL de Buffer TE (10 mM Tris Cl pH 8.0, 1 mM EDTA), se mezcló por 60 s en Vortex con 125 µL de Fenol saturado (Sigma Aldrich<sup>R</sup>), se centrifugaron las muestras a 13,000 g a 4°C por 5 min, se mantuvo en hielo y se transfirió 160 µL de la fase acuosa a un tubo Eppendorf<sup>R</sup> de 1.5 mL. Se adicionaron 40 µL de Buffer TE, 100 µL de Cloroformo y se sometió a centrifugación de 13,000 g a 4°C por 5 min, este último proceso se repitió varias veces hasta que no se obtuvieron anillos blancos entre fase y fase, y el último paso se transfirió los 160 µL a un nuevo tubo Eppendorf<sup>R</sup> de 1.5 mL, para su almacenamiento a -20°C y este es ADN de interés. (Cheng y Jiang 2006).

### **Protocolo 3. Extracción de DNA por el método CTAB-modificado.**

Los aislados microbiológicos fueron sometidos para aumentar su densidad celular en tubos de cultivo de 10 mL, los contenían 3 mL de medio líquido Luria Bertani (LB) (Sigma Aldrich<sup>R</sup>) y se inoculó el cultivo celular con asa de Platino en condiciones estériles. Los tubos una vez inoculados con el microorganismo fueron sometidos a agitación en un equipo (Shaker 311SD Labnet) a 270 rpm a 37°C por 15 horas. Se trabajó primero con los aislados microbiológicos provenientes del medio Astel. Una vez obtenido el crecimiento celular los tubos se mantuvieron a 4°C, para posteriormente centrifugar a 5000 g a 4°C por 5 min. La pastilla obtenida se resuspendió en 400 µL de TE 1X (pH 8); seguidamente se inactivaron las bacterias a 100°C por 5 min y dejó enfriar a temperatura ambiente. Se adicionaron 50 µL de lizozima (Sigma Aldrich<sup>R</sup>) en una concentración de 10 mg/mL, se agitó e incubó a 37°C por 1 h en incubadora (Felisa<sup>R</sup>). Se adicionaron 75 µL de SDS al 10%, se agitó e incubó a 65°C por 10 min y posteriormente se añadieron 125 µL de NaCl (Sigma Aldrich<sup>R</sup>) al 4 M y agitó. Se agregaron 100 µL de CTAB/NaCl y agitó hasta que la solución tomó una consistencia viscosa e incubó a 65°C durante 10 min. Luego se calentó 5 min en agua hirviendo, y adicionaron 650 µL de fenol cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) (Sigma Aldrich<sup>R</sup>) se mezcló en Vortex para hacer una solución homogénea y centrifugó a 13,000 g a 4°C por 5 min. Se transfirieron 650 µL del sobrenadante a un tubo de Eppendorf de 1.5 mL y adicionaron 300 µL de alcohol isopropílico, se dejó reposando la mezcla a -20°C durante 30 min y posteriormente se centrifugó a 10,000 g a 4°C por 5 min, se descartó el sobrenadante, posteriormente se adicionaron 1 mL de etanol frío al 100% a -20°C, a la pastilla formada y se centrifugó a 13,000 g a 4°C por 5 min para posteriormente descartar el sobrenadante. Este último paso se repitió con etanol al 75%, después se secó a temperatura ambiente durante 10 minutos y por último se disolvió en 100 µL agua destilada estéril; y se almacenó el ADN a -20°C, hasta su uso en la reacción de PCR (Morales *et al.*, 2004).

## **Condiciones de amplificación**

Para las condiciones de amplificación se probaron 5 reacciones modificando condiciones de amplificación y reactivos; además que el ADN molde empleado en los ensayos de PCR, fueron extraídos por tres protocolos de extracción; la mezcla de los reactivos y los tiempos y temperaturas de la PCR se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5. Condiciones de amplificación y mezcla de reactivos en los ensayos de PCR.**

Número de Reacción	Condiciones de PCR	Mezcla de Reactivos (50 µL de Reacción)		
		Volumen	Reactivo	Concentración final
Reacción	95°C por 2 min, 35 ciclos de: 95°C por 30 s, gradiente de temperatura de alineamiento de 50- 65°C por 1 min, 68°C por 2 min, y una extensión final de 72°C por 5 min.	1 µL	AccuTaq LA Polyimerase (5U/ µL)	5U
		1 µL	dNTP mix (10 mM)	200 µM
		1 µL	ADN molde	s/c
		1 µL	Primer (F) 10 µM	0.2 µM
		1 µL	Primer (R) 10 µM	0.2 µM
		1 µL	MgCl <sub>2</sub> 25 mM	0.5 mM
		5 µL	AccuTaq LA 10X Buffer	1X
		39 µL	H <sub>2</sub> O Tetradestilada	s/c
Reacción 2	95°C por 2 min, 35 ciclos de: 95°C por 30 s, se empleó una temperatura de alineamiento de 53°C por 1 min, 68°C por 2 min, y una extensión final de 72°C por 5 min.	1 µL	AccuTaq LA Polyimerase (5U/ µL)	5U
		1 µL	dNTP mix (10 mM)	200 µM
		1 µL	ADN molde	s/c
		1 µL	Primer (F) 10 µM	0.2 µM
		1 µL	Primer (R) 10 µM	0.2 µM
		5 µL	AccuTaq LA 10X Buffer	1X
		40 µL	H <sub>2</sub> O Tetradestilada	s/c
		Reacción 3	95°C por 2 min, 35 ciclos de 95°C por 30 s, gradiente de temperatura de alineamiento de 50- 65°C por 1 min, 68°C por 2 min, y una extensión final de 72°C por 5 min.	1 µL
1 µL	dNTP mix (10 mM)			200 µM
1 µL	ADN molde			s/c
1 µL	Primer (F) 10 µM			0.2 µM
1 µL	Primer (R) 10 µM			0.2 µM
5 µL	AccuTaq LA 10X Buffer			1X
40 µL	H <sub>2</sub> O Tetradestilada			s/c
Reacción 4	95°C por 2 min, 35 ciclos de 95°C por 30 s, gradiente de temperatura de alineamiento de 50- 65°C por 1 min, 68°C por 2 min, y una extensión final de 72°C por 5 min.			1 µL
		1 µL	dNTP mix (10 mM)	200 µM
		1 µL	ADN molde	s/c
		1 µL	Primer (F) 10 µM	0.2 µM
		1 µL	Primer (R) 10 µM	0.2 µM
		5 µL	AccuTaq LA 10X Buffer	1X
		40 µL	H <sub>2</sub> O Tetradestilada	s/c
		Reacción 5	95°C por 2 min, 30 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 1.5 min, y una extensión final de 72°C por 5 min.	2.5 µL
1 µL	dNTP mix (10 mM)			200 µM
1 µL	ADN molde			s/c
1 µL	Primer (F) 10 µM			0.2 µM
1 µL	Primer (F) 10 µM			0.2 µM
5 µL	10X Buffer			1X
38.5 µL	H <sub>2</sub> O Tetradestilada			s/c

s/c (sin cuantificar)

## Visualización de los productos de amplificación.

Los productos de amplificación fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% (BIO RAD<sup>R</sup>) teñido con bromuro de etidio (Sigma Aldrich<sup>R</sup>) 0.5 mg/mL según la metodología de (Sambrook *et al.*, 2001), para lo cual se mezclaron 6 µL ADN de la muestra con 2 µL de agua tetradestilada y 2 µL loading buffer (Sigma Aldrich<sup>R</sup>), inyectándose a los pozos de un gel de agarosa. La electroforesis se corrió a 90 V con amortiguador TAE (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA pH 8.0); los geles fueron visualizados en un transluminador UV (Gel Doc<sup>TM</sup> XR+ System, BiO RAD)

### 2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Ensayos de PCR realizados a los ADN de los aislados microbiológicos.

##### Identificación de *Listeria* (L01)

Los resultados obtenidos en la amplificación del ADN molde extraído de L01 con el Protocolo 1, y realizado con la reacción de PCR 1, presentaron amplificación con T<sub>m</sub> (temperatura de alineamiento) de 52.9°C, tal como se muestra en la Figura 1.



Figura 1. Amplificación de ADN perteneciente a *Listeria* (L01), empleando gradiente de temperatura de alineamiento de (50°C a 65°C) Pozos 1:50°C, Pozo 3: 52.9°C (en los 8 carriles contenía el ADN amplificado de L01 perteneciente a *Listeria monocytogenes*) Identificación de *Listeria* de 10 aislados

Por lo que se experimentó una reacción de PCR con 10 aislados microbiológicos (L01, L02, L04, L06, L07, L09, L10, L11, L12, L13) considerados como presuntivas bacterias de *Listeria*, bajo las mismas condiciones a la que amplifiqué la muestra 1, empleando como control positivo a la muestra 1 y control negativo agua tetradestilada, y un marcador de peso molecular de 1 Kb (Sigma Aldrich<sup>R</sup>) no obteniéndose alguna amplificación de los 12 templates de DNA como se muestra en la figura 2.

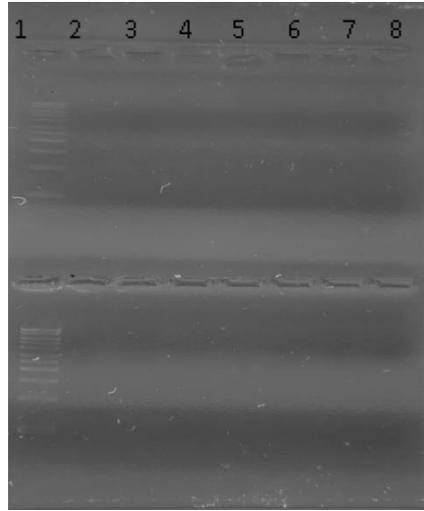


Figura 2. Amplificación de muestras de ADN de *Listeria* 11 aislados. Pozos (primer peine). 1: Marcador de PM de 1 Kb. 2: control negativo (agua tetradestilada), 3: control positivo (L01), 4:L02, 5:L03, 6:L04, 7:L05, 8:L06 Pozos (Segundo peine). 1: Marcador de PM de 1 Kb. 2: control negativo, 3: control positivo (L01), 4: L07, 5:L08, 6:L09, 7:L10, 8:L11

### **Identificación de *Listeria* (L01)**

Se realizó otro experimento de PCR empleando un total de 12 tubos eppendorf y un gradiente de temperatura de 50-65°C. En donde los primeros 8 tubos de reacción se empleó una Taq sintetizada en el Laboratorio obtenida con la metodología de (Desai *et al.*, 1995); Los tubos de reacción restantes (4 tubos) se prepararon con AccuTaq DNA Polymerase (Sigma Aldrich<sup>R</sup>); en este experimento se empleó el ADN molde del aislado L01 correspondiente a presuntiva *Listeria* todos los demás reactivos de la reacción fueron los mismos que se describen en el protocolo de la Reacción 1, pero no se visualizó amplificación según se muestra en la figura 3., cabe recalcar que este último

experimento se realizó por que se tenía duda de la funcionalidad de la AccuTaq LA DNA Polymerase.

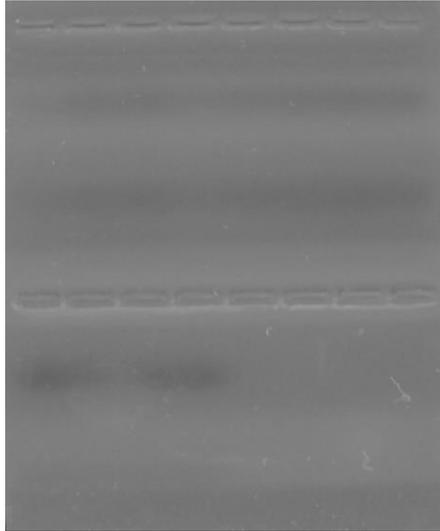


Figura 3. Amplificación del ADN molde del aislado L01 empleando un gradiente de temperatura 50-65°C. Los 8 Pozos del primer peine se empleó la Taq polimerasa casera. En el segundo peine en donde se utilizaron 4 pozos Llevo la Accu Taq DNA Polymerase

### **Identificación de *Listeria* (L01)**

El siguiente experimento de PCR se realizó bajo las condiciones de amplificación de la Reacción 3, en el cual se eliminó el MgCl<sub>2</sub> y se ajustó con H<sub>2</sub>O tetradesilada, probándose los ADN molde del aislado L01 presuntivos de *Listeria* extraído con el protocolo 1, obteniendo un amplificado débil tal como se observa en el gel de la figura 4.

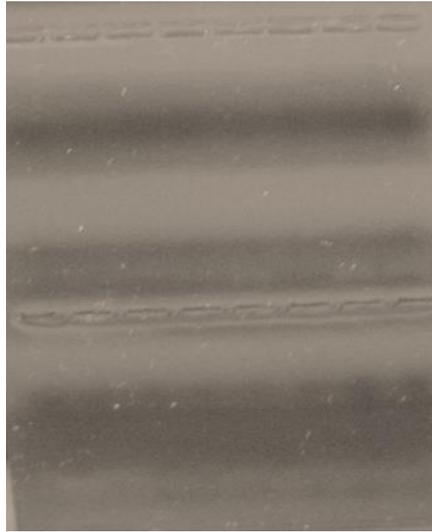


Figura 4. Amplificación del ADN molde del aislado de *Listeria* (L01) empleando un gradiente de temperatura 50-65°C. En los 8 pozos del primer peine, en donde se observa en los pozos 7 y 8 un débil amplificado a la temperatura de alineamiento de 53°C y 50°C respectivamente.

#### **Identificación de *Listeria* (12 aislados)**

Debido a los resultados obtenidos en el anterior experimento de PCR; descrito arriba, se realizó otro ensayo que incluía 12 aislados microbiológicos de presuntiva *Listeria* incluyendo a la L01, no encontrando amplificación de banda en ninguno de los amplificados probados

#### **Identificación de *Salmonella***

El siguiente experimento de PCR se realizó con el ADN de 5 aislados microbiológicos de presuntiva *Salmonella* spp. (S2, S7, S8, S12, S15), cuyo ADN de interés se extrajo con el protocolo de extracción 3, y cuya reacción se realizó con los reactivos de la Reacción 4 excepto las condiciones de amplificación que fueron las siguientes: 94°C 30 s, 65°C por 30 s, 72°C por 1.5 min, 30 ciclos en lo cual no se visualizó ningún amplificado.

## Identificación de *Salmonella*

Bajo las mismas condiciones de amplificación y protocolo de extracción de ADN y reactivos de la reacción anterior se corrió una reacción de PCR con los siguientes aislados de *Salmonella* spp. (S01, S06, S09, S13, S14), visualizándose bandas de amplificación débiles, para la S13 y S14 según se ilustra en la figura 5.

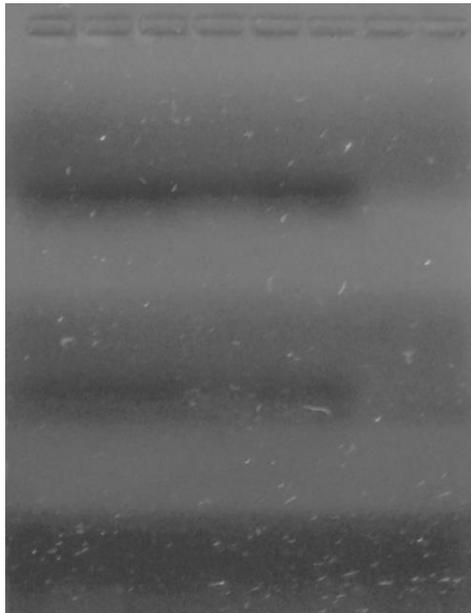


Figura 5. Amplificación de 5 de los aislados de ADN molde de *Salmonella* spp., con su par de oligonucleótidos. 1: control negativo, 2: S01, 3: S06, 4: S09, 5: S13, 6: S14

## Identificación de *Listeria* (7 aislados)

Se probaron ADN de 7 aislados microbiológicos de presuntiva *Listeria* (L1, L2, L11, L12, L13, L14, L15). Empleando los reactivos de la Reacción 4 y empleando un protocolo de extracción 3, las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95°C por 2 min. 35 ciclos de 95°C por 30s, 56°C por 1 min, 68°C por 1.30 min., en la visualización del gel no se obtuvo banda de amplificación.

## Identificación de *Escherichia coli* O157

Además se corrió una reacción con los 12 aislados microbiológicos de *Escherichia coli* empleando los reactivos de la reacción 4 y el ADN molde empleado se extrajo con el Protocolo de extracción 2 bajo las siguientes condiciones de amplificación 94°C por 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 1.5 min; pero no se obtuvo ningún amplificado; esto pudo haberse debido, a una insuficiente purificación del ADN templado, y por consecuencia la no eliminación de inhibidores que impiden la amplificación de los ácidos nucleicos en la PCR. (Davaleiva y Efremov, 2010)

## 2.4. CONCLUSIONES

En los ensayos de PCR se obtuvieron amplificados de los aislados L01 perteneciente a *Listeria* spp. y los aislados S13 y S14, ambos pertenecientes a las bacterias del género de *Salmonella*, lo cual es indicativo de que en los quesos frescos existe presencia de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* ambos patógenos muy peligrosos para la salud, lo que podemos afirmar que los quesos frescos analizados no tiene inocuidad microbiológica. Los ensayos de PCR deberán ser probados con el método CTAB que empleo Morales (2004), empleando los mismos reactivos que el empleo, incluyendo la ARNasa; ya que este nos ayuda a eliminar el ARN, que contiene los ADN molde obtenidos por este método, debido a que este es inhibidor de la reacción de PCR (Morales et al., 2006). Además, de emplear la Proteínasa K que nos ayuda a eliminar la proteína contenida en el ADN extraído, la cual interfiere en la reacción de amplificación de ADN (Omiccioli et al., 2008).

Por otra parte, es necesario para evaluar la concentración y pureza del ADN molde extraído antes de someterlo a la reacción de PCR; Además del empleo de los reactivos GelRed (Biotium<sup>®</sup>) y ORANGE G SODIUM SALT (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) que ayudan a que las bandas sean de mayor calidad en la visualización en el gel de Agarosa.

## AGRADECIMIENTOS

Javier Custodio-Hernández es becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y alumna de la Maestría en Ciencias en Producción Agroalimentaria en el Trópico del Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. Al Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto Tecnológico Superior de Acayucan por el apoyo prestado facilitando el uso de su laboratorio y el acceso a sus instalaciones.

## 2.5. LITERATURA CITADA

Albarracin, F. Y., Sarmiento, P., Carrascal, A. K., Mercado, M. (2006). Estimación de la proporción de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp en quesos frescos (queso de hoja, cuajada) y queso Doble Crema producidos y comercializados en el Municipio de amplona, Norte de Santander. BISTUA: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. 4 (2): 30-41.

Amagliani, G., Brandi, G., Omiccioli, E., Casiere, A., Bruce, I.J., Magnani, M. (2004). Direct detection of *Listeria monocytogenes* from milk by magnetic based DNA isolation and PCR. Food Microbiology. 21:597–603.

Arrese, E., Arroyo, I. M., (2012). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Idiazabal cheese. Nutrición Hospitalaria. 27(6):2139-2141.

Davaleiva, K., Efremov, G. D., (2010). INFLUENCE OF SALTS AND PCR INHIBITORS ON THE AMPLIFICATION CAPACITY OF THREE THERMOSTABLE DNA POLYMERASES. Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering. 29(1): 57-62

- Jeyasekaran, G., Raj, K. T., Shakila, R. J., Thangarani, A. J., Sukumar, D., Abdul K. J., V. (2011). Rapid detection of *Salmonella enterica* serovars by multiplex PCR. World J Microbiol Biotechnol. 27:953–959.
- Löfström, Ch., Hoorfar, J., Schelin, J., Rådström, P., Malorny, B. (2009). *Salmonella*. In L. Dongyou (Eds.), Molecular Detection of Foodborne Pathogens (1st ed., pp. 447-458). CRC
- Morales-Loredo, A., Martínez-Vázquez, I. O., Alvarez-Ojeda, G., Lozano-Muñiz, S., Manual para diagnóstico de patógenos en lácteos y carnes mediante PCR. Instituto de investigaciones Forestales, agrícolas y pecuarias, Nuevo León; México. 100-101.
- Pradel, N., Bertin, Y., Martine, Ch., Livrelli, V. (2008). Molecular Analysis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Hemolytic-Uremic Syndrome Patients and Dairy Samples in France. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. 74 (7): 2118–2128.
- Reséndiz M.R., Hernández Z.J.S., Ramírez H.R., Pérez A.R. (2012). EL QUESO FRESCO ARTESANAL DE LA CANASTA BASICA Y SU CALIDAD SANITARIA EN TUZUAPAN, MEXICO. Actas Iberoamericanas de Conservación Animal. 2: 253-255
- Rojas-Herrera, R. A., González-Flores, T. (2006). Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Medigraphic artemisa en línea. 31(2): 69-76
- Sambrook, J., Russell, D. W. (2001). Molecular Cloning A LABORATORY MANUAL. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. Printed in the United States of America.

- Valderrama, W. B., Dudley, E. G., Doores, S., Cutter, C. N., (2015). Commercially Available Rapid Methods for Detection of Selected Foodborne Pathogens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.
- Xihong, Z., Chii, W. L., Jun, W., Doeg, H. O., (2014). Advances in Rapid Detection Methods for Foodborne Pathogens. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24(3), 297–312
- Hai-Rong, Ch., Ning, J., (2006). Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnology Letters.* 28: 55–59
- Omiccioli, E.; Amagliani, G.; Brandi, G.; Bruce, I. J.; Magnani, M. (2009). Simultaneous direct detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* 0157 in milk samples by magnetic extraction and multiplex PCR. *Journal of Rapid Methods&Automation in Microbiology.* 17:195–213.
- Kasnowski, C. M., Franco, R. M., Trindade-Oliveira, L. A., Valente, A. M., Carvalho, J. C. A. P., Conte-Junior, C. A. (2008). DETECCIÓN, CARACTERIZACION SEROLOGICA Y ANTIBIOGRAMAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE LA CARNE DE TERNERA (BABILLA) ENTERA Y PICADA. *Revista Salud Pública y Nutrición.* 9 (3) [Disponible en línea] <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumen.cgi?IDREVISTA=95&IDARTICULO=20160&IDPUBLICACION=2046>
- Khan, A. A., Melvinb, C. D., Dagdag, E. B. (2007). Identification and molecular characterization of *Salmonella* spp. from unpasteurized orange juices and identification of new serotype *Salmonella* strain S. *Enterica* serovar Tempe. *Food Microbiology.* 24: 539–543.

### CAPITULO 3. CONCLUSIONES GENERALES

El estudio de evaluación de la inocuidad microbiológica de los 3 tipos de quesos frescos: Crema o Sopero, Doble Crema y Oaxaca, mostró que los quesos frescos están fuera de especificación microbiológica según la normatividad oficial mexicana (NOM-243-SSA2010), en cuanto a las bacterias del tipo *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Escherichia coli* spp.

Aunque la NOM-243 SSA-2010 especifica  $\geq 100$  UFC/ g para *Escherichia coli*, todos los crecimientos obtenidos fueron mayores a este valor y superan los límites permitidos por dicha Norma.

El riesgo de adquirir una infección por *Escherichia coli* es alta, ya que una dosis baja de 10 a 20 UFC/g del serotipo O157H7 , es suficiente para provocar severos daños a la salud.

En este estudio se detectó *E.coli* tanto en quesos comprados directamente en el lugar de producción (queserías) y en los quesos que se adquirieron de expendios.

*Salmonella* spp. estuvo presente en todas las muestras y se comprobó amplificando su ADN por PCR identificando la especie *Salmonella entérica* en dos muestras S13 y S14,.

El crecimiento de *Listeria* en los medios de Cultivos recomendados por la NOM-243 fue observado para todos las muestras de los quesos y se pudo identificar la especie *L. monocytogenes* en la muestra L01 por medio de PCR.

Los quesos frescos analizados representan un riesgo para su consumo.