



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE
Staphylococcus aureus EN QUESO COTIJA ARTESANAL
MADURADO.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA :

ISAURA BERENICE SALTO GONZÁLEZ



MÉXICO, D.F.

2013



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: Aurora Irma Ortegón Ávila
VOCAL: Martha Giles Gómez
SECRETARIO: Maricarmen Quirasco Baruch
1er. SUPLENTE: Norma Angélica Camacho de la Rosa
2° SUPLENTE: Aleida Mina Cetina

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

**ESTA TESIS FUE FINANCIADA POR EL PROYECTO SAGARPA-2010-147499
“DETERMINACIÓN DE LA INOCUIDAD MICROBIANA DEL QUESO COTIJA ARTESANAL
MADURADO QUE SE PRODUCE EN LA ZONA GEOGRÁFICA DE ORIGEN”**

ASESOR

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

SUPERVISOR TÉCNICO

Dra. Carolina Peña Montes

SUSTENTANTE

Isaura Berenice Salto González

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y la **Facultad de Química** por permitirme ser parte del universo tan maravilloso que conforman y proporcionarme una preparación invaluable para enfrentar el mundo.

Porque soy y seguiré siendo parte de la **UNAM**.

“Por mi raza hablará el espíritu”

A la **Dra. Maricarmen Quirasco** por brindarme la oportunidad de formar parte de este proyecto, por su asesoría, su tiempo, su amistad, sus consejos y su confianza.

A la **Dra. Carolina Peña** por su valiosa ayuda para el desarrollo de este proyecto, por brindarme su amistad, su apoyo y su confianza.

Al **Prof. Alejandro Camacho** por su asesoría y ayuda en el área de microbiología durante el desarrollo de este proyecto.

A la **Prof. Aurora Ortegón** y la **Prof. Martha Giles** por sus aportaciones y consejos para la elaboración de este trabajo.

A la **Q.A. Cindy Estrada** por su apoyo en el desarrollo de este proyecto.

Al **Colegio de Profesores de la Facultad de Química y la Sección 024 del AAPAUNAM** por el apoyo otorgado a través de la cátedra “Ninfa Guerrero de Callejas” 2012.

A mis compañeros inseparables del laboratorio 312 **Irma, Erick y Belén** con quienes construimos una linda amistad y compartimos tantas cosas, **GRACIAS** por hacer agradable cada día de trabajo en el laboratorio.

A mis demás compañeros del laboratorio 312 que hicieron agradable la estancia en él; **Ale, Myrna, Lalo, Eva, Isaac, Sergio, Israel, Ingrid, Manuel, Stefania, Augusto, Mariana, Fernanda, Cinthya, Gaby, Fernando, Bety, J. Luis, Alaide, J. Manuel, etc.**

A **MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS** a quienes encontré a lo largo de mi estancia por la Facultad de Química y con quienes espero seguir compartiendo maravillosos momentos; **Israel B., Amaury, Male, Fátima, Esbeyde, Alejandra, Luis, Dianita, Felipe, Chuy, Tzei, Iván, Diana, Has** a mi amiga de la prepa **Tania** y todas aquellas personas que estuvieron a mi lado durante esta etapa tan importante de mi vida **LOS QUIERO MUCHO**.

DEDICATORIAS.

A DIOS por brindarme vida y salud ya que sin ellos nada sería posible, por darme fortaleza y sabiduría para enfrentar la vida, por encontrarse presente para guiar mi camino y nunca desampararme, por regalarme una **FAMILIA MARAVILLOSA**.

A MIS PÁPAS *Isaura González Pérez y Javier Salto Mendiola* por estar siempre para mí, por apoyarme, por sus desvelos y atenciones, por compartir los momentos alegres tanto como los tristes, por sus consejos y enseñanzas incluso sus regaños y exigencias, pues sin ellos no sería lo que soy. Sé que el camino no ha sido fácil pero han hecho un excelente papel como padres, **LOS AMO** y son los **MEJORES**.

A MIS HERMANOS *Nancy Salto González y Javier Salto González*, por su cariño, paciencia, comprensión, apoyo, por compartir su entusiasmo y ser mi compañía los **QUIERO MUCHO**.

A MI TIA *Rosaura Salto Mendiola* por tu cariño, por estar siempre pendiente y por tu apoyo, sabes que has sido una persona importante en mi vida, **TE QUIERO MUCHO**.

AL RESTO DE MI FAMILIA y AMIGOS por sus palabras de aliento, sus consejos y por ser parte de mi vida porque cada quien aportó a su manera un poco a mi formación **LOS QUIERO**.



ÍNDICE.

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. MARCO TEÓRICO.....	4
3.1. Queso Cotija.....	4
3.1.1. Definición de queso Cotija.....	4
3.1.2. Proceso de elaboración del queso Cotija.....	6
3.1.4. Características Microbiológicas del queso Cotija.....	10
3.2. <i>Staphylococcus aureus</i>.....	12
3.2.1. Generalidades de <i>Staphylococcus aureus</i>	12
3.2.3. Intoxicación causada por <i>Staphylococcus aureus</i>	14
3.2.4. <i>S. aureus</i> en quesos madurados. Regulación sanitaria en México.....	15
3.2.5. Técnicas de cuantificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	16
3.2.5.1. Método tradicional de cuenta en placa para <i>Staphylococcus aureus</i>	16
3.2.5.2. Petrifilm Staph Express®.....	18
3.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	19
3.3.1. Generalidades de PCR.....	19
3.3.2. PCR convencional o en punto final.....	20
3.3.3. PCR en tiempo real.....	21
3.3.4. Interpretación de PCR en tiempo real.....	23
3.4. Detección de <i>S. aureus</i> mediante técnicas de biología molecular.....	¡Error! Marcador no definido.
4. JUSTIFICACIÓN.....	25
5. HIPÓTESIS.....	27
6. OBJETIVOS.....	27



6.1. OBJETIVO GENERAL.	27
6.2. OBJETIVOS PARTICULARES.	27
7. DIAGRAMA EXPERIMENTAL.	28
8. MATERIALES Y MÉTODOS.	30
8.1. Selección del gen de interés y la secuencia de cebadores a utilizar para PCR en tiempo real.	30
8.2. Material biológico.	31
8.3. Inactivación y obtención del pellet celular.	32
8.4. Extracción de ADN (Kit FAST ID).	32
8.5. Cuantificación de ADN en las muestras.	33
8.6. Cuantificación de inóculos mediante vertido en placas BHI e inoculación de muestras de queso Cotija.	34
8.7. PCR punto final.	35
8.8. PCR en tiempo real.	37
8.9. Cuantificación mediante placas Petrifilm Staph Express®.	38
8.10. Cuantificación mediante placas de Agar Baird Parker.	39
8.11. Datos de las muestras.	40
8.12. Pretratamiento de las muestras de queso Cotija.	41
8.13. Preenriquecimiento de las muestras de queso Cotija.	42
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	44
9.1. Selección del gen de interés y la secuencia de cebadores a utilizar para PCR en tiempo real.	44
9.2. Pruebas de validación del método de detección.	47



9.3. Pruebas de validación del método de cuantificación.	53
9.4. Inspección física de las muestras de queso Cotija.	56
9.5. Resultados de PCR convencional.....	59
9.6. Resultados de PCR en tiempo real.	62
9.7. Resultados de conteo en Agar Baird Parker.	68
10. CONCLUSIONES.	71
11. PERSPECTIVAS.	72
ANEXO A. LÍMITES MICROBIOLÓGICOS ESTIPULADOS EN LA NORMATIVIDAD.	73
ANEXO B. METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN ALIMENTOS TOMADA DE LA NOM- 115-SSA1-1994.	78
ANEXO C. CONCENTRACIONES Y RELACIÓN ABS 260NM/ ABS 280NM.....	81
ANEXO D. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS Y SOLUCIONES UTILIZADOS.....	87
ANEXO E. IMÁGENES DEL CONTEO EN PLACA (AGAR BAIRD PARKER).....	89
BIBLIOGRAFIA.	92



1. RESUMEN.

Dentro de los productos alimenticios elaborados artesanalmente en México se encuentra el queso Cotija cuyo proceso de elaboración no involucra tratamiento térmico por lo cual mantiene la microbiota nativa de la leche así como la adquirida a lo largo del proceso de elaboración. De los microorganismos patógenos que pueden incorporarse durante dicho proceso se encuentra *Staphylococcus aureus* cuyo límite máximo permisible en el queso Cotija es 100 UFC/g de acuerdo a la Norma Mexicana NMX-F-735-COFOCALEC-2011.

Por lo tanto, la finalidad de éste proyecto es detectar *S. aureus* mediante PCR en tiempo real en una muestra representativa de queso Cotija y en las muestras en que se encontró presencia de ADN de dicho microorganismo realizar la cuantificación mediante la técnica de conteo en placa.

Con base en una investigación bibliográfica se seleccionó un juego de cebadores y sonda que permita detectar *S. aureus* mediante PCR en tiempo real. Para asegurar su especificidad se realizaron pruebas con el ADN de queso Cotija, ADN de *S. aureus* y otros microorganismos patógenos (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* Typhimurium, *Brucella abortus*, *E. coli* ETEC) y ADN de microorganismos aislados del queso Cotija como *Enterococcus faecalis* y *S. sciuri*. Los resultados obtenidos indican que el juego de cebadores y sonda son específicos para el microorganismo de interés.

Posteriormente se hicieron pruebas con ADN de queso Cotija inoculado con una cantidad conocida de UFC de *S. aureus*, de queso Cotija sin inocular y de la cepa pura del microorganismo patógeno en estudio obteniendo valores de Ct muy semejantes para el queso Cotija



inoculado y la cepa pura independientemente de la cantidad con la que se inocularon mostrando que el paso de enriquecimiento es de suma importancia para poder discriminar entre resultados positivos de negativos.

Se probó la metodología rápida de recuento para *S. aureus* (placas Petrifilm Staph Express®) encontrando que debido a la presencia de otros microorganismos en el queso Cotija la interpretación de las placas no es clara por lo cual se realizaron pruebas en Agar Baird Parker con una muestra de queso Cotija y la mezcla de queso Cotija + *S. aureus* para verificar que es posible distinguir las colonias del microorganismo de interés a pesar de la presencia de otros microorganismos en el producto alimenticio en estudio obteniendo resultados satisfactorios.

Se analizaron 95 muestras de queso Cotija procedentes de la Sierra de Jalmich las cuales fueron inspeccionadas visualmente y homogenizadas bajo condiciones asépticas, posteriormente se realizó la extracción de ADN mediante un kit comercial.

Los resultados fueron que el 13.68 % de las muestras mostraron amplificaciones tardías por PCR en tiempo real por lo que se seleccionaron las 6 muestras con valores de Ct menores para realizar el conteo en placa sin encontrar colonias sospechosas de *S. aureus* , por lo tanto las amplificaciones tardías obtenidas por PCR en tiempo real pueden deberse a la presencia de *S. aureus* no viable pero no en la cantidad necesaria para generar la cantidad de enterotoxina que comprometa la inocuidad del alimento.



2. INTRODUCCIÓN.

El queso Cotija artesanal madurado posee características que permitirían el crecimiento de algunos microorganismos patógenos como lo es *Staphylococcus aureus*, debido a que es un producto que no involucra algún procesamiento térmico, cuya principal materia prima es leche bronca de vaca, además su proceso de elaboración implica manipulación humana la cual puede favorecer su contaminación, ya que *Staphylococcus aureus* es un microorganismo que forma parte de la microbiota normal de mucosas y piel de seres humanos y otros mamíferos.

En cuanto a la normatividad, la Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994 y la Norma Mexicana NMX-F-735-COFOCALEC-2011 estipulan la presencia de 100 UFC/g para *Staphylococcus aureus* como límite máximo en quesos madurados.

Por lo tanto la importancia de la detección y cuantificación de *Staphylococcus aureus* radica en el cumplimiento de la legislación vigente, lo que se verá reflejado en la seguridad de los consumidores del producto.



3. MARCO TEÓRICO.

3.1. Queso Cotija.

3.1.1. Definición de queso Cotija.

Queso mexicano elaborado de manera artesanal con leche cruda producida estacionalmente en la zona geográfica denominada zona geográfica del Queso Cotija Artesanal Madurado, madurado en la misma zona por un tiempo mínimo de 3 meses, de gran formato cilíndrico, de pasta dura, firme a friable, con olor y sabor característicos, que presenta corteza propia de color marfil a ocre, marcado con el dibujo de la manta que sirvió de molde como puede observarse en la figura 1 (NMX-F-735-COFOCALEC-2011).



Figura 1. Queso Cotija.

La zona geográfica del Queso Cotija Artesanal Madurado abarca las inmediaciones serranas de los estados de Jalisco y Michoacán (Sierra de Jalmich, figura 2), en jurisdicción de los municipios de Santa María del Oro, Jalisco, Sur de Tocumbo y de Cotija, Michoacán, principalmente. Además se extiende a territorio de los municipios vecinos a los anteriores: Norte de Jilotlán de los Dolores, oriente de



Tamazula, sur de Valle de Juárez y de Quitupan, Jalisco; Suroeste de Los Reyes, Periban y Tancitaro y norte de Buena Vista Tomatlán, Michoacán; el centro de la región se localiza en el cruce de las coordenadas 19° 30' de latitud norte y 102° 45' de longitud oeste. Aunque su forma no es cuadrada (tiene forma de herradura orientada al norte). Va de los 102° 30' a los 103° 05' de longitud oeste, abarcando una superficie territorial de aproximadamente 2400 kilómetros cuadrados. Cuyas áreas cumplen con lo siguiente: altitud entre los 700 m y 1700 m sobre el nivel del mar, con una precipitación pluvial media anual de entre 900 mm al sur y 1200 mm en los otros puntos cardinales, con una humedad relativa de 60 a 90% y temperatura anual de 18° a 25°C (Álvarez *et al.*, 2005; NMX-F-735-COFOCALEC-2011).

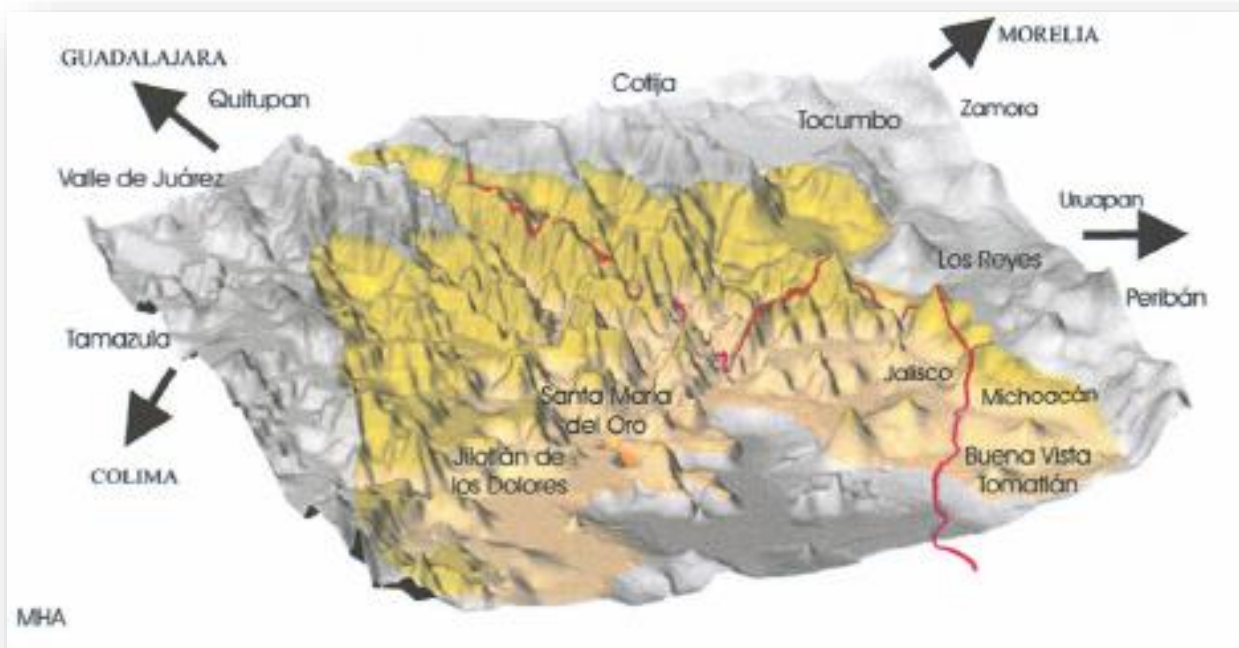


Figura 2. Sierra de Jalmich (Álvarez *et al.*, 2005).



3.1.2. Proceso de elaboración del queso Cotija.

En el proceso de elaboración del queso Cotija se involucran varias etapas que representan riesgos potenciales de contaminación por microorganismos entre los que encontramos a *S. aureus*.

Como se muestra en la figura 3 el proceso de elaboración del queso Cotija se encuentra formado por 15 etapas principales etapas que a continuación se describen.

- 1. Ordeña:** Para elaborar el queso Cotija se utiliza leche recién ordeñada (del mismo día) cuyas características son pH= 7 y temperatura entre 37 y 38°C, procedente de ganado criollo con buen estado de salud, la ordeña se realiza con todos los cuidados higiénico- sanitarios correspondientes.
- 2. Recepción:** En esta etapa se revisa que la leche cumpla con las características deseables para obtener un buen producto. La leche debe presentar una coloración de blanco a blanco amarillento, debe ser opaca, con un olor poco marcado pero característico a leche fresca, de gusto agradable y ligeramente dulce. Además debe estar libre de materia extraña para lo cual suele filtrarse con cedazos limpios.
- 3. Reposo:** Se mezcla la leche y deja reposar de 3 a 4 h a temperatura ambiente, en lo que se ordeñan todas las vacas del ható.
- 4. Cuajado:** Consiste en una coagulación enzimática lograda mediante un agente coagulante de origen animal (Cuamex XXX). Es incorporado y mezclado rápidamente aproximadamente en una proporción de 10 mL de cuajo / 100 L de leche. Cabe mencionar que la leche no sufre ningún tratamiento térmico que preceda este paso.



- 5. Cortado:** Una vez alcanzada la consistencia deseada se corta en cuadros homogéneos con ayuda de un cuchillo o una cuchara aunque también puede cortarse en cruz o estrella.
- 6. Desuerado:** Se realiza sobre la mesa o artesa que puede ser de madera o acero inoxidable con un colador interpuesto o lienzo limpio ejerciendo presión descendiente con una cuchara o un recipiente limpio.
- 7. Manteado:** Con ayuda de una tela de algodón se desuera la cuajada por autocompresión y se deja escurrir.
- 8. Cortado o Quebrado:** Durante esta operación se rompe la cuajada de manera manual o con un cuchillo para favorecer poco más el desuerado por exudación.
- 9. Salado:** Se lleva a cabo con sal de grano proveniente de Colima. Consiste en incorporar la sal de grano directamente a la cuajada y amasar manualmente para homogenizar. La cantidad incorporada es aproximadamente de 138 a 140 g de sal/ 20 L de leche, aunque esta cantidad varía.
- 10. Moldeado:** La cuajada se envuelve en dos piezas de yute o ixtle y se coloca dentro del molde de acero inoxidable para darle forma al producto.
- 11. Prensado:** Esta operación tiene una duración de entre 18 y 24 h. Se lleva a cabo regularmente utilizando piedras de entre 50 y 90 kg aunque en algunas ocasiones se emplean prensas rústicas (de tornillo).
- 12. Oreado:** Las piezas de queso son desenmoldadas y se les eliminan los rebordes. Se ciñen o “fajan” con unos “cinchos” de fibracel, fibra de vidrio, lamina o tela para mantener la forma y se conserva así durante 15 días aproximadamente a temperatura



ambiente. Las piezas se descinchan, voltean y vuelven a ceñir diariamente.

- 13. Maduración:** Una vez obtenida la textura adecuada la pieza se desfaja aunque el proceso de volteado diario se mantiene y además se limpia la superficie del queso con un lienzo limpio y suave cada tercer día aproximadamente. Tiene una duración mínima de 3 meses, se conoce como añejo cuando ha madurado de 3 a 6 meses y como rendido si tiene más de 6 meses de maduración.
- 14. Venta:** Ésta se realiza en la ciudad de Cotija en tiendas o bien la feria organizada el mes de diciembre.
- 15. Distribución:** Las personas que acuden a Cotija para adquirir el queso del mismo nombre son aún el único medio de distribución (Hernández, 2007; NMX-F-735-COFOCALEC-2011).



Figura 3. Proceso de elaboración del queso Cotija y principales focos de contaminación de *S. aureus* (Hernández, 2007).

*Principales focos de contaminación de *S. aureus* en el proceso de elaboración.



3.1.3. Características fisicoquímicas del queso Cotija.

La composición general del Queso Cotija Región de Origen, de acuerdo a Hernández, 2007 (tabla 1), es humedad máxima 40%, cenizas de 8.7 a 11.2 % base seca, contenido de cloruros entre 4 y 7.4% base seca, contenido mínimo de grasa de 37% y de proteína 39% base seca y 0.24% base seca como máximo de carbohidratos.

Tabla 1. Composición nutrimental del queso Cotija (Hernández, 2007).

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

El queso Cotija es rico principalmente en grasa y proteína, las características fisicoquímicas de este producto delimitan la microbiota que puede desarrollarse.



3.1.4. Características Microbiológicas del queso Cotija.

El queso Cotija ha sido producto de estudio del grupo de trabajo de la Facultad de Química-UNAM y dentro de los estudios realizados se ha buscado identificar los microorganismos presentes en este queso. Dentro de los resultados obtenidos se encuentran los que a continuación se mencionan.

García (2006), al buscar microorganismos con actividad lipolítica en muestras de queso Cotija cuyo tiempo de maduración superaba los 6 meses e incluso en algunos casos excedía el año de maduración, mediante la secuenciación del gen ribosomal 16s o bien pruebas bioquímicas lograron identificar, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus piscifermentans*, *Staphylococcus condimenti*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Bacillus pumilus* y *Staphylococcus simulans*.

Hernández N. (2007), logró aislar los microorganismos proteolíticos; *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus fleuretti* o *xylosus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium* o *flexus* y *Enterococcus faecalis*, en muestras de queso Cotija con más de 6 meses de maduración a pesar de que también se analizaron muestras con 3 a 6 meses de maduración y quesos con menos de 3 meses de maduración.

Bravo (2008), aisló y caracterizó mediante pruebas bioquímicas a *Lactobacillus pentosus* y *Enterococcus faecium*, después de aproximadamente dos meses y medio de maduración.

Poco más tarde Zuñiga (2009), al estudiar la diversidad, dominancia relativa y dinámica de desarrollo al monitorear la maduración de queso Cotija durante 7 meses, el análisis de la microbiota del queso por la técnica de PCR-DGGE permitió identificar *Enterococcus faecium* y los



géneros *Marinilactibacillus* (piezotolerans o psychrotolerans) y *Vagococcus* (lutrea o camphilus).

Por otro lado Estrada (2009), buscó identificar microorganismos patógenos en el queso Cotija mediante PCR punto final, encontró que en 2 de 10 muestras estaba presente ADN de *Salmonella typhi* y en 3 había presencia del correspondiente a *Staphylococcus aureus*.

Cortés (2009), al analizar 10 muestras, con al menos 3 meses de maduración detectó *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei*, *Enterococcus faecium* y *Lactococcus lactis*.

Por otra parte, Gómez (2010), reporta la identificación de los géneros *Enterococcus*, *Vagococcus* y *Lactobacillus* mediante PCR-DGGE.

Dadas las características composicionales del queso Cotija las características destacables de los microorganismos identificados en este producto en los trabajos anteriores son la actividad proteolítica, lipolítica y la halotolerancia.



3.2. *Staphylococcus aureus*.

3.2.1. Generalidades de *Staphylococcus aureus*.

Los estafilococos fueron descritos por primera vez por el cirujano escocés Sir Alexander Ogston como causa de algunas infecciones piógenas (formadoras de pus) en las personas. En 1882 les dio el nombre de estafilococo (del griego *staphyle* racimo de uvas y *coccus* un grano de baya) por el aspecto que presentaban al microscopio (Adams *et al.*, 1997).

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).

Además es un microorganismo patógeno del cual aproximadamente el 50% producen 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 (Bernard *et al.*, 1984; Jay *et al.*, 2007).



En la tabla 2 se resumen las condiciones de crecimiento y sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* y además las condiciones de producción de alguna de sus enterotoxinas, en donde se confirma su halotolerancia.

Tabla 2. Requerimientos de crecimiento de *Staphylococcus aureus* y requerimientos para la generación de enterotoxinas (Adams *et al.*, 1997).

Factor	Crecimiento		Producción de enterotoxina	
	Óptimo	Intervalo	Óptimo	Intervalo
Temperatura °C	35-37	7-48	35-40	10-45
pH	6.0-7.0	4.0-9.8	A :5.3-6.8 Otras:6-7	--
NaCl	0.5-4%	0-20%	0.5%	0-20%
Actividad de agua	0.98- >0.99	0.83->0.99	>0.99	0.86->0.99
Atmosfera	Aeróbica	Aeróbica- Anaeróbica	5-20% DO2	Aeróbica- Anaeróbica
E_h	> +200mV	> +200mV	> +200mV	--



3.2.3. Intoxicación causada por *Staphylococcus aureus*.

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, arcada y postración, aunque con frecuencia también se refiere diarrea, siendo la curación completa en un plazo de 1-2 días. En los casos graves, es posible que la deshidratación, la palidez acusada y el colapso requieran un tratamiento por infusión intravenosa (Adams *et al.*, 1997). 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.

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. Un porcentaje elevado de personas sanas son portadores de *Staphylococcus aureus* en fosas nasales y garganta. También puede encontrarse en la piel y sobretodo en procesos infecciosos cutáneos (acné, forúnculos, heridas infectadas, etc.)

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 10^5 UFC/g cuando se forman cantidades de enterotoxina suficientes para causar enfermedad.

Las toxinas A, B, C1, C2, D, E, F y G son sustancias de naturaleza polipeptídica de las cuales la toxina A y E son las que se encuentran relacionadas con intoxicaciones alimentarias. Su característica sobresaliente es su termorresistencia, su valor D, es decir, el tiempo necesario para que su cantidad se reduzca al 10% de la inicial,



depende de la enterotoxina pero se encuentra entre 1 -3 horas a 100°C y de 10-40 minutos a 120°C (Mossel *et al.*, 1999).

3.2.4. *S. aureus* en quesos madurados. Regulación sanitaria en México.

En la legislación vigente encontramos diversas normas que indican los límites estipulados para algunos microorganismos de interés en productos lácteos dentro de los cuales encontramos a los quesos madurados clasificación en la cual recae el queso Cotija.

La NOM-121-SSA1-1994 indica que el queso Cotija se clasifica como queso madurado prensado de pasta dura e indica para *Staphylococcus aureus* un límite máximo de 100 UFC/g para el mismo (**ANEXO A**).

En la NOM-243-SSA1-2010 y la NMX-F-735-COFOCALEC-2011 haciendo referencia a la primera estipulan como límite ≤ 100 UFC/g o mL e indica que la toxina estafilocócica debe estar ausente en quesos madurados de acuerdo a la primera y en queso Cotija de acuerdo a la segunda norma mencionada (**ANEXO A**).



3.2.5. Técnicas de cuantificación de *Staphylococcus aureus*.

3.2.5.1. Método tradicional de cuenta en placa para *Staphylococcus aureus*.

El medio selectivo para siembras en placa más apropiado y el que más se utilizará para *Staphylococcus aureus* en el ideado por Baird- Parker a principios de la década de los años 60. Este medio asocia las propiedades de un alto grado de selectividad, una reacción diagnóstica característica y la capacidad de recuperar las células estresadas. El cloruro de litio y el telurito actúan como agentes selectivos mientras que la yema de huevo y el piruvato coadyuvan en la regeneración de las células dañadas. La reducción del telurito por *Staphylococcus aureus* da las características colonias brillantes de color negro azabache que están rodeadas de una zona que se aclara, resultante de la hidrólisis de la proteína de la yema de huevo lipovitelina.

Con frecuencia las colonias también presentan un borde interno de color blanco producido por la precipitación del ácido graso.

El aspecto de las colonias en la superficie del agar de Baird Parker proporciona la identificación presuntiva de *Staphylococcus aureus* que con frecuencia se confirma mediante las pruebas de la producción de coagulasa y termonucleasa

La coagulasa es una sustancia extracelular que coagula el plasma sanguíneo humano o animal en ausencia de calcio, también es producida por *S. intermedius* y *S. hycus*. Sin embargo, *S. intermedius* es incapaz de reducir el telurito y por esa razón produce colonias blancas en agar Baird Parker pero *S. hycus* que se encuentra en la piel de los cerdos y de las aves de corral requiere una serie de pruebas bioquímicas adicionales para diferenciarlo de *S. aureus* de modo fiable.



La presencia de la coagulasa se puede demostrar utilizando plasma de conejo tratado con EDTA en la prueba de la coagulasa en tubos (Adams *et al.*, 1997).

La Norma Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994 indica la metodología para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos y puede encontrarse en el **ANEXO B**.



3.2.5.2. Petrifilm Staph Express®.

Las placas Petrifilm Staph Express® para recuento de *Staphylococcus aureus* contiene nutrientes de Agar Baird Parker con un agente gelificante soluble en agua fría, el medio modificado cromogénico Baird Parker en la placa es selectivo y diferencial para este microorganismo. Las colonias rojo-violeta en la placa son *S. aureus* (Guía de interpretación, 2009).

Cuando se encuentra microbiota de acompañamiento en el fondo de la prueba se debe utilizar el Disco Staph Express Petrifilm™ para diferenciar *S. aureus* del resto de las colonias sospechosas, las zonas rosadas son formadas por *S. aureus* y ocasionalmente *S. hyicus* y *S. intermedius* (Guía de interpretación, 2009).

El disco reactivo de nucleasa termoestable Petrifilm™ contiene DNA, azul de o-toluidina y un indicador de tetrazolium que facilita la enumeración de las colonias y la confirmación de la presencia de una nucleasa termoestable (Tnasa) producida por los *Staphylococcus*.

Tnasa es una enzima producida por *S. aureus* que permanece estable a altas temperaturas. Su detección, al igual que la coagulasa, es un método de confirmación de la presencia de *Staphylococcus aureus*.

El uso de este tipo de metodologías ahorra el tiempo de preparación y esterilización de parte del material requerido en metodologías tradicionales.



3.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

3.3.1. Generalidades de PCR.

Kary Mullis desarrolló la PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) en 1987, él usó ADN polimerasa normal la cual era destruida por la temperatura necesaria para abrir la doble cadena de ADN por lo cual era necesario añadir más enzima a cada tubo en cada ciclo. Afortunadamente se descubrió la ADN polimerasa proveniente de *Thermus aquaticus* en aguas del parque nacional Yellowstone en EE UU, que se encuentran a temperatura de 70 a 75°, esta enzima puede añadirse directamente a la mezcla de reacción ya que resiste temperaturas de hasta 100°C (Clark, 2010).

Dentro de todos los avances técnicos de la biología molecular la PCR es uno de los más utilizados, esta técnica es lo suficientemente sensible que puede amplificar el ADN de una sola célula en cantidades suficiente para poder detectar o secuenciar. Consecuentemente, PCR es utilizado en diagnósticos clínicos, análisis genéticos, ingeniería genética y análisis forenses (Clark, 2010).

PCR es una técnica que permite amplificar secuencias de ADN *in vitro*, por repetición de la reacción 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).



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

La desnaturalización de las dos cadenas de ADN a una temperatura elevada (cerca de 95°C) para producir moléculas de ADN monocatenarias

La hibridación ("annealing") de cebadores oligonucleicos ("primers") 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)

La reacción de elongación a partir de los cebadores usando una 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 dobla obteniéndose 2ⁿ moléculas después de "n" ciclos.

3.3.2. PCR convencional o en punto final.

Los resultados de este tipo de PCR sólo pueden ser interpretados como presencia y ausencia del producto de amplificación.

Siguen el principio básico de PCR, desnaturalización, hibridación y elongación.

Requiere una posterior electroforesis para detectar la presencia del producto esperado.



3.3.3. PCR en tiempo real.

Recientemente se han desarrollado métodos que permiten que las reacciones de PCR puedan seguirse en tiempo real al detectar la emisión de fluorescencia. Se pueden utilizar diferentes fluoróforos y así llevar a cabo varias detecciones en la misma mezcla de reacción.

Existen diversos sistemas dentro de PCR en tiempo real de los cuales sólo se mencionarán SYBR Green I y TaqMan cuya comparación también se observa en la figura 4.

SYBR Green I®: Este fluoróforo, detectable a 520 nm, se une únicamente al ADN de doble cadena y emite fluorescencia cuando está unido. Este sistema detecta la cantidad total de ADN de doble cadena pero no puede distinguir entre diferentes secuencias.

TaqMan®: Consiste en dos fluoróforos, uno denominado reportero y otro extintor, éstos se encuentran ligados, uno en cada extremo de una secuencia de ADN llamada sonda, la sonda hibrida en una zona intermedia a las secuencias donde hibridan los cebadores, es decir, el orden de hibridación es; cebador, sonda, cebador. Cuando ambos fluoróforos están unidos entre sí uno contrarresta la fluorescencia del otro (figura 4).

La sonda TaqMan se une a la secuencia diana después de la desnaturalización y a medida que la Taq polimerasa extiende el cebador, se va acercando a la sonda hasta llegar a ella, cuando esto ocurre degrada la hebra de ADN de la sonda, esto debido a su actividad 5' exonucleasa, liberando el fluorocromo reportero (figura 4), al romperse el vínculo entre los fluorocromos se interrumpe la transferencia de energía entre fluorocromos, es decir, la fluorescencia del reportero ya puede ser detectada, por lo cual hay un incremento de



fluorescencia que es directamente proporcional a la cantidad de ADN diana específica que se ha amplificado (Clark, 2010;Costa, 2004).

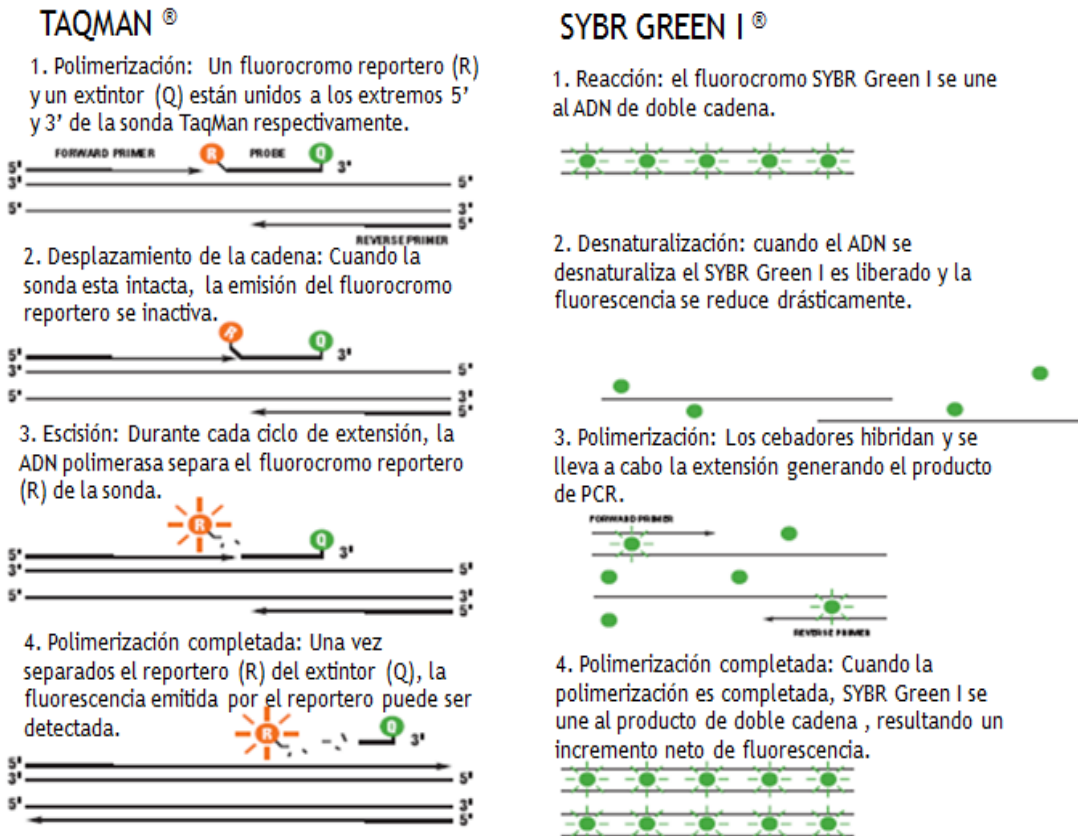


Figura 4. Comparación de los sistemas SYBR Green I y TaqMan. (Biosystems A., 2012)



3.3.4. Interpretación de PCR en tiempo real.

El resultado de una PCR a tiempo real se visualiza en un gráfico de amplificación (figura 5). Donde el eje de las "X" indica el número de ciclos de la PCR y el eje de las "Y" 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 (Microbial; Biosystems A., 2010).

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 5).
- 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 5).
- 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 5). Cuanto más ADN inicial 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 (Microbial; Biosystems A., 2010)

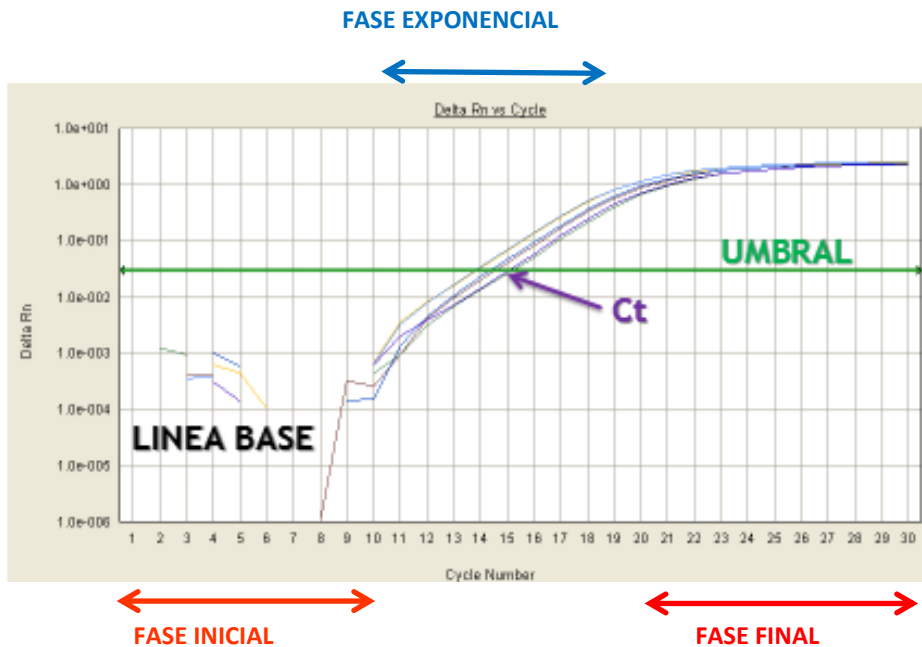


Figura 5. Grafica de PCR en tiempo real.



4. JUSTIFICACIÓN.

El queso Cotija es un producto elaborado con leche de vaca que no sufre tratamiento térmico alguno, por lo cual posee la microbiota característica de la leche y también microorganismos procedentes de las vacas, si alguna de las vacas padece de mastitis ésta puede ser una fuente de contaminación de *S. aureus*.

Aún si las vacas están sanas y no posean mastitis existen otros focos de contaminación a lo largo del proceso de elaboración del queso Cotija, recordando que *S. aureus* habita piel y mucosas de seres humanos y otros mamíferos, todo contacto entre los productores y las materias primas son un potencial foco de contaminación, de los cuales se pueden destacar, el quebrado y el salado principalmente.

Además de que *S. aureus* puede incorporarse al producto a lo largo de su producción, cabe mencionar que las características de concentración de NaCl, pH y a_w reportados para el queso Cotija permitirían el crecimiento de este microorganismo y la temperatura a la cual se lleva a cabo el proceso de maduración (temperatura ambiente) recae en el intervalo de temperatura favorable para el desarrollo de *Staphylococcus aureus*.

Aproximadamente el 50% de las cepas de *S. aureus* son enterotoxigénicas, la intoxicación alimentaria por este microorganismo es debida a la toxina excretada por el microorganismo, que podría permanecer en el alimento, dadas las características antes mencionadas, si el producto adquiere en algún punto del proceso *S. aureus* y éste llega a las cantidades necesarias para generar la toxiinfección, representaría un peligro para los consumidores.



Por lo tanto, este proyecto comprende el análisis de una muestra representativa de queso Cotija proveniente de 95 productores, para determinar si *S. aureus* se encuentra presente mediante PCR tiempo real. Se eligió esta técnica debido a que permite el análisis simultáneo de un alto número de muestras y posee una especificidad ideal para el análisis de este producto debido a la presencia de otros microorganismos. También se busca comprobar los resultados obtenidos por PCR tiempo real a través de una metodología dependiente de cultivo, para los resultados positivos de acuerdo a la técnica de PCR tiempo real. Para lograr los objetivos planteados, se requiere implementar una metodología adecuada para la extracción de ADN del queso, para la amplificación de una secuencia de ADN específica de *S. aureus*, así como la técnica más adecuada para realizar la cuantificación de UFC por cultivo.



5. HIPÓTESIS.

- ☹ Si *Staphylococcus aureus* se encuentra presente en el Queso Cotija Artesanal Madurado, podrá ser detectado mediante PCR en tiempo real y cuantificado mediante una técnica de cultivo.

6. OBJETIVOS.

6.1. OBJETIVO GENERAL.

- ☹ Determinar si *Staphylococcus aureus* está presente en 95 muestras de Queso Cotija provenientes de diversos productores de la Sierra de Jalmich, a través de PCR en tiempo real.
- ☹ Cuantificar *Staphylococcus aureus* en aquellas muestras en que se encuentre presente ADN de dicho microorganismo por conteo en placa.

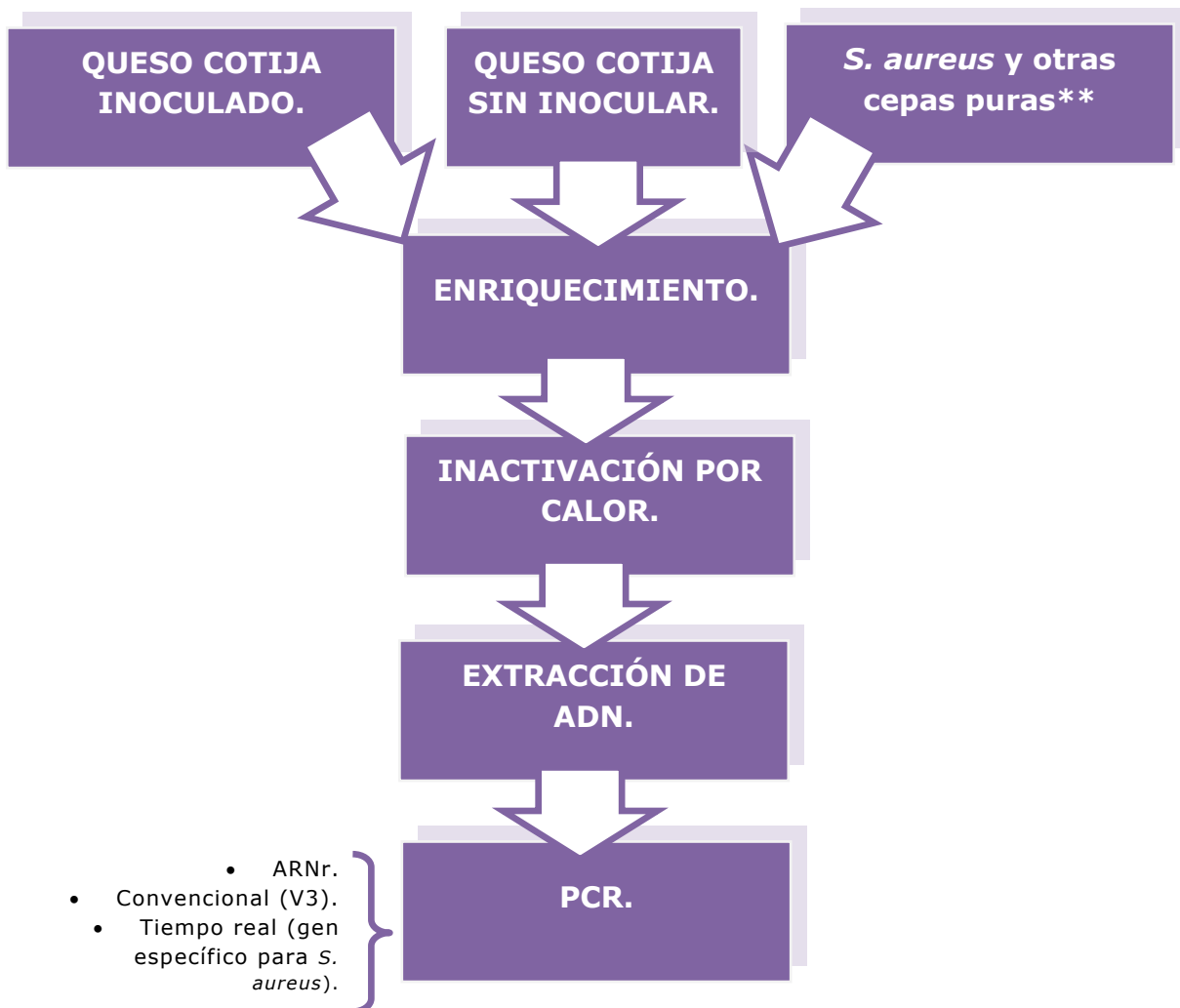
6.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

- ☹ Seleccionar el juego de cebadores y sonda específicos para *S. aureus*.
- ☹ Probar que la matriz del alimento no interfiere en la detección de ADN de *S. aureus*, por PCR.
- ☹ Verificar la especificidad de los cebadores y sonda, utilizando cepas puras de *S. aureus* y otros microorganismos.
- ☹ Implementar el método de cuantificación por cuenta en placa.
- ☹ Analizar por PCR en tiempo real 95 muestras de queso Cotija provenientes de diferentes productores de la Sierra de Jalmich.
- ☹ Cuantificar UFC/g de las muestras en que se haya detectado ADN de dicho microorganismo.



7. DIAGRAMA EXPERIMENTAL.

Para verificar que la metodología es adecuada para la detección de *S. aureus*, se realizaron algunas pruebas para asegurar que los cebadores y sonda permiten identificar *S. aureus* y son específicos para dicho microorganismo, por ello se utilizaron microorganismos presentes en el queso Cotija como *Enterococcus* sp. y *S. sciuri* y otros microorganismos patógenos (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi*., *Brucella* spp., *E. coli*).





Una vez que se verificó la especificidad y utilidad de los cebadores y sonda, se procede a realizar el análisis de una muestra representativa de queso Cotija.





8. MATERIALES Y METÓDOS.

8.1. Selección del gen de interés y la secuencia de cebadores a utilizar para PCR en tiempo real.

Para determinar si hay presencia de *Staphylococcus aureus* en el queso Cotija artesanal madurado fue necesario elegir una secuencia de cebadores y sonda específicos para dicho microorganismo. Para ello se realizó una investigación bibliográfica de las secuencias reportadas en estudios con *Staphylococcus aureus* y se determinó si eran de utilidad para los fines de este proyecto.

Una vez que se encontró una secuencia adecuada se verificó la especificidad mediante un análisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI). Es de suma importancia la especificidad de dichas secuencias ya que el queso posee una carga microbiana nativa.



8.2. Material biológico.

Las cepas de los microorganismos patógenos utilizadas para éste proyecto fueron obtenidas del cepario de la Facultad de Química-UNAM y las cepas de *S. sciuri* y *Enterococcus* sp. pertenecen a la colección de microorganismos aislados del queso Cotija del laboratorio 312 de la Facultad de Química-UNAM.

Estos microorganismos fueron cultivados en los medios y condiciones óptimas como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Microorganismos utilizados para el análisis y condiciones de enriquecimiento.

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



8.3. Inactivación y obtención del pellet celular.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación de cada microorganismo se llevó a cabo la inactivación por calor y obtención del pellet celular.

- Inactivar por calor a 80°, 20 min.
- Centrifugar a 10 000X g /5 minutos, a 4°C.
- Resuspender el pellet celular en 500 µL de solución salina estéril al 0.85% de NaCl, transferir a un tubo de microcentrifuga.
- Centrifugar a 10 000X g /5 minutos, a 4°C.

Se eliminaron las fases acuosas y los paquetes celulares se conservaron a -20°C hasta la extracción de ADN.

8.4. Extracción de ADN (Kit FAST ID).

A partir del pellet celular se realizó la extracción de ADN mediante un Kit comercial (FAST ID).

- Preparar al momento una solución con (por reacción); proteínasa K (10mg/mL), solución de lisis (1mL) y lisozima 8.5-10 mg). Añadir 1mL a cada eppendorf.
- Incubar a 65°C /30min (Thermomixer, Eppendorf)
- Añadir cloroformo en relación 1:1, agitar vigorosamente y centrifugar a 10 000X g /5 minutos, a 4°C.
- Separar la fase acuosa (superior) transfiriendo 500 µL a un tubo de microcentrifuga de 2 mil.
- Añadir buffer de unión en relación 1:1.
- Centrifugar a 10 000X g /5 minutos, a 4°C.
- Pasar el sobrenadante a una columna de silica.
- Lavar la columna con 0.8-1.0 mL de buffer de lavado (Genomic Wash buffer)
- Centrifugar a 10 000X g /2 minutos o dejar pasar por un equipo colector para filtración al vacío (Manifold, Qiagen).



- Lavar la columna 3 veces con 0.8-1.0 mL de etanol al 75%
- En cada ocasión centrifugar a 10 000X g /2 minutos o dejar pasar por un equipo colector para filtración al vacío (Manifold, Qiagen).
- Colocar la columna en un tubo para microcentrifuga estéril de 2 mL.
- Eluir y colectar el ADN con 0.1-0.2 mL de TE (Tris-EDTA) 1x a 65°C. El ADN se conservó a -20°C.

8.5. Cuantificación de ADN en las muestras.

Una vez realizada la extracción de ADN se llevó a cabo la medición de la concentración de ADN de cada una de las muestras (Equipo Epoch, BioTek), este equipo nos proporcionó concentración de ADN, absorbancia a 260 nm y 280 nm, índice de pureza, y los gráficos de absorbancia.

- Limpiar el equipo (placa) con agua grado biología molecular, utilizando puntas de micropipeta estériles.
- Una vez obtenida una lectura base, comenzar a medir por duplicado cada extracción de ADN.
- La primera línea corresponde cada corrida al blanco que consiste en agua grado biología molecular.



8.6. Cuantificación de inóculos mediante vertido en placas BHI e inoculación de muestras de queso Cotija.

Para tener un control positivo de *S. aureus* a partir de cantidades conocidas de este microorganismo viable y comprobar que la metodología es adecuada para este análisis en presencia de la matriz alimentaria, se obtuvieron inóculos conocidos de *S. aureus* viables de la siguiente manera:

- Tomar con el asa microbiológica de 5 a 10 colonias de una placa con *Staphylococcus aureus* en condiciones asépticas, resuspender en un tubo con 10 mL de solución salina o agua peptonada (dilución 10^{-1})
- Agitar con vortex durante 15 s.
- Tomar 1 mL de este tubo y colocar en otro tubo con 9 mL de solución salina o agua peptonada (dilución 10^{-2}). Continuar las diluciones decimales sucesivas para 3 tubos de 9 mL más (dilución 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , etc.)
- De las diluciones requeridas, tomar 1 mL para realizar vertido en placa de agar BHI por duplicado, incubar a 37°C, 24h y 1 mL para inocular tubos con 25 mL de caldo nutritivo + 2.5 mL de la fase intermedia obtenida de centrifugar una muestra de queso Cotija previamente homogenizada con Stomacher en agua peptonada tratada con neutrasas (1mL/1h/42°C), incubar a 37°C y 250 rpm durante 48 h, al término de la incubación realizar el conteo de las placas y la inactivación, extracción, cuantificación de ADN de los microorganismos presentes en el caldo nutritivo y realizar PCR en tiempo real.



8.7. PCR punto final.

Esta reacción se llevó a cabo para amplificar la región V3 del gen ribosomal 16 utilizando los cebadores reportados por Ercolini (2004), cuyas secuencias y posiciones se muestran en la tabla 4.

- Una vez cuantificado el ADN se realizan los cálculos para realizar la dilución necesaria para ajustar la concentración del ADN a 10 ng/ μ L (en algunos casos fue necesario concentrar y volver a medir concentración de ADN).
- Se parte de ADN con concentración de 10 ng/ μ L.
- La reacción se lleva a cabo en un volumen de 50 μ L.

Tabla 4. Secuencias de cebadores de la región V3 del gen ribosomal 16s utilizadas para PCR punto final.

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

En la tabla 5 se presentan los reactivos utilizados para la reacción de PCR punto final, este se utilizó para la verificación de la integridad de ADN extraído para la región V3 del gen ribosomal 16s.



Tabla 5. Reactivos y concentraciones utilizados para PCR punto final.

No.	Reactivo	[] inicial	[] final	Vol. 1RXN.
1	Agua.	--		28.5 μ L
2	Buffer	10x	1x	5 μ L
3	dNTP's	10mM	0.2mM	1 μ L
4	338 dir	10 μ M	0.5 μ L	2.5 μ L
5	518 rev	10 μ M	0.5 μ L	2.5 μ L
6	pfu	2.5 U/ μ L	1.25 U	0.5 μ L
7	ADN	10ng/ μ L	100ng	10 μ L
Volumen Total				50 μ L



8.8. PCR en tiempo real.

Se llevó a cabo para amplificar una región específica de *Staphylococcus aureus*.

- Se parte de ADN con concentración de 10 ng/ μ L.
- La reacción se lleva a cabo en un volumen de 20 μ L. Reactivos y concentraciones de PCR tiempo real.
- En la tabla 6 se presentan los reactivos utilizados para la reacción de PCR Tiempo real, este se utilizó para el gen específico para detectar *Staphylococcus aureus* en las muestras de queso Cotija, en el queso prueba, inoculado y sin inocular, y verificar que existe amplificación específica para *Staphylococcus aureus*.
- Para cada placa se incluye un control negativo denominado NTC que consiste en la mezcla de reacción excluyendo el ADN y supliendo dicho volumen por agua grado biología molecular y un control positivo que consiste en realizar la mezcla de reacción con ADN de la cepa pura de *S. aureus*.

Tabla 6. Reactivos y concentraciones de PCR en tiempo real

No	Reactivo	[] inicial	[] final	Vol. 1 RXN
1	Agua	--	--	4 μ L
2	Master mix	2x	1x	10 μ L
3	Custom desing (primers + sonda)	20x	1x	1 μ L
4	ADN	10ng/ μ L	50ng	5 μ L
Volumen total				20 μ L



8.9. Cuantificación mediante placas Petrifilm Staph Express®.

Debido a que Petrifilm Staph Express® representa ventajas frente a la metodología tradicional de cuantificación *Staphylococcus aureus* se decidió probar si esta técnica se puede utilizar para esta matriz alimenticia ya que presenta microbiota acompañante. Con esta finalidad se cuantifico como se indica a continuación:

- Pesar 25 g de queso Cotija en una bolsa para Stomacher. (muestra previamente homogenizada que no posea la corteza).
- Añadir 225 mL de agua peptonada a pH=7.2 y homogenizar en el Stomacher por 3 min/ máx. velocidad. Vaciar el contenido a un matraz estéril.
- Previamente tener preparados 3 tubos con 9 mL de agua peptonada estéril, y otro tubo con 2 mL de agua peptonada estéril.
- Tomar 1 mL de la solución del matraz en uno de los tubos (dilución 10^{-2}), homogenizar el tubo y tomar 1 mL para inocular el siguiente tubo con 9 mL de agua peptonada (dilución 10^{-3}), homogenizar el segundo tubo y tomar 1 mL de este tubo e inocularlo en el tercer tubo con 9 mL de agua peptonada (dilución 10^{-4}).
- Inocular 1mL de cada dilución por duplicado en placas petrifilm Staph Express e incluir una placa blanco inoculando 1 mL de agua peptonada estéril.
- Incubar las placas Petrifilm Staph Express® a 37°C durante 24 h, al terminar este tiempo realizar la interpretación de las placas.



8.10. Cuantificación mediante placas de Agar Baird Parker.

La presencia de microbiota acompañante en el queso Cotija no permitió distinguir fiablemente *Staphylococcus aureus* en las placas Petrifilm Staph Express® por ello se realizaron pruebas con el Agar Baird Parker.

Cuyo procedimiento se muestra a continuación:

- Tomar 25 g de queso Cotija y colocar en una bolsa para stomacher. (sin corteza/homogenizada).
- Añadir 225 mL de agua peptonada a pH=7.2 y homogenizar en el Stomacher por 2.5 min/ máx. velocidad. Vaciar el contenido a un matraz estéril, esperar a que sedimenten los sólidos del queso.
- Previamente tener preparados 3 tubos con 9 mL de agua peptonada estéril, y otro tubo con 2 mL de agua peptonada estéril.
- Tomar 1 mL de la solución del matraz en uno de los tubos (dilución 10^{-2}), homogenizar el tubo y tomar 1 mL para inocular el siguiente tubo con 9 mL de agua peptonada (dilución 10^{-3}), homogenizar el segundo tubo y tomar 1 mL de este tubo e inocularlo en el tercer tubo con 9 mL de agua peptonada (dilución 10^{-4}).
- De una dilución de *S. aureus* en concentración conocida (inoculada de un cultivo puro de *S. aureus* viable y cuantificado en agar BHI) mezclar en relación 1:1 con la dilución 10^{-1} de una muestra de queso Cotija.
- Inocular 100 μ L de cada dilución por duplicado en placas de agar Baird Parker, extendiendo con varillas de vidrio estériles, incluir una placa con la mezcla de *S. aureus* + queso Cotija.



- Incubar las placas a 37°C durante 48 h, al terminar este tiempo realizar la interpretación de la placa.

8.11. Datos de las muestras.

Se consideraron 369 ranchos registrados como productores de queso Cotija en los estados de Jalisco y Michoacán, se calculó que el número estadísticamente representativo para el muestreo, es de 100. Con base en lo anterior se seleccionaron aleatoriamente 100 ranchos de los siguientes municipios: Tocumbo, Los Reyes, Buena Vista Tomatlán y Cotija de la Paz en el estado de Michoacán y Quitupan y Santa María del Oro, Jilotlán de los Dolores, en el estado de Jalisco. Se establecieron los siguientes criterios de inclusión: a) mínimo número necesario de vacas por hatos para producir queso Cotija artesanal madurado (de 30-50) y estratificarlos por estado y contar con domicilio. b) Vigencia en el registro oficial de productores, proporcionado por las autoridades correspondientes de ambos estados. c) Sólo se muestrearon piezas de quesos con 90 días cumplidos de maduración. Criterios de exclusión: a) Los productores que no dieron el consentimiento para participar en el proyecto. El muestreo fue responsabilidad del CIIDIR-IPN ubicado en Jiquilpan, Michoacán, quienes enviaron a la Facultad de Química-UNAM aproximadamente 2 kg de cada muestra de queso para analizar.

Cabe mencionar que solamente se obtuvieron 95 de las 100 muestras estimadas para el análisis.



8.12. Pretratamiento de las muestras de queso Cotija.

El queso Cotija posee una corteza dura que no se consume por lo cual se decidió excluirla del análisis por lo cual se eliminó en cada muestra bajo condiciones asépticas y para asegurar que la muestra tomada para el análisis es representativa de la pieza se homogenizaron individualmente, los utensilios utilizados en esta etapa fueron lavados con agua y detergente, desinfectados sumergiendo en una solución de hipoclorito al 1%, roseados con etanol al 70% y sometidos a luz UV durante 5 min, esta etapa se repitió antes de manipular cada muestra.

Haciendo uso de utensilios limpios y desinfectados se realizó el pretratamiento de cada muestra como se indica a continuación.

- Eliminar la corteza con ayuda de un cuchillo.
- Fraccionar el queso Cotija con un cuchillo diferente al utilizado en la eliminación de la corteza.
- Homogenizar en condiciones asépticas (campana), con ayuda de un procesador de alimentos previamente sanitizado, trasladando los trozos con ayuda de una cuchara metálica previamente sanitizada.
- Pesar porciones de 25 g y colocarlas en bolsas bien cerradas y agrupadas en bolsas con cierre por número de muestra (se pesaron 5 porciones de cada muestra para su posterior análisis).

Las porciones fueron almacenadas a -70°C .



8.13. Preenriquecimiento de las muestras de queso Cotija.

- Colocar 25g de queso en 225 mL de citrato de sodio 2%/agua peptonada, pH= 8 (muestras descongeladas previamente).
- Anadir 1 mL de neutrasas, incubar durante 1 h a 42 °C
- Homogenizar en Stomacher durante 5 minutos a máxima velocidad. Centrifugar a 1 500X g, en la fase intermedia quedan los microorganismos libres de la red proteínica.
- Inocular con 2.5 mL de la fracción intermedia obtenida para cada muestra, 25 mL de caldo nutritivo por duplicado.
- Incubar a 37°C y 250 rpm durante 48hrs.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación de cada grupo de muestras continuar con los pasos indicados en las secciones **8.3.**, **8.4.** y **8.5.**.

Seleccionar al azar 5 de cada 20 muestras para realizar PCR punto final (sección **8.7.**) de la región del gen ribosomal 16s para garantizar que el ADN obtenido es de calidad amplificable y realizar PCR en tiempo real (sección **8.8.**) de la totalidad de las muestras incluyendo un control negativo y uno positivo en cada placa.



8.14. Cuantificación mediante placas de Agar Baird Parker de las muestras.

Posteriormente se realizó el conteo en placa por la metodología tradicional de las 6 muestras cuyos Ct indiquen la presencia de ADN de *S. aureus*.

- Tomar 25 g de queso Cotija y colocar en una bolsa para Stomacher. (sin corteza/homogenizada).
- Añadir 225 mL de agua peptonada a pH=7.2 y homogenizar en el Stomacher por 2.5 min/ máx. velocidad. Vaciar el contenido a un matraz estéril, esperar a que sedimenten los sólidos del queso.
- Previamente tener preparado 1 tubo con 9 mL de agua peptonada estéril.
- Tomar 1 mL de la solución del matraz y transferir tubo (dilución 10^{-2}), de ser necesario realizar las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} .
- Inocular 100 μ L de cada dilución por duplicado en placas de agar Baird Parker, extendiendo con varillas de vidrio estériles.
- Incubar las placas a 37°C durante 48 h, al terminar este tiempo realizar la interpretación de la placa.
- Seleccionar el número de colonias sospechosas para realizar las pruebas de coagulasa y termonucleasa (**ANEXO B**).



9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

9.1. Selección del gen de interés y la secuencia de cebadores a utilizar para PCR en tiempo real.

Existen diversas secuencias de cebadores y sondas utilizados en investigaciones relacionadas con *Staphylococcus aureus*, algunas de ellas se encuentran reportadas en la tabla 7.

La utilización de una secuencia u otra radica en el tipo de detección de *S. aureus* que se requiera ya que hay genes relacionados con la resistencia a antibióticos como lo son *femA* y *AcrB/AcrD/AcrF*. También existen otros genes como lo son *nuc* y *clfA* que permitirían detectar *S. aureus* independientemente de sus diferencias interespecie.

Para la selección del gen blanco que permita la identificación específica de *S. aureus* se consideró su presencia en cualquier cepa de dicha especie, una baja frecuencia de mutación, un alto valor de identidad y el menor valor E (espectancia), estos dos últimos parámetros obtenidos del análisis BLAST. El valor E indica la probabilidad de que la secuencia en análisis sea similar a cualquier otra secuencia de ADN por azar.

**Tabla 7. Secuencias de cebadores y sondas reportados para la identificación de *S. aureus*.**

Gen	Codifica	Secuencias
nucA	TERMONUCLEASA	F 5'-AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC-3' R 5'-GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT-3' 5'-TAGGATGCTTTGTTTCAGGTGTATCAACCA3' (Ruiz <i>et al.</i> , 2005)
nuc1	TERMONUCLEASA	F 5'-GCGATTGATGGTGATACGGTT-3' R 5'-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGT-3' (Zhang <i>et al.</i> , 2009)
coa	COAGULASA	F 5'-ATA GAG ATG CTG GTA CAG G-3' R 5'-GCT TCC GAT TGT TCG ATG-3' (Archana <i>et al.</i> , 2010)
clfA	PROTEINA DE SUPERFICIE DE UNION A FIBROGENO	F 5'-GCA AAA TCC AGC ACA GGA AAC GA-3' R 5'-CTT GAT ATG CTG GTA CAG G-3' (Mason <i>et al.</i> , 2001)
egcAU	REGION INTERGENICA sei-seln	F 5'-CTT CAT ATG TGT TAA GTC TTG CAG CTT-3' R 5'-TTC ACT CGC TTT ATT CAA TTG TTC TG-3' 5'-(6-FAM) ATGTAAATGGCAATCCT (MGB)-3' (V. Fusco <i>et al.</i> , 2011)
fem A	RESISTENCIA A METACILINA	F 5'-AAAAAAGCACATAACAAGCG-3' R 5'-GATAAAGAAGAAACCAGCAG-3' (Mehrotra <i>et al.</i> , 1999)
AcrB/AcrD/AcrF	RESISTENCIA A ACRIFLAVINA	F 5'-TCAACATCTTTCGCATGATTCAACAC-3' R 5'-CTAGCTTTATTTTCAGCAGGTGACGAT-3' 5'-CTTGCTCCGTTTCACCAGGCTTCGGTGT-3' (Trnčíková <i>et al.</i> , 2009)



El análisis de la secuencia seleccionada para la detección específica de *S. aureus* se muestra en la figura 6, se puede observar que se obtiene un valor E que va de $6e^{-47}$ a $3e^{-30}$ y una identidad de 100% y 99%.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF009611.1	Staphylococcus aureus strain HG211	185	185	100%	6e-47	100%
AF009611.1	Staphylococcus aureus 088A02176	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus HO 5096 0412 complet	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus 71193, complete genom	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus VC40, complete genom	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus 11819-97, complete ge	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus M013, complete genom	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus LGA251 complete geno	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus T0131, complete genom	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus JKD6159, complete ger	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus str. JKD6008, complete	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus ED133, complete genom	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus ST398 complete genom	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus TW20, complete genom	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus strain 4196Y	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus strain Wright's C/ra	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus strain 4417	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus strain 1088Y	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus USA300_TCH1516, com	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus str. Newman DNA, com	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus strain 2513	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus strain 1911	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus strain 214	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus strain G26	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus strain G16	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus strain G15	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus strain G14	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus strain G13	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus strain G12	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus strain G11	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus strain G10	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus strain G9	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus strain G8	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus strain G7	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus strain G6	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus strain G5	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus strain G4	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus strain G3	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus strain G2	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus strain G1	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus strain R11	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus strain R27	185	185	100%	3e-45	99%
AF009611.1	Staphylococcus aureus strain R2E	185	185	100%	3e-45	99%

Figura 6. Análisis con BLAST de la región amplificable por el juego de sonda y cebadores diseñados por Applied Biosystems.



9.2. Pruebas de validación del método de detección.

Para probar que el juego de cebadores y sonda diseñados permiten detectar *S. aureus* en la matriz alimenticia que se va a analizar se realizó extracción de ADN de una muestra de queso Cotija y *S. aureus*, así como del mismo queso Cotija inoculado con una cantidad de UFC conocidas.

La metodología para separar a las bacterias de la red proteínica que se lleva a cabo en el laboratorio desde hace varios años, involucra la utilización de citrato de sodio como medio de homogenización de la muestra. Sin embargo, se ha reportado la inhibición del crecimiento de *S. aureus* con citrato de sodio, por lo que se comparó la utilización de agua peptonada y citrato de sodio en ese paso.

Por otra parte surgió la propuesta de hacer el medio de enriquecimiento (caldo nutritivo) más selectivo para el crecimiento de *S. aureus*. Se encontraron reportes de la utilización de 7% de NaCl para tal fin, por lo que se probó el efecto de la sal en el enriquecimiento de *S. aureus*.



En la tabla 8 se muestran los resultados de las diversas condiciones.

Tabla 8. Experimento Inóculo conocido y pruebas de condiciones 1.

Muestra	Condiciones	Ct promedio*	DS
NTC	Control de Reactivos	>30	--
QC-9	133 UFC, Agua Peptonada , Caldo Nutritivo , 7% de sal	13.69	0.17
QC-9	133 UFC, Agua Peptonada , Caldo Nutritivo	14.11	1.04
QC-9	133 UFC, Citrato de Sodio , Caldo Nutritivo , 7% de sal	15.55	1.42
QC-9	133 UFC, Citrato de Sodio , Caldo Nutritivo	13.81	0.27
QC-9	8 UFC, Agua Peptonada , Caldo Nutritivo , 7% de sal	15.57	0.76
QC-9	8 UFC, Agua Peptonada , Caldo Nutritivo	14.66	0.54
QC-9	8 UFC, Citrato de Sodio , Caldo Nutritivo , 7% de sal	13.87	0.33
QC-9	8 UFC, Citrato de Sodio , Caldo Nutritivo	14.80	0.49
QC-9	Sin inocular, Citrato de Sodio, Caldo Nutritivo	>30	--
S. aureus		13.76	0.07

* Los valores reportados son el promedio de 2 réplicas.

Puede observarse que los valores de Ct obtenidos para la muestra inoculada son muy semejantes al valor obtenido para la cepa pura de *S. aureus*. Independientemente de la cantidad de UFC que se inoculó en la muestra, durante el enriquecimiento se obtiene la cantidad suficiente de bacterias para que pueda ser detectado con un Ct comparable con la cepa pura de *S. aureus*.

Se observa que tanto para la muestra inoculada con 8 UFC como para la que se inoculó con 133 UFC, el Ct obtenido es similar al cambiar el medio de homogenización.

La adición de 7% de NaCl al medio de enriquecimiento no tiene impacto en cuanto a la interpretación de los resultados respecto a las muestras enriquecidas en Caldo Nutritivo no adicionado con NaCl, independientemente de la cantidad de UFC inoculadas.



Por lo tanto *S. aureus* viable puede ser detectado mediante PCR en tiempo real ya sea como cepa pura o en la matriz alimenticia e independientemente de la cantidad en la que se encuentre.

Puede utilizarse Agua Peptonada o Citrato de Sodio como medio de homogenización y Caldo Nutritivo adicionado o no con 7% de NaCl.

Posteriormente se realizó nuevamente un experimento semejante para corroborar los resultados, sólo que se inoculó una menor cantidad de UFC de *S. aureus*.

Se puede observar en la tabla 9 que nuevamente no hay un efecto importante al cambiar el medio de homogenización ni la concentración de NaCl en el medio de enriquecimiento.

Tabla 9. Experimento Inóculo conocido y prueba de condiciones 2.

Muestra	Condiciones	Ct	DS
NTC	Control de Reactivos	>30	
QC-9	6 UFC, Agua Peptonada , Caldo Nutritivo , 7% de sal	16.33	1.02
QC-9	6 UFC, Agua Peptonada , Caldo Nutritivo	15.09	0.09
QC-9	6 UFC, Citrato de Sodio , Caldo Nutritivo , 7% de sal	15.36	0.22
QC-9	6 UFC, Citrato de Sodio , Caldo Nutritivo	14.78	0.1
QC-9	>100 UFC, Agua Peptonada, Caldo Nutritivo, sin incubar	27.26	0.04
<i>S. aureus</i>		13.49	0.28

* Los valores reportados son el promedio de 2 réplicas.

Se puede observar que nuevamente la cantidad de UFC inoculadas, el medio de homogenización y la adición de NaCl al medio de enriquecimiento no tienen impacto para la discriminación de resultados positivos de negativos. Sin embargo una aportación importante de este experimento es el impacto del paso de enriquecimiento ya que la muestra inoculada con > 100 UFC que no se sometió a este paso



presenta un valor de Ct tardío, como puede observarse en la figura 7. Esto sí puede tener impacto en la interpretación de resultados, por lo cual la realización del paso de enriquecimiento facilita la interpretación o discriminación entre resultados positivos de negativos, ya que si este se encuentra presente y viable, durante el enriquecimiento alcanza una cantidad suficiente para poder ser detectado inequívocamente.

De acuerdo a lo anterior puede utilizarse citrato de sodio o agua peptonada indistintamente, de igual manera puede o no adicionarse el medio de enriquecimiento con 7% de NaCl.

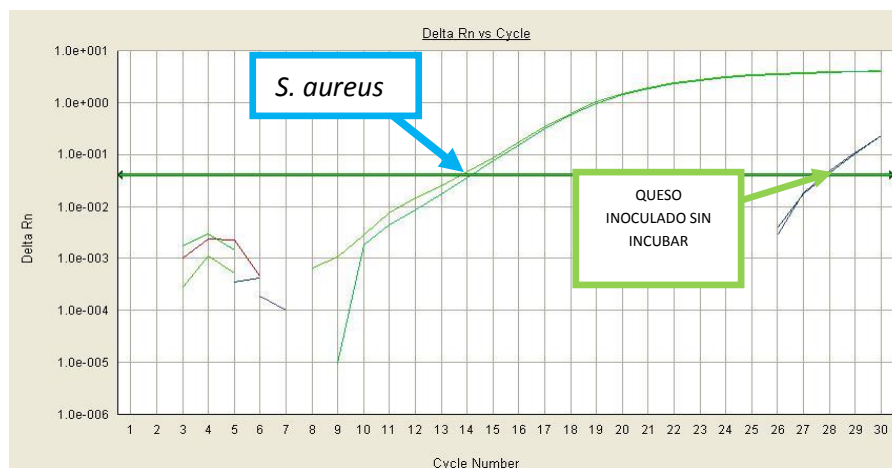


Figura 7. Resultados de PCR en tiempo real para la cepa pura de *S. aureus* y el QC-9 inoculado con >100 UFC, homogenizado en Agua Peptonada y enriquecido en Caldo Nutritivo adicionado con 7% de NaCl.

*Se presentan los resultados de dos determinaciones.

Hasta este momento se había establecido que es posible detectar *S. aureus* en la matriz alimenticia a analizar, sin embargo, era necesario saber si otros microorganismos podían causar interferencia en la detección de *S. aureus* o bien que el juego de cebadores y sonda no fuera lo suficientemente específico para discriminar de otros microorganismos. Por ello se analizaron extracciones de ADN de otros



microorganismos patógenos de interés en el proyecto, así como de *Enterococcus* sp. y *S. sciuri*, ya que éstos se han aislado en el queso Cotija. Los resultados de PCR tiempo real se muestran en la tabla 10 y 11 respectivamente.

Tabla 10. Resultados de PCR en tiempo real para *S. aureus* y otros microorganismos patógenos.

Muestra	Ct
NTC	>30
<i>Salmonella</i> spp.	>30
<i>Listeria monocytogenes</i>	>30
<i>E. coli</i>	>30
<i>Brucella</i> spp.	>30
<i>S. aureus</i>	13.57

* Los valores reportados son el promedio de 2 réplicas.

Como se observa en la figura 8 no hay amplificaciones específicas para otros microorganismos patógenos por lo cual se descarta la posibilidad de interferencia si estuvieran presentes en la muestras de queso Cotija a analizar.

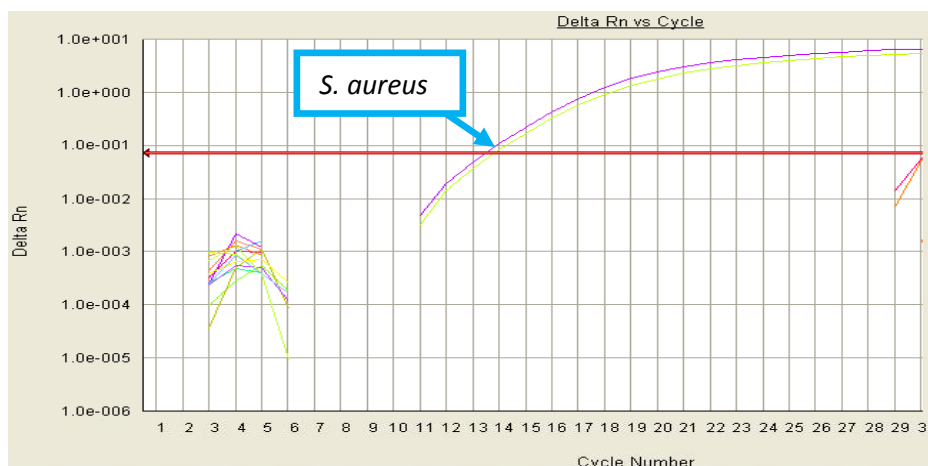


Figura 8. Resultados de PCR en tiempo real para *S. aureus* y otros microorganismos.

*Se presentan los resultados de dos determinaciones.



También se decidió realizar el mismo experimento para *Staphylococcus sciuri* y *Enterococcus sp.* que son microorganismos aislados del queso Cotija (Hernández Mejía, 2007; Bravo M. 2008).

En la tabla 11 y la figura 9 se observan los resultados obtenidos para *S. aureus*, *Enterococcus sp.* y *S. sciuri*. De acuerdo a estos resultados ninguno de los microorganismos analizados causan interferencia alguna en la detección de *S. aureus* vía PCR tiempo real.

Tabla 11. Resultados de PCR en tiempo real para *S. aureus* y *S. sciuri*.

Muestra	Ct
NTC	> 30
<i>S. sciuri</i>	> 30
<i>Enterococcus sp.</i>	> 30
<i>S. aureus</i>	13.57

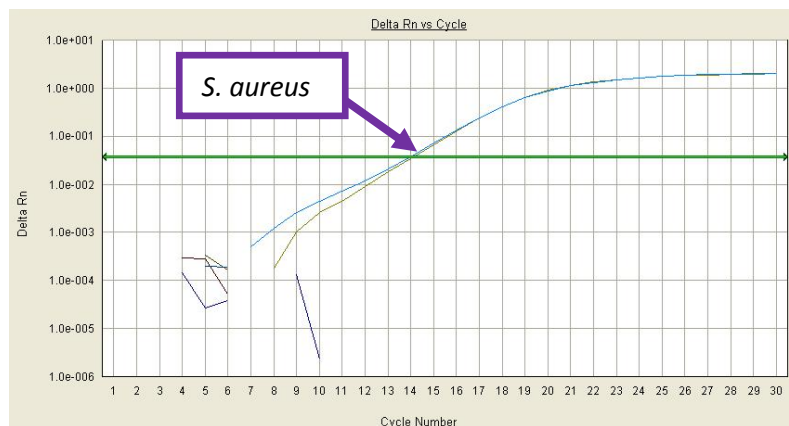


Figura 9. Resultados de PCR en tiempo real para *S. aureus* y *S. sciuri*.

*Se presentan los resultados de dos determinaciones.



Como conclusiones de esta primera parte, el juego de cebadores y sonda diseñados son específicos para *S. aureus* y la etapa de enriquecimiento es importante para la detección del microorganismo ya que si éste se encuentra presente y viable durante el enriquecimiento alcanza una cantidad suficiente para poder ser detectado por PCR en tiempo real y permitir la discriminación fácil entre resultados positivos y negativos.

9.3. Pruebas de validación del método de cuantificación.

9.3.1. Petrifilm Staph Express®.

Debido a las ventajas que presenta el uso de métodos rápidos como lo son las placas Petrifilm Staph Express® se realizaron algunos experimentos para determinar si podían ser utilizadas en la cuenta de *S. aureus* procedente del queso Cotija.

Como se observa en la figura 10, los resultados en las placas Petrifilm no son claros ni fáciles de interpretar ya que se tienen colonias de varios colores y tonalidades.

Dentro de los problemas causados por la diversidad de colonias presentes en las placas se tiene la presencia de colonias verdes de mayor tamaño y en mayor cantidad a las colonias características de *S. aureus*, se presentaron diversas tonalidades de colores entre rojo y violeta (violeta azulado, lila, violeta rosáceo, etc.), la presencia de estas tonalidades impide la discriminación de colonias presuntivamente positivas de aquellas que no lo son. Se sabe que en este producto existe la presencia de varias especies de *Staphylococcus* (sección "Características microbiológicas de queso Cotija") y los resultados obtenidos indican que este método no permite discriminar entre ellas y *S. aureus*.



También complementó la prueba con los Discos Staph Express[®], sin embargo, no se obtuvieron las zonas rosas características de *S. aureus*, lo anterior se demostró al inocular una muestra de queso Cotija con *S. aureus*, sólo se obtuvo un punteado rosa no característico.

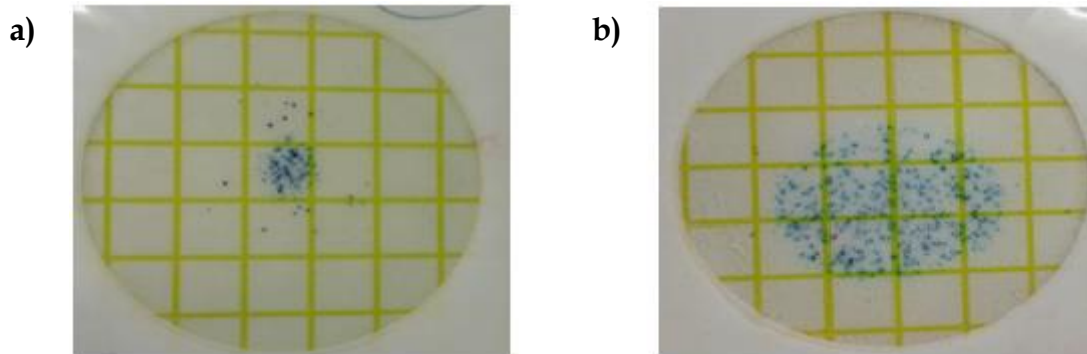


Figura 10. Placas Petrifilm Staph Express[®] inoculadas a) con la dilución 10^{-4} de la muestra QC-16 b) con la dilución 10^{-2} de la muestra QC-25.

Por lo expuesto las Placas Petrifilm Staph Express[®] no son un método adecuado de cuantificación de *S. aureus* en muestras de queso Cotija, debido a la variedad y complejidad de la microbiota presente en este producto.



8.3.2. Pruebas con Agar Baird Parker.

Debido a los problemas para la interpretación de las placas Petrifilm Staph Express se decidió utilizar el agar Baird Parker para el recuento de *S. aureus*. Las colonias características de *S. aureus* son negras, circulares, brillantes, convexas, lisas, de diámetro de 1 a 2 mm, muestran una zona opaca y un halo claro alrededor de la colonia.

Se realizaron pruebas con la muestra de queso Cotija QC-10, en primera instancia se inocularon 2 placas de agar Baird Parker cada una con 100 μL de la dilución 10^{-1} y 10^{-2} respectivamente.

En la figura 11 a se observan colonias obtenidas de la microbiota nativa del queso, éstas eran colonias negras y grandes con un halo oscuro y otras colonias negras más pequeñas sin halo lo que no corresponde a la morfología típica de *S. aureus*, procedentes de la dilución 10^{-1} de la muestra QC-10. En la dilución 10^{-2} de la misma muestra no se observó crecimiento alguno, como pude observarse en la figura 11 b.

También se realizó una prueba inoculando con *S. aureus* la misma muestra de queso Cotija de tal forma que se esperaba obtener aproximadamente 100 UFC/ mL de *S. aureus* o bien aproximadamente 10 UFC procedentes del inóculo. Como se observa en la figura 11 c se obtuvieron colonias con un halo oscuro, colonias pequeñas sin halo al igual que en la dilución 10^{-1} sin *S. aureus* y además se obtuvieron 11 colonias características de *S. aureus* que pueden diferenciarse fácilmente debido al halo debido a la hidrolisis de la lipovitelina .

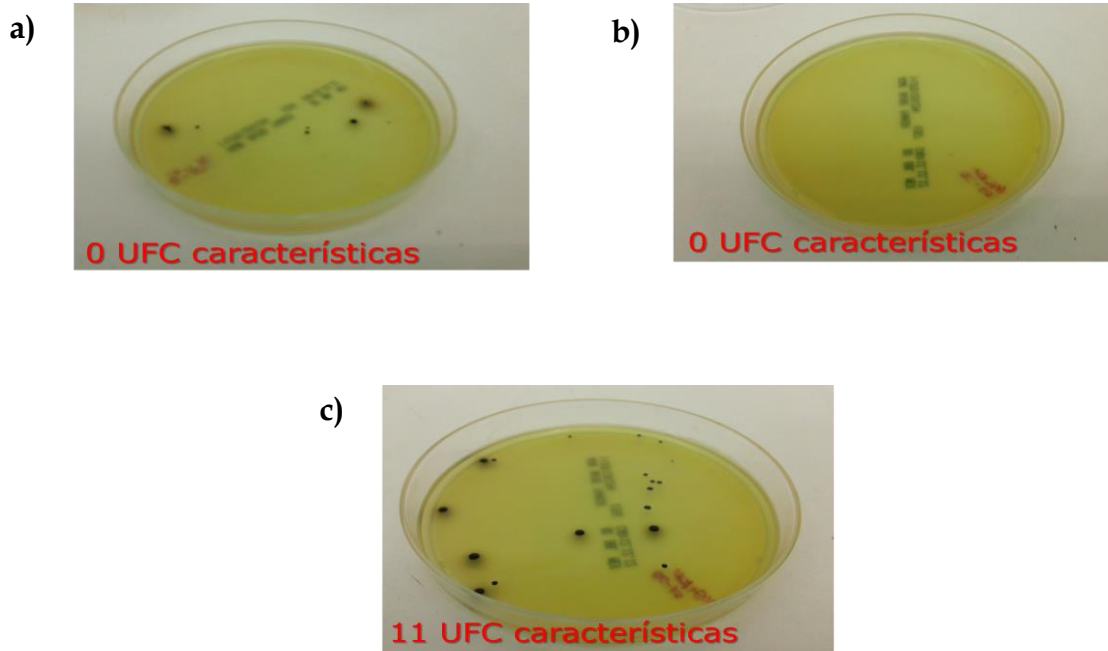


Figura 11. Placas de Agar Bair Parker inoculadas con la muestra QC-10.

a) Dilución 10^{-1} , b) Dilución 10^{-2} , c) Dilución 10^{-1} inoculada con *S. aureus*.

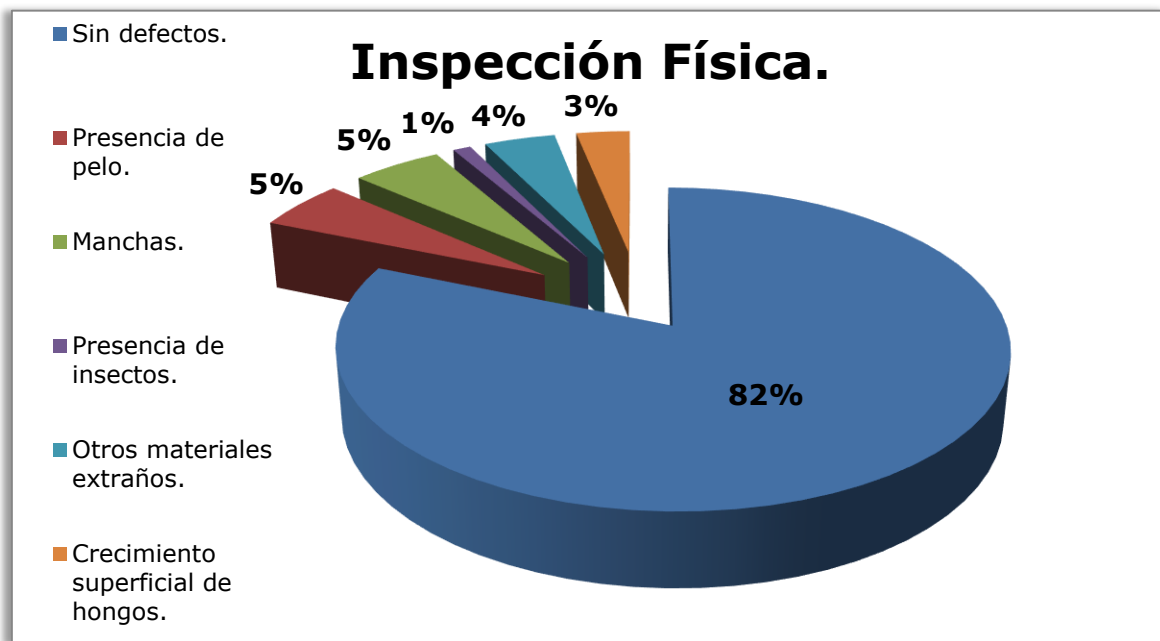
9.4. Inspección física de las muestras de queso Cotija.

Debido a que éste es un producto elaborado artesanalmente, existen diversas fuentes de contaminación y la inspección física puede aportar información importante para los productores y ubicar posibles focos de contaminación.

Durante la inspección física, realizada en condiciones asépticas, se encontró que el 100% de las muestras presentan aroma característico, el 92% de las muestras presentan color característico tanto en la corteza (de marfil a ocre) como en el interior del queso Cotija (amarillo claro uniforme).



Como se observa en la gráfica 1 se encontró que el 82% de las muestras carecen completamente de algún defecto de color o materia extraña. Mientras que del 18% de las muestras que presentaron algún defecto, los que se encontraron con mayor frecuencia (5%) fue la presencia de algún fragmento de pelo (pestaña o cabello) y la presencia de pequeñas manchas de un color diferente al característico (amarillo, negro, rosa, naranja), el 4% de las muestras poseían un fragmento de materia extraña al queso, (pequeños trozos de manta, astillas, hilo).



Grafica 1. Defectos encontrados en las muestras de queso Cotija.



En la tabla 12 se presenta la relación de defectos y las muestras en las que se encontraron.

Algunas de las muestras presentaron más de un defecto como los son las muestras QC-20, QC-37 y QC-86.

Tabla 12. Defectos encontrados durante la inspección física y muestras en las que se presentaron.

Defecto.	Muestras.
Presencia de pelo.	QC-8, QC-20, QC-37, QC-39, QC-86
Manchas rosas, naranjas o amarillas, cafés o negras.	QC-16, QC-20, QC-63, QC-72, QC-80, QC-38, QC-55, QC-69
Presencia de Insectos.	QC-37
Otros materiales extraños.	QC-11, QC-26, QC-34, QC-37
Crecimiento superficial de hongo.	QC-86, QC-87, QC-89

En la figura 12 se observan algunos ejemplos de las materias extrañas encontradas en las muestras de queso Cotija a muestra la presencia de una pestaña en la muestra QC-37, b un trozo de madera (pequeña vara probablemente de alguna planta) encontrado en la muestra QC-26, en c se presentan unos trozos de manta la cual sirve de molde para el queso hallados en la muestra QC-25 y en d puede verse un insecto encontrado en la muestra QC-37.

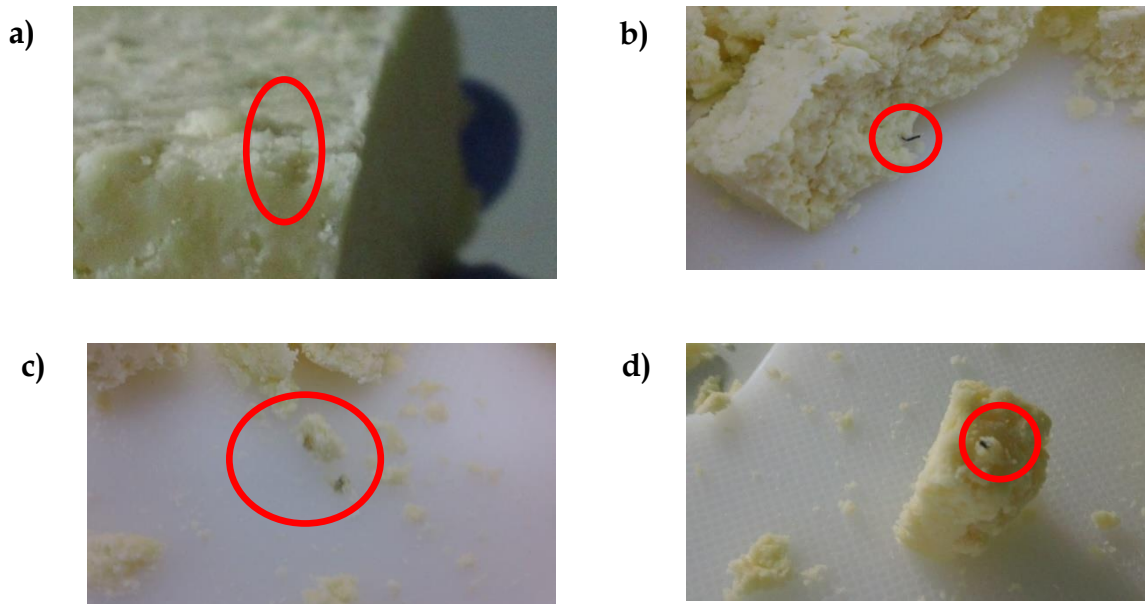


Figura 12. Ejemplos de algunas de las materias extrañas encontradas durante la inspección física, a) Pestaña en la muestra QC-37, b) Trozo de madera en la muestra QC-26, c) Trozo de manta (yute) en el interior de la muestra QC-25, d) Insecto en la muestra QC-37.

9.5. Resultados de PCR convencional.

Para asegurar que se extrajo ADN bacteriano de las muestras de queso Cotija independientemente de que los resultados para *S. aureus* sean positivos o negativos se eligieron 5 muestras al azar de cada 20, para realizar la reacción de PCR convencional, con los cebadores universales de la región V3 del gen ribosomal 16s, estas muestras se analizaron en conjunto con sus respectivos controles positivos y negativos, la reacción debe ser positiva en cualquier muestra que posea ADN de origen bacteriano.



En la figura 13 se muestra el ejemplo de uno de los geles obtenidos del análisis por PCR punto final

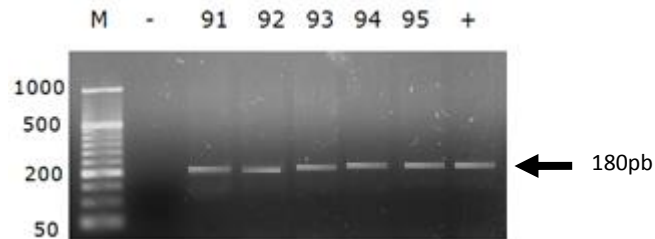


Figura 13. Resultados de PCR punto final de algunas muestras de queso Cotija.

Como se observa en la tabla 13, se obtuvo resultado positivo, es decir, una banda de aproximadamente 180 pb para cada una de las muestras analizadas, así como para *S. aureus*, mientras que dicha banda estuvo ausente para el blanco, que consisten en un control de reactivos que no posee ADN, en su lugar se adiciona agua grado biología molecular. Por lo tanto el ADN obtenido de las extracciones de ADN de las muestras de queso Cotija es de calidad amplificable.



Tabla 13. Resultados de PCR punto final para la región V3 del gen ribosomal 16s.

Muestra	Resultado	Muestra	Resultado
QC-5	+	QC-86	+
QC-10	+	QC-87	+
QC-13	+	QC-88	+
QC-15	+	QC-90	+
QC-17	+	QC-91	+
QC-22	+	QC-92	+
QC-28	+	QC-93	+
QC-29	+	QC-94	+
QC-32	+	QC-95	+
QC-39	+	QC-86	+
QC-42	+	QC-87	+
QC-48	+	QC-88	+
QC-52	+	QC-90	+
QC-55	+	QC-91	+
QC-58	+	QC-92	+
QC-63	+	QC-93	+
QC-68	+	QC-94	+
QC-72	+	QC-95	+
QC-75	+	<i>S. aureus</i>	+
QC-80	+	Blanco	-
QC-81	+		



9.6. Resultados de PCR en tiempo real.

En la tabla 14 se muestran los resultados obtenidos de PCR tiempo real para las muestras de queso Cotija. Se puede observar que para ningún caso se obtiene valores que puedan considerarse como positivos (Ct entre 13 y 18). Pero, existen 13 muestras (resaltadas en negritas) que presentan Ct menores a 30. Cabe resaltar QC-56 con $Ct=26.77\pm 0.21$, QC-72 cuyo $Ct=27.46\pm 1.98$ y QC-59 con $Ct=28.61\pm 0.20$, estas muestras presentaron los valores de Ct más bajos, no indican la presencia de ADN, pero en una concentración baja, sin embargo, sería de utilidad realizar el conteo en placa para comprobar la presencia de *S. aureus* viable.

Para este análisis se realizaron dos extracciones independientes para cada muestra y cada una de éstas se analizó por duplicado por PCR en tiempo real, para obtener un total de 4 valores por muestra.



Tabla 14. Presencia e ADN de *S. aureus* por de PCR tiempo real para las muestras de queso Cotija analizadas (QC-1 a QC-95).

MUESTRA	Ct	DS	RESULTADO	MUESTRA	Ct	DS	RESULTADO
QC-1	>30	-	Negativo	QC-49	>30	-	Negativo
QC-2	>30	-	Negativo	QC-50	>30	-	Negativo
QC-3	>30	-	Negativo	QC-51	>30	-	Negativo
QC-4	>30	-	Negativo	QC-52	~30	-	Negativo
QC-5	~30	-	Negativo	QC-53	29.31	2.39	(Positivo)
QC-6	>30	-	Negativo	QC-54	>30	-	Negativo
QC-7	>30	-	Negativo	QC-55	>30	-	Negativo
QC-8	>30	-	Negativo	QC-56	26.77	0.21	Positivo
QC-9	>30	-	Negativo	QC-57	>30	-	Negativo
QC-10	28.92	0.77	Positivo	QC-58	>30	-	Negativo
QC-11	>30	-	Negativo	QC-59	28.61	0.20	Positivo
QC-12	>30	-	Negativo	QC-60	>30	-	Negativo
QC-13	>30	-	Negativo	QC-61	29.34	1.83	(Positivo)
QC-14	>30	-	Negativo	QC-62	>30	-	Negativo
QC-15	28.15	0.21	Positivo	QC-63	>30	-	Negativo
QC-16	>30	-	Negativo	QC-64	>30	-	Negativo
QC-17	~30	-	Negativo	QC-65	>30	-	Negativo
QC-18	>30	-	Negativo	QC-66	>30	-	Negativo
QC-19	>30	-	Negativo	QC-67	>30	-	Negativo
QC-20	>30	-	Negativo	QC-68	>30	-	Negativo
QC-21	>30	-	Negativo	QC-69	>30	-	Negativo
QC-22	>30	-	Negativo	QC-70	29.45	0.10	(Positivo)
QC-23	>30	-	Negativo	QC-71	>30	-	Negativo
QC-24	>30	-	Negativo	QC-72	27.46	1.98	Positivo
QC-25	>30	-	Negativo	QC-73	>30	-	Negativo
QC-26	>30	-	Negativo	QC-74	>30	-	Negativo
QC-27	>30	-	Negativo	QC-75	>30	-	Negativo
QC-28	>30	-	Negativo	QC-76	28.94	0.80	Positivo
QC-29	>30	-	Negativo	QC-77	29.17	0.71	(Positivo)
QC-30	>30	-	Negativo	QC-78	>30	-	Negativo
QC-31	>30	-	Negativo	QC-79	>30	-	Negativo
QC-32	>30	-	Negativo	QC-80	>30	-	Negativo
QC-33	>30	-	Negativo	QC-81	>30	-	Negativo
QC-34	>30	-	Negativo	QC-82	29.43	0.48	(Positivo)
QC-35	>30	-	Negativo	QC-83	~30	-	Negativo
QC-36	>30	-	Negativo	QC-84	>30	-	Negativo



QC-37	>30	-	Negativo	QC-85	28.62	1.13	Positivo
QC-38	>30	-	Negativo	QC-86	>30	-	Negativo
QC-39	>30	-	Negativo	QC-87	>30	-	Negativo
QC-40	>30	-	Negativo	QC-88	>30	-	Negativo
QC-41	>30	-	Negativo	QC-89	>30	-	Negativo
QC-42	>30	-	Negativo	QC-90	>30	-	Negativo
QC-43	>30	-	Negativo	QC-91	>30	-	Negativo
QC-44	>30	-	Negativo	QC-92	>30	-	Negativo
QC-45	>30	-	Negativo	QC-93	29.20	0.80	(Positivo)
QC-46	>30	-	Negativo	QC-94	>30	-	Negativo
QC-47	>30	-	Negativo	QC-95	>30	-	Negativo
QC-48	>30	-	Negativo				

*(Positivo)= Probable positivo

El valor de Ct consiste en el promedio de 4 valores

En la figura 14 se presentan las curvas de amplificación para *S. aureus* y las muestras de QC-1 a QC-20. Donde las amplificaciones entre 28 y 30 Ct se deben a las muestras QC-5, QC-10 y QC-15.

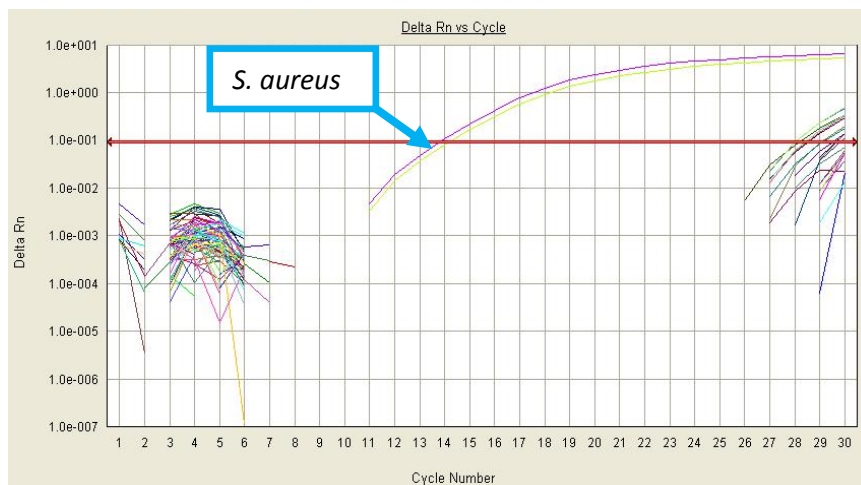


Figura 14. Resultados de en PCR tiempo real QC-1 a QC-20 y *S. aureus*.

* Se presentan los resultados de dos determinaciones para *S. aureus* y cuatro para las muestras.

La figura 15 muestra las curvas de amplificación para *S. aureus* y las muestras de QC-21 a QC-40. Donde la amplificación observada en ~29 Ct se debe a una réplica de la muestra QC-31.

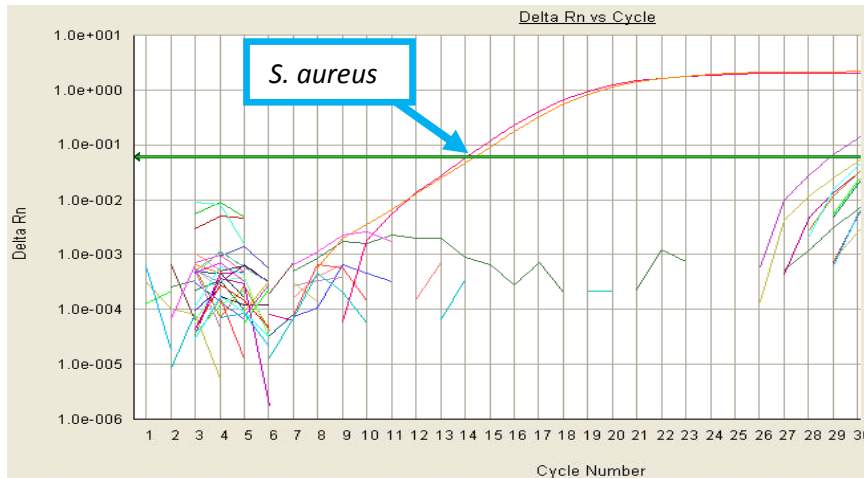


Figura 15. Resultados de PCR en tiempo real QC-21 a QC-40 y *S. aureus*.

* Se presentan los resultados de dos determinaciones para *S. aureus* y cuatro para las muestras.

En la figura 16 se observan las curvas de amplificación para *S. aureus* y las muestras de QC-41 a QC-60. Donde se observa la amplificación debida a la muestra QC-56 y la correspondiente a la muestra QC-59.

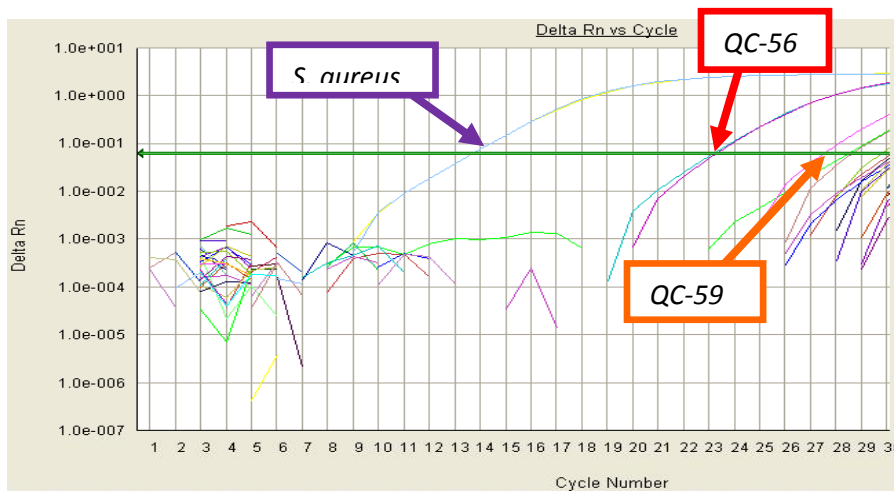


Figura 16. Resultados de PCR tiempo real QC-41 a QC-60 y *S. aureus*.

* Se presentan los resultados de dos determinaciones para *S. aureus* y cuatro para las muestras.



La figura 17 representa las curvas de amplificación para *S. aureus* y las muestras de QC-61 a QC-80. Donde se observa la amplificación perteneciente a la muestra QC-72.

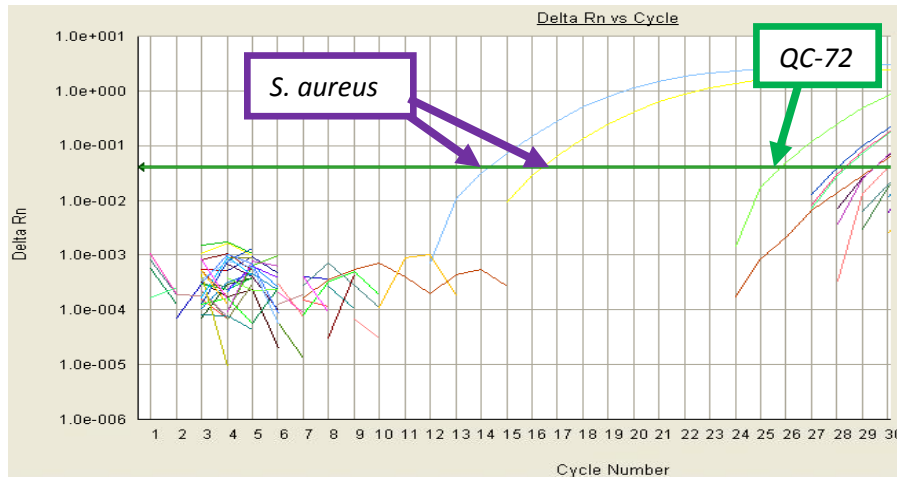


Figura 17. Resultados de PCR tiempo real QC-61 a QC-80 y *S. aureus*.

* Se presentan los resultados de dos determinaciones para *S. aureus* y cuatro para las muestras.

En la figura 18 se presentan las curvas de amplificación para *S. aureus* y las muestras de QC-81 a QC-95. La amplificación que se observa ligeramente por debajo de 29 Ct se debe a las muestras Qc-82, QC-85 y QC-93.

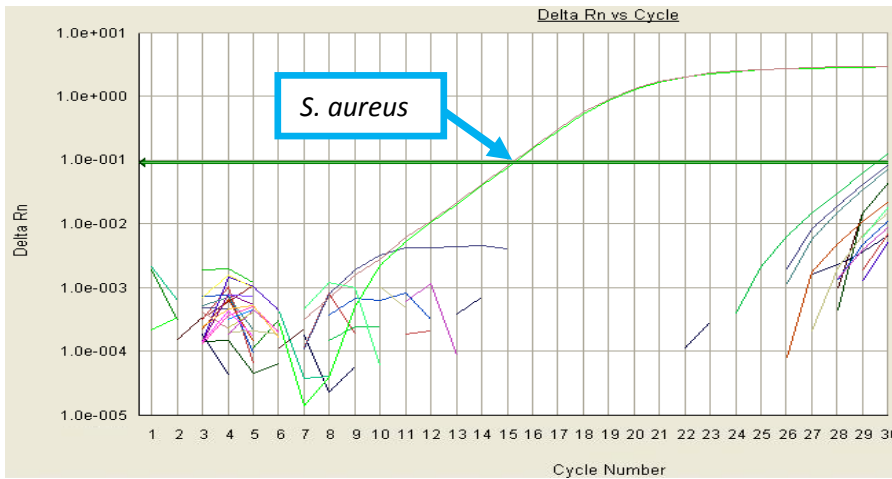


Figura 18. Resultados de PCR tiempo real de QC-81 a QC-95 y *S. aureus*.

* Se presentan los resultados de dos determinaciones para *S. aureus* y cuatro para las muestras.

En conclusión, de las 95 muestras de queso Cotija analizadas ninguna tiene *Staphylococcus aureus* viable, de acuerdo al análisis por PCR en tiempo real.



9.7. Resultados de conteo en Agar Baird Parker.

Se ordenaron las muestras de acuerdo a los valores de Ct obtenidos, de menor a mayor, como se observa en la tabla 15, y se seleccionaron las 6 muestras cuyos valores de Ct obtenidos fueron los más bajos para realizar el conteo en placa. Si se obtuviera que las muestras con Ct bajo no presentan *S. aureus* de acuerdo al conteo en placa, se puede decir que las muestras cuyos valores de Ct son mayores tampoco tienen *S. aureus*, debido a que se indicaría que la amplificación observada entre 26 y 30 Ct se trata de una amplificación inespecífica o bien debida a *S. aureus* no viables.

Tabla 15. Muestras de queso Cotija para las cuales se obtuvo un valor bajo de Ct, ordenadas de menor a mayor.

MUESTRA	Ct	DS
QC-56	25.25	2.39
QC-59	26.61	0.2
QC-72	27.46	1.98
QC-15	28.15	0.21
QC-85	28.62	1.13
QC-10	28.92	0.77
QC-76	28.94	0.8
QC-77	29.17	0.71
QC-93	29.2	0.8
QC-53	29.31	2.39
QC-61	29.34	1.83
QC-82	29.43	0.48
QC-70	29.45	0.1



Se realizó el conteo en placa para las primeras 6 muestras mencionadas en la tabla 15 utilizando las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} exceptuando la muestra QC-59 de la cual se realizaron además las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} debido a la presencia de crecimiento de microorganismos en gran cantidad en las primeras dos diluciones.

En ninguna de las muestras analizadas se obtuvo crecimiento de colonias características de *S. aureus*, colonias brillantes, color negro azabache, rodeadas de una zona de aclaramiento, resultante de la hidrólisis de la lipovitelina. Pero si se obtuvo crecimiento de microorganismos para algunas muestras, de manera general se encontraron dos tipos de colonias, colonias negras grandes opacas con un halo oscuro y colonias pequeñas negras sin ningún halo.

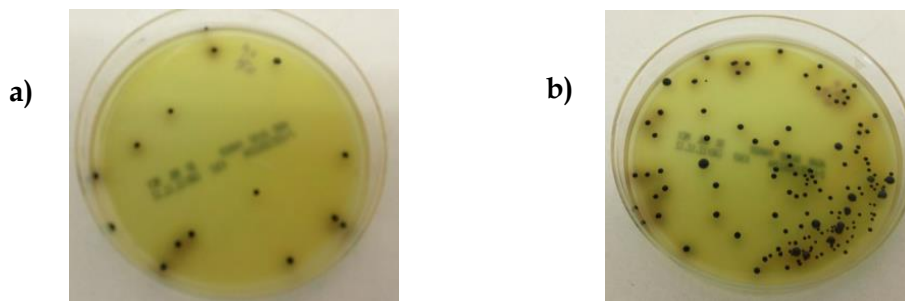


Figura 19. Ejemplos de las colonias presentes en las placas de Agar Baird Parker, a) Presencia de colonias negro opaco con un halo oscuro procedentes de la dilución 10^{-2} de la muestra QC-85, b) Presencia de colonias color negro opaco con un halo oscuro y colonias de menor tamaño sin presencia de halo, procedentes de la dilución 10^{-1} de la muestra QC-15.

De las colonias que crecieron en las placas de Agar Baird Parker cuya características no son las de *S. aureus* fueron observadas al microscopio y aisladas para realizar algunas pruebas bioquímicas que permitieran confirmar que no son colonias de *S. aureus*, al microscopio se observaron cocos Gram positivos que se agrupan en cadenas y



diplococos, son manitol +, catalasa -, DNasa - y Coagulasa -. Por lo tanto no corresponden a *S. aureus* ya que este microorganismo es manitol +, catalasa +, DNasa + y Coagulasa +.

En conclusión ninguna de las muestras analizadas presentó colonias sospechosas de *S. aureus*, y debido al límite de detección del método podemos expresar los resultados como < 100 UFC/g, como se muestra en la tabla 16, cumpliendo con la normatividad vigente.

Tabla 16. Resultados de Conteo en placa para *S. aureus*.

Muestra	Ct	UFC/g
QC-56	25.25	<100
QC-72	27.46	<100
QC-15	28.15	<100
QC-59	28.61	<100
QC-85	28.62	<100
QC-10	28.92	<100

La intoxicación alimentaria causada por *S. aureus* es debida a la ingesta de la enterotoxina presente en el alimento, para que alcanzar la cantidad suficiente de enterotoxina para enfermar se requiere que el microorganismo se encuentre presente en el orden de 10^5 UFC/g, y de acuerdo a los experimentos realizados al inocular dicho microorganismo en un orden de 10^2 UFC sin incubar se obtuvo un valor de Ct=27.26 (sección 9.2.) por lo tanto haber obtenido amplificaciones tardías del gen específico para *S. aureus* por PCR en tiempo real puede indicar que hubo presencia del microorganismo y pudo haberse generado la enterotoxina pero no en niveles que comprometan la inocuidad del alimento.



10. CONCLUSIONES.

- 👤 El juego de cebadores y sonda diseñados para detectar *S. aureus*, a partir de la secuencia del gen específico para este microorganismo es suficientemente selectivo para distinguir de otras especies de *S. aureus* y de otros géneros bacterianos que están presentes en el queso Cotija.
- 👤 Las placas Petrifilm Staph Express® no permiten cuantificar *S. aureus* en muestras de queso Cotija, ya que este alimento posee otros microorganismos que impiden la interpretación adecuada de estas placas.
- 👤 Las placas de Agar Baird Parker permiten cuantificar las colonias de *S. aureus* a pesar de la presencia de otras especies de *Staphylococcus*.
- 👤 En el 100% de las muestras de queso Cotija región de origen hay <100 UFC/g de *S. aureus* por lo que cumplen con la NMX-F-735-COFOCALEC-2011.



11. PERSPECTIVAS.

- Debido a que solamente se está detectando *S. aureus* viable (“vivo”) cuando ya han pasado al menos 3 meses de maduración, no se puede descartar que en el queso se hubiera presentado la cantidad suficiente de *S. aureus* para producir algunas de sus enterotoxinas. Por ello sería de utilidad detectar las enterotoxinas mediante técnicas moleculares partiendo de muestras de queso Cotija cuyos Ct sean menores a 30.



ANEXO A. Límites microbiológicos estipulados en la normatividad.

1) Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994, bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias.

Microorganismos	Frescos	Madurados	Procesados
	Límite máximo.		
Coliformes fecales (NMP/g)	100	50	
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	1000	100	Menos de 100
Hongos y levaduras (UFC/g)	500	500	100
<i>Salmonella</i> en 25 g	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
<i>Listeria monocytogenes</i> en 25 g	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

Límites microbiológicos estipulados en la NOM-121-SSA1-1994.

Nota: Cuando la Secretaría de Salud, de acuerdo al muestreo y a los resultados del análisis microbiológico detecte la presencia de *Listeria monocytogenes*, se ordenara la realización de un plan de trabajo por parte del fabricante o importador para controlar la presencia de dicho microorganismo.



2) 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.

Microorganismo	Límite máximo	Productos
Organismos Coliformes totales	≤100 UFC/g o mL	Helados y sorbetes. Quesos de suero.
	≤50 UFC/g o mL	Bases o mezclas para helados.
	≤20 UFC/g o mL	En punto de venta: Leche, formula láctea, producto lácteo combinado; pasteurizado.
	≤10 UFC/g o mL	En planta: Leche, formula láctea y producto lácteo combinado; pasteurizados o deshidratados. Mantequilla, cremas, leche condensada azucarada, leche fermentada o acidificada, dulces a base de leche.
<i>Staphylococcus aureus</i>	≤10 UFC/g o mL por siembra directa	Leche, fórmula láctea y producto lácteo pasteurizado.
	≤100 UFC/g o mL	Mantequilla, cremas, leche condensada azucarada, leche fermentada o acidificada, dulces a base de leche. Quesos madurados y quesos procesados.
	1000 UFC/g	Quesos frescos y quesos de suero.
<i>Salmonella spp</i>	Ausente en 25g o mL	Leche, formula láctea y producto lácteo combinado; pasteurizados



		o deshidratados. Quesos frescos, madurados y procesados. Quesos de suero. Cremas, leche fermentada o acidificada, dulces a base de leche*, helados, sorbetes y bases para helado. Mantequillas.
<i>Escherichia coli</i>	100 UFC/g o mL	Quesos frescos.
	≤3 NMP/g o mL	Leche utilizada como materia prima para la elaboración de quesos. Leche, formula láctea, producto lácteo combinado; deshidratados.
	≤10 NMP/g	Quesos madurados y procesados.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausente en 25g o mL	Leche, formula láctea, producto lácteo combinado; pasteurizados.** Quesos. Quesos de suero. Helados, bases para helados y sorbetes.**
<i>Vibrio cholerae</i> ***	Ausente en 25g	Quesos frescos. Helados, sorbetes y bases para helados.
	Ausente en 50g	Quesos de suero.
Toxina estafilocócica	Negativa	Leche, formula láctea, producto lácteo combinado; deshidratados y la que se emplea como materia prima para elaboración de quesos. Quesos frescos, madurados y



		procesados
Toxina botulínica**	Negativa	Quesos frescos, madurados y procesados, envasados al alto vacío.
Mohos y levaduras	500 UFC/g o mL	Quesos frescos, madurados*** y quesos de suero.
	100 UFC/g o mL	Quesos procesados.
	50 UFC/g o mL	Bases o mezclas para helados.
Mesofilicos aerobios	200,000 UFC/g o mL	Helados y sorbetes
	100,000 UFC/g o mL	Bases para helado.

Límites máximos de contenido microbiano para leche y derivados lácteos estipulados en la NOM-243-SSA1-2010.

*Para aquellos que contiene chocolate, cocoa, coco, huevo y semillas.

** Se determinará únicamente en situaciones de emergencia sanitaria, cuando SSA, de acuerdo a los resultados microbiológicos detecte su presencia, y ordenará la realización de un plan de trabajo por parte del fabricante o importador para controlar la presencia.

***Aquellos productos que para su maduración requieren de hongos, pudieran estar fuera de este límite.



3) Norma Mexicana NMX-F-735-COFOCALEC-2011. Sistema Producto Leche – Alimentos – Lácteos – Alimento lácteo regional -Queso Cotija artesanal madurado- Denominación, especificaciones y métodos de prueba.

Parámetro	Especificación	Método de prueba
<i>Escherichia coli</i> NMP/g	<10	NOM-243-SSA1-2010
<i>Staphylococcus aureus</i> UFC/g	<100	NOM-243-SSA1-2010
<i>Salmonella spp</i> en 25 g	Ausente	NOM-243-SSA1-2010
<i>Listeria monocytogenes</i> en 25 g	Ausente	NOM-243-SSA1-2010
Enterotoxina estafilocócica	Negativa	NOM-243-SSA1-2010
Arsénico mg/kg	0.2 máx.	NOM-243-SSA1-2010
Plomo mg/kg	0.5 máx.	NOM-243-SSA1-2010

Límites microbiológicos para el queso Cotija estipulados en la NMX-F-735-COFOCALEC-2011.



ANEXO B. Metodología para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos tomada de la NOM-115-SSA1-1994.

El procedimiento consiste en tomar y preparar la muestra de acuerdo a la NOM-110-SSA1-1994. Posteriormente utilizando diferentes pipetas de 1 mL para cada dilución, depositar 0,1 mL sobre la superficie de las placas de agar Baird-Parker. Distribuir el inóculo sobre la superficie del agar con varillas estériles de vidrio en ángulo recto, utilizando una para cada dilución. Mantener las placas en su posición hasta que el inóculo sea absorbido por el agar. Invertir las placas e incubar de 45 a 48 h a 35°C. Seleccionar las placas que tengan entre 15 y 150 colonias típicas de *Staphylococcus aureus*; si no es posible, seleccionar las placas de las diluciones más altas no obstante tengan más de 150 colonias.

Cuando las placas tengan menos de 15 colonias típicas también pueden ser utilizadas y al informe se debe agregar la nota de "valor estimado". Las colonias típicas son negras, circulares, brillantes, convexas, lisas, de diámetro de 1 a 2 mm y muestran una zona opaca y un halo claro alrededor de la colonia.



Seleccionar las colonias de acuerdo con la siguiente tabla para realizar las pruebas de coagulasa y termonucleasa.

Número de colonias a elegir para las pruebas de termonucleasa y coagulasa de acuerdo a la NOM-115-SSA1-1994.

Colonias sospechosas.	Numero de colonias por probar.
Menos de 50	3
De 51 a 100	5
De 101 a 150 o más	7

Seleccionar el número de colonias y sembrar cada una en tubos con 0,5 mL de caldo de infusión cerebro-corazón. Incubar a 35°C durante 24 h. Inocular en la misma forma cepas conocidas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* como testigos positivo y negativo.

Después del periodo de incubación pasar con una pipeta de 1 mL, 0,3 mL de cada cultivo a otro tubo de 10 mm x 75 mm y conservarlo para la prueba de termonucleasa. El resto del cultivo se usa para la prueba de coagulasa.

- Prueba de coagulasa.

Agregar a los 0,2 mL del cultivo anterior, 0,2 mL de plasma de conejo diluido volumen a volumen con solución salina estéril. Incubar en baño de agua de 35 a 37°C y observar durante 6 h a intervalos de 1 h; si no hay formación de coágulo, observar a las 24 h. Considerar positiva la prueba si hay formación de coágulo.



Para comprobar la coagulabilidad del plasma de conejo se añade una gota de cloruro de calcio al 5% a 0,5 mL de plasma reconstituido empleado, formándose un coágulo en 10-15 s.

- Prueba de termonucleasa.

Calentar durante 15 min, 0,3 mL de cultivo en caldo de infusión cerebro-corazón en baño de agua hirviendo. Pasar una gota de cada cultivo por medio de una pipeta Pasteur a un orificio del medio, incluye testigo. Incubar a 35°C en cámara húmeda de 4 a 24 h. La aparición de un halo color rosa extendido de por lo menos 1 mm alrededor de la perforación se califica como positiva.

**ANEXO C. Concentraciones y Relación Abs 260nm/ Abs 280nm**

CLAVE	Ci	Abs 260/280
QC-1A	27.57	2.12
QC-1B	30.20	2.32
QC-2A	22.67	2.14
QC-2B	23.03	2.37
QC-3A	36.80	2.54
QC-3B	24.88	2.49
QC-4A	11.44	2.10
QC-4B	16.40	1.46
QC-5A	23.31	2.25
QC-5B	29.45	2.30
QC-6A	17.40	1.81
QC-6B	42.69	2.20
QC-7A	75.81	2.00
QC-7B	74.49	1.99
QC-8A	21.79	2.21
QC-8B	18.66	2.37
QC-9A	44.91	2.83
QC-9B	29.08	2.10
QC-10A	31.96	3.55
QC-10B	53.46	2.08
QC-11A	13.18	1.76
QC-11B	30.44	2.04
QC-12A	25.56	2.07
QC-12B	27.21	2.09
QC-13A	40.76	1.84
QC-13B	10.25	1.94
QC-14A	13.70	1.71
QC-14B	31.76	2.07
QC-15A	2.93	1.71
QC-15B	5.30	2.06
QC-16A	38.68	2.16
QC-16B	14.17	2.13

**Concentraciones y Relación Abs 260nm/ Abs 280nm.**

CLAVE	Ci	Abs 260/280
QC-17A	16.28	2.20
QC-17B	22.27	1.95
QC-18A	19.95	1.97
QC-18B	10.36	1.50
QC-19A	36.22	1.85
QC-19B	38.04	1.83
QC-20A	55.20	2.12
QC-20B	62.96	2.04
QC-21A	43.97	2.04
QC-21B	24.67	2.17
QC-22A	52.36	2.03
QC-22B	27.81	2.05
QC-23A	9.55	2.43
QC-23B	102.63	2.09
QC-24A	38.25	1.96
QC-24B	21.36	1.89
QC-25A	13.98	2.06
QC-25B	20.51	2.05
QC-26A	25.04	2.15
QC-26B	22.48	2.01
QC-27A	32.90	2.08
QC-27B	9.13	2.20
QC-28A	16.24	2.12
QC-28B	12.12	2.15
QC-29A	29.50	2.04
QC-29B	31.07	2.02
QC-30A	25.46	1.96
QC-30B	43.23	1.93
QC-31A	106.23	2.01
QC-31B	25.39	1.99
QC-32A	26.81	2.06
QC-32B	10.39	2.09

**Concentraciones y Relación Abs 260nm/ Abs 280nm.**

CLAVE	Ci	Abs 260/280
QC-33A	16.27	2.05
QC-33B	24.15	2.04
QC-34A	30.86	1.99
QC-34B	55.61	2.01
QC-35A	147.51	1.99
QC-35B	132.77	1.97
QC-36A	53.05	2.37
QC-36B	121.09	2.00
QC-37A	100.13	2.02
QC-37B	55.46	2.05
QC-38A	16.69	2.19
QC-38B	15.01	2.25
QC-39A	16.30	2.26
QC-39B	19.62	2.14
QC-40A	20.00	2.11
QC-40B	17.92	2.09
QC-41A	59.88	2.07
QC-41B	76.75	2.07
QC-42A	161.71	2.04
QC-42B	37.93	2.10
QC-43A	93.43	2.03
QC-43B	17.55	2.13
QC-44A	322.81	2.02
QC-44B	322.81	2.11
QC-45A	123.96	2.06
QC-45B	147.59	2.05
QC-46A	86.67	2.09
QC-46B	99.03	2.04
QC-47A	108.25	2.02
QC-47B	180.37	2.02
QC-48A	187.87	2.04
QC-48B	165.65	2.02

**Concentraciones y Relación Abs 260nm/ Abs 280nm.**

CLAVE	Ci	Abs 260/280
QC-49A	212.12	2.01
QC-49B	320.87	2.03
QC-50A	13.86	2.37
QC-50B	25.25	2.27
QC-51A	112.76	1.96
QC-51B	110.45	2.01
QC-52A	28.13	2.12
QC-52B	31.17	1.99
QC-53A	21.58	2.20
QC-53B	25.88	1.93
QC-54A	119.49	1.98
QC-54B	73.12	2.03
QC-55A	77.49	2.18
QC-55B	94.75	1.94
QC-56A	58.06	2.25
QC-56B	29.39	2.13
QC-57A	63.18	2.00
QC-57B	13.65	2.30
QC-58A	72.39	2.03
QC-58B	20.46	2.04
QC-59A	30.18	2.05
QC-59B	27.46	2.07
QC-60A	54.47	2.08
QC-60B	68.29	1.95
QC-61A	58.15	2.06
QC-61B	23.10	2.51
QC-62A	62.82	2.08
QC-62B	54.14	2.08
QC-63A	75.16	1.71
QC-63B	58.87	1.82
QC-64A	21.53	2.21
QC-64B	76.89	2.20

**Concentraciones y Relación Abs 260nm/ Abs 280nm**

CLAVE	Ci	Abs 260/280
QC-65A	38.48	2.10
QC-65B	108.82	2.09
QC-66A	13.87	2.40
QC-66B	46.98	2.20
QC-67A	148.11	2.08
QC-67B	137.43	2.11
QC-68A	144.19	2.03
QC-68B	97.66	2.08
QC-69A	131.70	2.09
QC-69B	39.79	2.20
QC-70A	51.47	2.21
QC-70B	68.40	2.08
QC-71A	63.87	2.09
QC-71B	69.11	2.05
QC-72A	39.48	2.23
QC-72B	54.46	2.03
QC-73A	87.67	2.01
QC-73B	83.62	2.11
QC-74A	153.94	2.04
QC-74B	180.20	2.00
QC-75A	127.04	2.01
QC-75B	103.91	2.08
QC-76A	18.99	2.12
QC-76B	33.65	2.07
QC-77A	169.87	2.01
QC-77B	215.55	2.05
QC-78A	194.69	2.06
QC-78B	57.80	2.03
QC-79A	128.01	2.00
QC-79B	150.74	2.04
QC-80A	37.06	2.06
QC-80B	28.82	2.28

**Concentraciones y Relación Abs 260nm/ Abs 280nm**

CLAVE	Ci	Abs 260/280
QC-81A	5.37	1.57
QC-81B	15.07	2.64
QC-82A	35.85	2.14
QC-82B	22.46	2.32
QC-83A	33.70	2.18
QC-83B	23.79	2.28
QC-84A	58.09	2.02
QC-84B	81.37	2.04
QC-85A	15.25	2.00
QC-85B	19.25	2.07
QC-86A	34.22	2.07
QC-86B	42.96	2.02
QC-87A	11.44	2.56
QC-87B	9.66	2.92
QC-88A	22.13	2.33
QC-88B	25.13	2.15
QC-89A	14.28	2.54
QC-89B	10.27	2.70
QC-90A	61.60	2.08
QC-90B	30.71	2.23
QC-91A	52.20	2.10
QC-91B	58.82	2.06
QC-92A	38.80	2.47
QC-92B	34.78	2.10
QC-93A	62.25	2.20
QC-93B	41.21	2.18
QC-94A	9.54	2.36
QC-94B	27.76	2.45
QC-95A	19.55	1.74
QC-95B	36.83	2.13

**ANEXO D. Composición de los medios y soluciones utilizados.*****Agar Baird Parker******(BD DIFCO)***

Peptona de caseína	10.0 g
Extracto de carne	5.0 g
Cloruro de Litio	5.0 g
Agar	20.0 g
Glicina	12.0 g
Piruvato de Sodio	10.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
Telurito de potasio 1%	10 mL
Yema de huevo	50mL
pH Final	7.0±0.2

* Formula aproximada para un Litro.

Caldo Nutritivo***(BIOXON)***

Peptona de gelatina	5.0 g
Extracto de carne	3.0 g
pH Final	6.9±0.2

* Formula aproximada para un Litro.

**Agua peptonada.****(BD DIFCO)**

Bacto-peptona	1.0 g
NaCl	8.5 g

* Formula aproximada para un Litro.

Agar BHI**(BD DIFCO)**

Peptona de caseína	10.0 g
Extracto de carne	5.0 g
Cloruro de Litio	5.0 g
Agar	15.0 g
Glicina	12.0 g
Piruvato de Sodio	10.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
Telurito de potasio 1%	10 mL
Yema de huevo	50mL

pH Final 7.0 ± 0.2

* Formula aproximada para un Litro.

Solución Salina 0.85 % pH=7.0

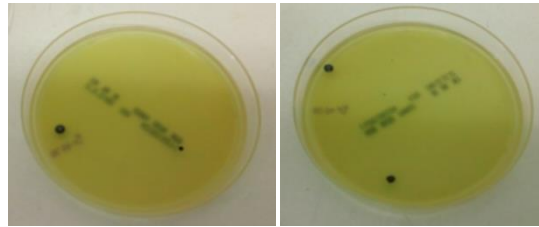
Cloruro de sodio	8.5 g
------------------	-------

pH Final 7.0 ± 0.2

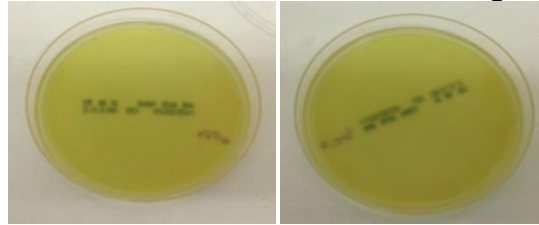
* Formula aproximada para un Litro.



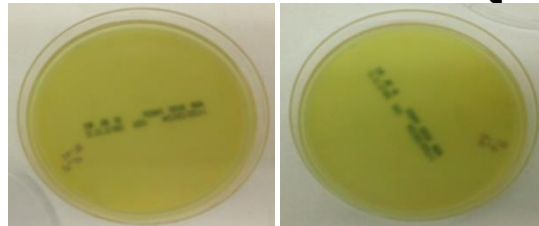
ANEXO E. Imágenes del conteo en placa (Agar Baird Parker).



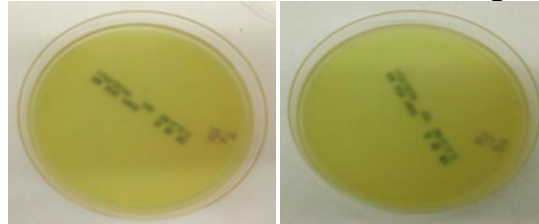
Dilución 10^{-1} de la muestra QC-56.



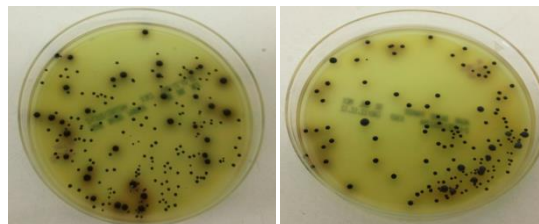
Dilución 10^{-2} de la muestra QC-56.



Dilución 10^{-1} de la muestra QC-72.



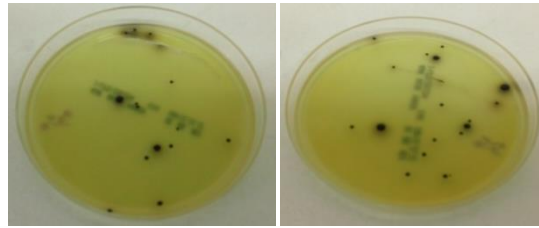
Dilución 10^{-2} de la muestra QC-72.



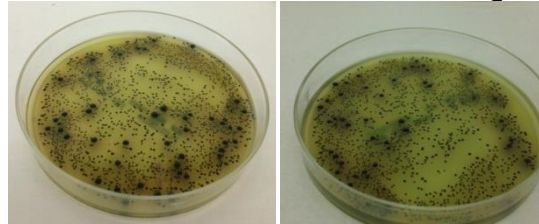
Dilución 10^{-1} de la muestra QC-15.



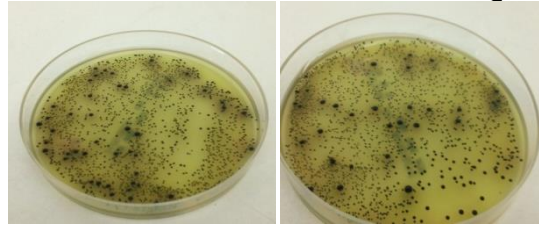
Imágenes del conteo en placas (Agar Baird Parker).



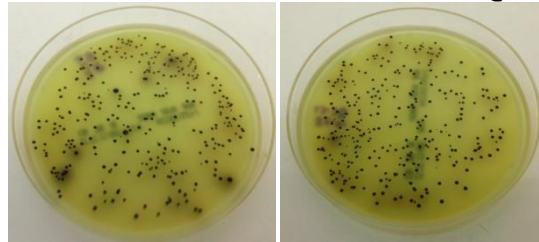
Dilución 10^{-2} de la muestra QC-15.



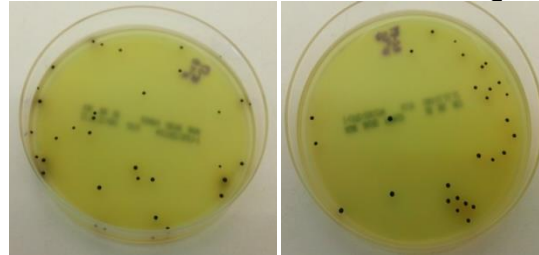
Dilución 10^{-1} de la muestra QC-59.



Dilución 10^{-2} de la muestra QC-59.



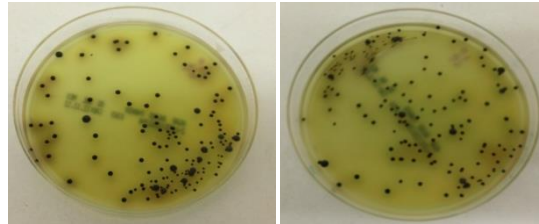
Dilución 10^{-3} de la muestra QC-59.



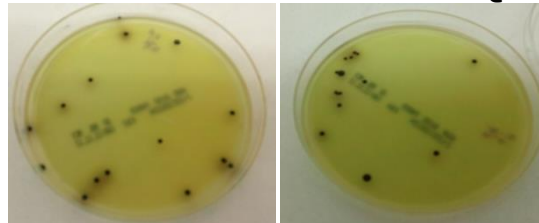
Dilución 10^{-4} de la muestra QC-59.



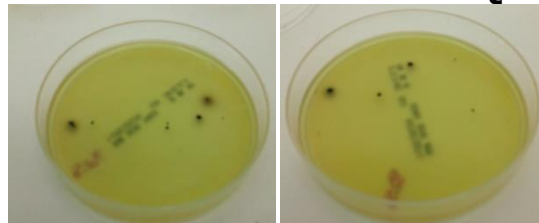
Imágenes del conteo en placas (Agar Baird Parker).



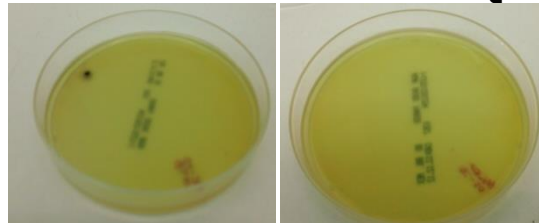
Dilución 10^{-1} de la muestra QC-85.



Dilución 10^{-2} de la muestra QC-85.



Dilución 10^{-1} de la muestra QC-10.



Dilución 10^{-2} de la muestra QC-10.



BIBLIOGRAFIA.

- 1) 3M PLACAS PETRIFILM™ para el Recuento Rápido de *Staphylococcus aureus*. (2003), Disponible en:
"http://multimedia.3m.com/mws/mediawebserver?KKKKKKtrCWZKd nLK8nLKKkMiOvGjjji-"
- 2) Adams, M. y Moss M. (1997). Microbiología de los Alimentos, 1ª edición, Zaragoza España: Acribia.
- 3) Análisis de expresión génica mediante PCR a tiempo real o q-PCR. UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO - EUSKAL HERRIKO UNIBERTSITATEA. Disponible en:
"http://www.ehu.es/SGIker/es/expresion_genica/documentos/analisis_de_expresion.pdf" Ultimo acceso: 10.01.2013
- 4) Bernard, D. (1984). Tratado de microbiología. 3a edic. Barcelona: Salvat Editores.
- 5) Biosystems A. (2012) TaqMan and SBR green chemistries. Disponible en:
"http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/application-s-technologies/real-time-pcr/taqman-and-sybr-green-chemistries.html" Ultimo acceso: 13.09.2012
- 6) Biosystems A. (2010) Gene Expression Assay Performance Guaranteed With the TaqMan® Assays QPCR Guarantee Program. Disponible en:
"http://tools.invitrogen.com/content/sfs/brochures/cms_088754.pdf" Ultimo acceso: 10.01.2013
- 7) Bravo-Mendoza, A. (2008). Estudio de las poblaciones microbianas de interés biotecnológico aisladas de queso Cotija. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México.



- 8) Brock, T. (1991). Biology of microorganisms. 6a edic, New Jersey: Prentice Hall.
- 9) Clark, D., (2010). Molecular Biology, Update edic, Amsterdam: Academic cell.
- 10) Cortés-Díaz, L. (2009). Aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa en la búsqueda de bacterias ácido lácticas en un queso artesanal mexicano. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México.
- 11) Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 22(5):299-305.
- 12) Estrada-Hernández, C. (2009). Análisis microbiológico de queso Cotija identificación de microorganismos patógenos mediante la técnica de PCR punto final. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México.
- 13) Ercolini, D. (2004). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. Journal of microbial Methods, 56, 297-334.
- 14) Fusco, V., Quero, G.M., Morea, M., Blaiotta, G., Visconti, A. (2011). Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* harbouring the enterotoxin gene cluster (egc) and quantitative detection in raw milk by real time PCR. International Journal of Food Microbiology, 144, 528–537.
- 15) García-Saturnino, V. (2006). Aislamiento de microorganismos con mayor actividad lipolítica del queso Cotija. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México.



- 16) Gómez-Castelo, B. (2010). Identificación de bacterias halófilas presentes en queso Cotija por métodos independientes de cultivo. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México.
- 17) Guía de interpretación (2009). Placas 3M Petrifilm Staph Express.
- 18) Hernández-Briones, V. (2007). "Queso Cotija: Estudio del análisis fisicoquímico, proximal y actividad antioxidante". Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México.
- 19) Hernández-Mejía, N. (2007). Identificación de bacterias proteolíticas aisladas del queso Cotija, un estudio microbiológico y fisicoquímico. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México.
- 20) Jay, J. (2007). Modern Food Microbiology. 7a edic, USA: Springer.
- 21) Microbial. Guía de interpretación de resultados. Sistemas de detección de patógenos mediante PCR tiempo real.
Disponible en:
"http://microbial-systems.com/web/docs/Guia_interpretacion_resultados_SPAv2.pdf" Ultimo acceso: 10.01.2013
- 22) Mason, W.J., Blevins, J. S., Beenken, K., Wibowo, N., Ojha, N., Smeltzer, M. S. (2001). Multiplex PCR Protocol for the Diagnosis of Staphylococcal Infection. Journal of Clinical Microbiology, 39(9), 3332-3338.
- 23) Mehrotra, M., Wang, G., Johnson, W. M. (1999). Multiplex PCR for Detection of Genes for Staphylococcus. Journal of Clinical Microbiology, 38(3), 1032-1035.



- 24) Moseel, D. y Moreno García (2002). Microbiología de los alimentos: Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos, 2da edición, Zaragoza España: Acribia.
- 25) Norma Mexicana NMX-F-735-COFOCALEC-2011. Sistema Producto Leche – Alimentos – Lácteos – Alimento lácteo regional - Queso Cotija artesanal madurado - Denominación, especificaciones y métodos de prueba.
- 26) Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994, bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias.
- 27) 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.
- 28) Norma Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos.
- 29) Panchapakesan, A., Abdullah, T. (2010) .PCR based Detection of Food Borne Pathogens. World Academy of Science, Engineering and Technology, 68, 689-691.
- 30) Ruiz, M., Torres, M.J., Arroyo, L.A., Prados, T., Palomares, J.C., Aznar, J. (2005). Detección de la resistencia a la metacilina e identificación de *Staphylococcus aureus* spp. En hemocultivos positivos amplificando los genes *mecA* y *nucA* con el sistema LightCycler. Enfermedades infecciosas Microbiología Clínica, 23(4), 208-212.
- 31) Tagu, D. y M. Christian (2006) Fundamentos de las Técnica de Biología Molecular, Zaragoza: Acribia.



- 32) Trnčíková, T., Hrušková, V., Oravcová, K., Pangallo, D., Kaclíková, E. (2009). Rapid and Sensitive Detection of *Staphylococcus aureus* in Food Using Selective Enrichment and Real-Time PCR. *Food Analytic Methods*, 2, 241-250.
- 33) Zhang, D., Zhang, H., Yang, L., Guo, J. (2009), Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 in food samples using Multiplex PCR method. *Journal of Food Safety*, 29, 348-363.
- 34) Zúñiga-Bustos, A. (2009). Descripción e identificación de la comunidad bacteriana presente en el Cotija por métodos moleculares. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México