

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA
(PROPAC)**

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**INCIDENCIA DE *Salmonella* Y *Listeria monocytogenes* EN QUESOS FRESCOS QUE SE
EXPENDEN EN LA CIUDAD DE QUERÉTARO.**

TESIS

PRESENTA:

L. EN G. OMAR AYALA LÓPEZ

DIRIGIDO POR:

DRA. SOFIA MARIA ARVIZU MEDRANO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, NOVIEMBRE DEL 2015



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química.
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

INCIDENCIA DE *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* EN QUESOS FRESCOS QUE SE EXPENDEN EN LA CIUDAD DE QUERÉTARO.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de alimentos.

Presenta:
Omar Ayala López

Dirigido por:
Dra. Sofía María Arvizu Medrano.

Dra. Sofía María Arvizu Medrano.
PRESIDENTE



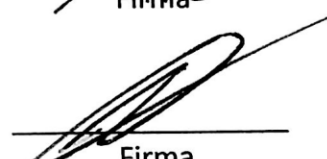
Firma

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
SECRETARIO



Firma

Dr. Gerardo M. Nava Morales
VOCAL



Firma

M en N. Francisco Rafael Pérez Muñoz
SUPLENTE



Firma

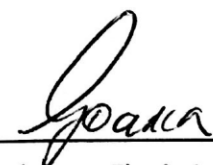
M en C. María del Carmen González López
SUPLENTE



Firma



M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad



Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

RESUMEN

Los quesos frescos son productos de alto consumo y producción en México, sus características lo distinguen como un alimento perecedero. Se han reportado brotes de enfermedad en Estados Unidos por queso fresco asociados a *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Campylobacter*. La aplicación de técnicas moleculares permitiría detectar patógenos en menor tiempo con alta sensibilidad y especificidad. El objetivo del presente estudio fue investigar *Salmonella* y *L. monocytogenes* a lo largo del proceso de producción de queso fresco en una empresa semi-tecnificada del estado de Querétaro y queso comercializado en mercados de la ciudad de Querétaro. En la empresa se colectaron 300 muestras (producto, manos de operarios, equipos, pisos, herramientas y utensilios). Se cuantificó bacterias mesofilas aerobias (BMA), coliformes totales (CT), *E. coli* y se investigó *Salmonella* y *L. monocytogenes* por métodos tradicionales y PCR. Se analizaron 100 muestras de queso fresco obtenidos de mercados, se investigó *E. coli*, *Salmonella* y *L. monocytogenes* por método tradicional y adicionalmente *Salmonella* utilizando ANSR y qPCR. El contenido de BMA y CT en muestras ambientales del proceso industrial fue muy amplio, lo que señala variabilidad en los procedimientos y/o materia prima empleada. Se encontró *E. coli* en producto (9/107), herramientas y utensilios (4/89), manos de operarios (1/30) y agua de enfriamiento (3/3) en concentraciones de 1-3 log de NMP/g o cm². *Salmonella* fue detectada en quesos (2/49), manos de operarios (1/30) y utensilios (1/89). En el queso obtenido de mercados se encontró *E. coli* (64/100) en concentraciones de <3 a 2 log de NMP/g y *Salmonella* (9/100). No se detectó *L. monocytogenes* en ningún queso. La técnica ANSR resultó poco específica y sensible para la detección de *Salmonella* en queso fresco; sin embargo el uso de qPCR puede ser una alternativa rápida y confiable (especificidad relativa: 100% y sensibilidad relativa: 88%). La presencia de *Salmonella* en queso generado por la empresa y con mayor frecuencia en queso expendido en mercados, representan un riesgo para el consumidor. Ineficientes procesos de sanitización, baja calidad de materia prima, deficiente capacitación de trabajadores, entre otros factores pueden influir en la inocuidad del producto final.

Palabras clave: *Salmonella*, queso frescos, ANSR, qPCR

SUMMARY

Fresh cheese are produced and consumed in México in large amounts. Their characteristics distinguishes it as a perishable product. *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Campylobacter* outbreaks linked to cheese have been reported in the United States. Molecular detection of pathogens could be done in short time with high levels of sensitivity and specificity. The aim of this study was to investigate the incidence of *Salmonella* and *L. monocytogenes* throughout of cheese production in a plant of Queretaro state and in fresh cheeses sold in Querétaro city markets. Three hundred samples were collected in the processing plant including hands of workers, equipment, floors, utensils and food along the process. Total plate count (TPC), total coliforms (TC) and *E. coli* were quantified. *Salmonella* and *L. monocytogenes* were investigated by traditional and PCR methods. One hundred samples of fresh cheese from Queretaro markets were collected, *E. coli* was quantified and *Salmonella* and *L. monocytogenes* was investigated by traditional method. Additionally, *Salmonella* was investigated using Amplified Nucleic Single Temperature Reaction technique (ANSR) and qPCR. Along cheese processing, TPC and TC content in food and inert surfaces showed high variability, suggesting diversity in the sanitarian practice or in the quality of materials used in its manufacture. *E. coli* was detected in cheese, utensils, workers' hands and cooling water in concentrations 1-3 log MPN/g or cm². *Salmonella* was detected in cheese, workers' hands and utensils. Fresh cheese obtained from markets contained *E. coli* (1-3 log MPN/g or cm²) and *Salmonella* (9/100). *L. monocytogenes* was not detected. ANSR technique was not specific nor sensitive enough for *Salmonella* detection in fresh cheese. In contrast, qPCR technique could be used as a fast and reliable alternative to traditional detection (showing a relative specificity of 100% and a relative sensitivity of 88%). The presence of *Salmonella* in cheese obtained from the processing plant and from city markets represent a risk for the consumer. Poor sanitation process, low quality of materials, deficient training of workers, among other factors may influence the food safety.

Key words: *Salmonella*, fresh cheese, ANSR, qPCR.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado para la realización de los estudios de posgrado.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y al programa de posgrado en alimentos del centro de la república.

A la Dra. Sofía Arvizu Medrano, por guiarme en aquel espacio como alumno donde aprendí, conocí, conviví, reí y llore, es algo muy valioso. Sin duda me voy con la mejor impresión de ella.

A los integrantes de este comité de tesis por sus aportaciones que enriquecieron el trabajo.

Claramente a los pilares de mi vida, Carmen – mi hermosa Madre, Gildardo – mi prudente Padre, Angel – hermano calculador y Fernando – hermano creativo, todos son la luz y apoyo incondicional en el camino de mi vida. Los amo.

A mis compañeros de grado que también fueron mis maestros y compartieron su cariño, sentimientos y consejos durante esta etapa de trabajo extenso. Mayra y Francisco, los dos son una bomba pero me llevaré lo mejor de ustedes.

A mis mujeres de laboratorio: Carmen, Marta y Alesita. No es bonito recibir los regaños de cada una, tampoco si son muy seguidos, lo bueno es que a la hora del pan todo se arreglaba. Muchas gracias por el aprendizaje con ustedes.

A todos aquellos que también forman parte de mi vida: familia, conocidos y amigos, sobre todo a los que conozco hace más de 10 años y siguen a la vuelta de la esquina Gustavo, Arturo, David, Armando, Ruben y Guillermo. Gracias.

DEDICATORIAS

Quisiera dedicar este esfuerzo a **Dios**, por ponerme un camino lleno de bendiciones y guiarme día a día en mi vida. También es un agradecimiento.

A mi **familia**, que siempre estuvieron conmigo en este gran aprendizaje.

A la Dra. **Sofía**, que nunca negó compartirme su conocimiento.

A tres personas especiales que forjaron mi personalidad y entendimiento antes de entrar al programa de maestría: **Helen Zurita**, Psic. **Marta** y **Lupita Ugalde**.

Y a todas aquellas personas que piensen que un esfuerzo más es un fracaso menos.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	iv
INDICE	v
INDICE DE CUADROS	vi
INDICE DE FIGURAS	vii
I.INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Calidad sanitaria e inocuidad de los alimentos en México	3
II. 2 Queso en México	4
II. 2.1 Queso fresco	5
II. 2.2 Producción y consumo de queso fresco	6
II. 3 Riesgos microbianos por consumo de queso fresco	8
II.3.1 Enfermedades Transmitidas por quesos.	9
II.3.2. Posibles fuentes y mecanismos de contaminación.	13
II.4 Principales microorganismos patógenos asociados a quesos frescos.	16
II.4.1 <i>Listeria monocytogenes</i> .	16
II.4.2 <i>Salmonella</i>	18
II.4.3. Detección de Microorganismos por qPCR	20
II.4.4. Detección de microorganismos por tecnología ANSR de Neogen	21
III. JUSTIFICACIÓN	23
IV. OBJETIVOS	24
IV.1 Objetivo general	24
IV.2 Objetivos específicos.	24
V. Metodología	25
V.1 Materiales	25
V.1.1 Material biológico	25

V.1.2 Medios de cultivo	25
V.1.3 Equipo	26
V.2 Métodos	26
V.2.1 Recolección de muestras y puntos de muestreo dentro de la empresa.	26
V.2.2 Recolección de muestras de queso fresco en mercados públicos de la ciudad	28
V.2.3 Preparación de las muestras de queso fresco obtenidas de la empresa y de mercados públicos	28
V.2.4 Análisis microbiológico.	29
V.2.4.1 Microorganismos indicadores	29
V.2.5 Microorganismos patógenos	30
V.2.5.1 Detección y aislamiento de <i>Salmonella</i> por el método tradicional	31
V.2.5.2 Detección y aislamiento de <i>L.monocytogenes</i> por el método tradicional.	31
V.2.6 Detección de <i>Salmonella</i> y <i>L.monocytogenes</i> mediante la reacción en cadena de la polimerasa punto final (PCR) en muestras de empresa.	31
V.2.6.1 Condiciones de amplificación de PCR	32
V.2.6.2 Electroforesis	32
V.2.7 Detección de <i>Salmonella</i> mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) para muestras de mercado	33
V.2.7.1 Evaluación de sensibilidad	33
V.2.7.2 Extracción de ADN de queso fresco	33
V.2.7.3 Condiciones de amplificación de qPCR	33
V.2.8 Detección de <i>Salmonella</i> mediante la tecnología ANSR en quesos de mercado	34
V.2.8.1 Validación de la tecnología ANSR en queso panela y Oaxaca	34

V.2.8.2 Detección de <i>Salmonella</i> mediante la tecnología ANSR en quesos de mercado	34
VI. Resultados y Discusión	35
VI.1 Perfil microbiano del procesamiento de queso fresco en una empresa establecida en Querétaro	35
VI.1.1 Microbiología a lo largo del procesamiento del queso Oaxaca	36
VI.1.2 Microbiología a lo largo del procesamiento del queso Ranchero	38
VI.1.3 Microbiología a lo largo del procesamiento del queso Panela	39
VI.1.4 Microbiología a lo largo del procesamiento del queso Asadero	42
VI.1.5 Microbiología en otros puntos de muestreo importantes de la empresa	44
VI.2 Detección de <i>Salmonella</i> y <i>L. monocytogenes</i> en queso fresco producido en una empresa	47
VI.3 Perfil microbiano e incidencia de <i>Salmonella</i> en quesos comercializados en mercados.	49
VI.3.1 Validación de tecnología ANSR en queso fresco	52
VI.3.1.1 Recuento de <i>Salmonella</i> resistente a rifampicina utilizando caldo de enriquecimiento ANSR en quesos (oaxaca y panela) y detección con el equipo ANSR.	52
VI.3.1.2 Detección de <i>Salmonella</i> en quesos de mercados mediante la tecnología ANSR	53
VI.3.2 Detección de <i>Salmonella</i> mediante qPCR en quesos frescos	56
VI.3.2.1 Validación de una técnica de qPCR cualitativa en quesos frescos	56
VI.3.2.2 Detección de <i>Salmonella</i> por qPCR en muestras de quesos de mercado	59
VII. Conclusiones	63
VIII. Referencias bibliográficas	64

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Pagina
1. Clasificación de quesos frescos. Adaptada: Norma Oficial Mexicana. NOM-121-SSA1-1994	6
2. Producción de lácteos en México, 2007-2013	7
3. Incidencia de enfermos, hospitalizados y muertes según si el producto fue pasteurizado o no pasteurizado	11
4. Brotes generados por consumo de queso alrededor del mundo	12
5. Muestras analizadas durante el procesamiento del queso fresco	28
6. Grupo indicador y el medio en el cual se desarrolla	30
7. Sensibilidad (RS), especificidad (RE) y precisión relativa (RA) de la detección de <i>Salmonella</i> a partir de queso Oaxaca y panela mediante ANSR	54
8. Sensibilidad (RS), especificidad (RE) y precisión relativa (RA) de la detección de <i>Salmonella</i> a partir de queso Oaxaca y panela mediante qPCR	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pagina
1. Dinámica de desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> en queso fresco almacenado 10 °C (A) y <i>Salmonella</i> almacenado a 25 °C (B)	9
2. Producción y distribución de queso fresco y derivados lácteos en México	14
3. Diagrama general del proceso de producción del queso fresco	27
4. Contenido de BMA (A) y OCT (B) a lo largo línea de producción de queso Oaxaca. Las cajas muestran los percentiles 25, 50 y 75; y los brazos el valor mínimo y máximo. Los elementos subrayados en rojo indican muestras contaminadas con <i>E. coli</i>	37
5. Recuento de grupos indicadores BMA (A) y OCT (B) en línea de producción de queso Ranchero. Las cajas muestran los percentiles 25, 50 y 75; y los brazos el valor mínimo y máximo. Los elementos subrayados en rojo indican muestras contaminadas con <i>E. coli</i>	40
6. Recuento de grupos indicadores BMA y OCT en línea de producción de queso panela. Las cajas muestran los percentiles 25, 50 y 75; y los brazos el valor mínimo y máximo. Los elementos subrayados en rojo indican muestras contaminadas con <i>E. coli</i>	41
7. Recuento de grupos indicadores BMA y OCT en línea de producción de queso Asadero. Las cajas muestran los percentiles 25, 50 y 75; y los brazos el valor mínimo y máximo. Los elementos subrayados en rojo indican muestras contaminadas con <i>E. coli</i> .	43
8. Recuento de grupos indicadores BMA y OCT en puntos adicionales a las líneas de producción de queso	45

9.	Confirmación de cepas de <i>Salmonella</i> por PCR. En el primer pozo se muestra el marcador de peso molecular. A partir del pozo 8 se observan las bandas correspondientes al producto de amplificación esperado (341 pb)	48
10.	Recuento de BMA en Queso panela y Oaxaca expendidos en mercados de la ciudad	50
11.	Recuento de <i>Salmonella</i> en queso fresco después de utilizar caldo de enriquecimiento ANSR #2 incubándolo por 24 h a 35 °C	53
12.	Muestra número de muestras positivas utilizando la tecnología ANSR, metodología tradicional y un contraste entre ambas técnicas	54
13.	Curvas de amplificación de qPCR para muestras de queso fresco inoculadas con 10^8 , 100 y 10 células, preenriquecidas e incubadas por 24 h a 35°C	57
14.	Curvas de disociación de productos de amplificación a partir de queso inoculado y preenriquecido	57
15.	Productos obtenidos de qPCR a partir de muestras inoculadas (primeros 8 carriles) y las muestras negativas que generaron curvas inespecíficas (carriles 9-11)	58
16.	Curva de amplificación por qPCR de muestras queso fresco naturalmente contaminado por <i>Salmonella</i>	59
17.	Curvas de disociación de productos de amplificación a partir de muestras de queso fresco contaminadas naturalmente por <i>Salmonella</i>	60
18.	Curva de amplificación por qPCR de muestras de mercado negativas a <i>Salmonella</i>	60
19.	Temperatura de fusión en muestras de queso fresco negativas a <i>Salmonella</i>	61

I. INTRODUCCIÓN

A partir de la leche se elaboran diversos productos ampliamente aceptados por la población. Algunos de ellos, como los quesos, se conocen y se consumen desde hace muchos siglos.

Los quesos frescos son probablemente los más producidos en México; y como parte de la gastronomía y cultura mexicana son un producto que figura en la dieta de la población gracias a su sabor y versatilidad para incluirse en los platillos tradicionales.

Durante su proceso de producción suele darse un contacto estrecho con trabajadores y equipos posterior a los tratamientos térmicos se convierte en un vehículo potencial de microorganismos patógenos. Adicionalmente su contenido de agua, nivel de pH y disponibilidad de nutrientes puede permitir el desarrollo microbiano, con lo que se incrementa el riesgo y por ello estos productos se han asociado a brotes de enfermedad.

Dentro de los principales patógenos que pueden ser vehiculizados por quesos se encuentran *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli* patógena, *Staphylococcus aureus*, *Brucella*, *Campylobacter* y *Clostridium* (FDA, 2013).

Infortunadamente en México los estudios de brotes de enfermedad asociados a alimentos son aislados o de cobertura limitada, caso contrario para el extranjero donde se ha reportado brotes por consumo de quesos mexicanos (CDC, 2014). Por una parte existen normas que exigen la ausencia de *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *Vibrio cholerae* y las toxinas estafilocócica y botulínica en 25 g de producto (NOM-243-SSA1-2010), pero dejan a criterio de las empresas el aseguramiento de la inocuidad en sus procesos de producción. No es sorprendente saber que en México diversos tipos de quesos frescos se elaboran de manera artesanal a partir de leche cruda y sin controles de etapas relevantes en su producción que aseguren la

inocuidad del alimento. Esta práctica se encuentra mayormente extendida entre los pequeños productores.

La herramienta que emplean comúnmente los productores para evaluar la inocuidad del alimento es el análisis del producto terminado para la detección de microorganismos patógenos por métodos tradicionales. Estas técnicas requieren varios días (5-9 días) para confirmar la presencia del patógeno y liberar el lote, lo cual representa una limitante debido a la corta vida de anaquel que tienen los quesos frescos. Una alternativa, es el uso de técnicas moleculares validadas que permitan la detección certera del agente patógeno en menor tiempo. La reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (qPCR) y la tecnología de amplificación a temperaturas constante por sus siglas en inglés ANSR de Neogen son técnicas moleculares que permiten la detección de los microorganismos empleando iniciadores específicos dirigidos a un gen conservado en la especie de interés, con la ayuda de un agente que evidencie el proceso de amplificación en tiempo real, lo que permitiría tomar decisiones sobre el destino del lote de producción en una aproximación de 30 horas.

Con un nivel apropiado de sensibilidad y especificidad en las técnicas se permite ahorrar tiempo, dinero y mano de obra. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio es investigar la incidencia de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en quesos que se expenden en Querétaro utilizando técnicas moleculares.

II. ANTECEDENTES.

II.1 Calidad sanitaria e inocuidad de los alimentos en México

El concepto de calidad sanitaria de los alimentos no se limita a la ausencia de agentes nocivos; involucra otros atributos que le confieren calidad comercial y nutricional. Para que un alimento pueda ser considerado de buena calidad sanitaria debe poseer las siguientes características (Flores *et al*, 2004):

- A) Nutritivo: idealmente un alimento no debe perder la capacidad nutricional por causas asociadas a su preparación, procesamiento o almacenamiento.
- B) Ideal: la naturaleza y composición de un alimento debe corresponder a la que se indica en la etiqueta o formulación de un producto procesado.
- C) Integro: se refiere a la plenitud de las características organolépticas del producto.
- D) Sensorialmente aceptable.
- E) Vida de anaquel: el alimento deberá conservar el mayor tiempo posible la plenitud de los atributos descritos anteriormente.
- F) Inocuo.

El termino inocuidad es la garantía de que los alimentos no van a causar daño a la persona consumidora cuando se preparen y/o consuman de acuerdo con el uso al que se destinan es decir, un alimento inocuo es aquel que está libre de peligros físicos (huesos, piedras, fragmentos de metal o cualquier materia extraña), peligros químicos (medicamentos veterinarios, pesticidas, agentes de limpieza y desinfección) y peligros biológicos (microorganismos patógenos o sus toxinas) (Codex Alimentarius, 2003).

Las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) son un elemento fundamental que contribuye en la calidad sanitaria. En la actualidad en nuestro país las autoridades sanitarias, consideran importante establecer políticas de inocuidad en los alimentos, mediante la aplicación de estos sistemas que minimicen los riesgos de contaminación tal y como lo sugiere la NOM-251-SSA1-2009 en la

implementación de buenas prácticas higiénicas en el manejo de alimentos (SSA, 2009). La aplicación de esta norma permite asegurar las condiciones ambientales y de higiene durante la elaboración, almacenamiento, distribución y transporte de productos alimenticios para consumo humano; así mismo, permite controlar la limpieza e higiene general del establecimiento y del personal con el objetivo de prevenir la contaminación física, química y/o biológica del producto. Constituye la base para asegurar la inocuidad de los alimentos (Escamilla, 2007).

Se estima que tres millones de personas en los países desarrollados y en desarrollo mueren cada año a consecuencia de enfermedades transmitidas por los alimentos y el agua, y que muchos millones más enferman (FAO 2007). Aunque los sistemas nacionales de información en salud han mejorado substancialmente, aún no se puede precisar los patógenos principales y los alimentos involucrados en los casos de enfermedad, información indispensable para contar con sistemas de prevención y control de estas enfermedades (Fuentes *et al*, 2005). Tan solo en el 2013 el seguro social brindó 5,329,815 consultas por enfermedades gastrointestinales pero hay razones para creer que en realidad son mucho más que las registradas (Secretaria de Salud, 2014).

II. 2 Queso en México.

El queso es un alimento universal, que se produce en casi todas las regiones del mundo a partir de leche de diversas especies de mamíferos. Los quesos se encuentran entre los mejores alimentos del hombre, no solamente en razón de su acusado valor nutritivo (materias nitrogenadas bajo diferentes formas, materias grasas, calcio, fósforo, etc.), sino también en razón de las cualidades organolépticas extremadamente variadas que poseen (Gonzalez, 2010).

En el país, se considera que la elaboración del queso data de la época de la colonia, desde que los españoles introdujeron al ganado y con ello el desarrollo de la ganadería; no obstante, se carece de documentos escritos que avalen esta

hipótesis, debido a que la principal forma de transmisión de este conocimiento es verbal y generacional por tradición (PROFECO, 2000).

El queso es el producto elaborado con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior por calentamiento, drenado, o prensado, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales (NOM-243-SSA1-2010). Estas diferencias en los procesos dan lugar a las distintas variedades de quesos: fresco, madurado o procesado.

II. 2.1 Queso fresco

La norma oficial mexicana define al queso fresco, como el producto que cumple en lo general con lo señalado en la definición de queso y que se caracterizan por ser un producto de alto contenido de humedad, sabor suave y no tener corteza, pudiendo o no adicionarle ingredientes opcionales y tener un período de vida de anaquel corto, requiriendo condiciones de refrigeración (NOM-243-SSA1-2010).

En la actualidad, para su elaboración se emplean procedimientos técnicos especializados y con alguna influencia extranjera; como sucede con el queso tipo Chihuahua, Oaxaca y el asadero (PROFECO, 2000).

Existe una variedad de entre veinte y cuarenta diferentes tipos de quesos elaborados en el país con unos pocos hechos en gran volumen, tales como Oaxaca (Villegas, 1993).

La gran mayoría de quesos que se producen en México son frescos es decir no se someten a un proceso de maduración. Los quesos frescos contienen una alta proporción de humedad (60 a 80%), en comparación con otras variedades; presentan un aroma característico, sabor suave, brinda un aporte nutrimental por su contenido de calcio, vitamina A y proteínas; sin embargo, su vida de anaquel es corta. Por lo tanto, estos quesos deben conservarse en frío. La duración de su vida

útil depende del contenido en agua, de la calidad de la materia prima, de las técnicas de fabricación y de las condiciones higiénicas durante la manipulación, el almacenamiento y la distribución (Santos, 2006).

La Norma Oficial Mexicana (NOM-243-SSA1-2010) clasifica los quesos de acuerdo a su proceso de elaboración como se muestra en la Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación de los quesos frescos. Adaptada: Norma Oficial Mexicana. NOM-121-SSA1-1994

Tipo de quesos.		
<i>Frescales</i>	<i>De pasta cocida</i>	<i>Acidificados</i>
Panela	Oaxaca	Cottage
Canasto	Asadero	Crema
Sierra	Mozzarella	Doble Crema
Ranchero	Del morral	Petit Suisse
Fresco	Adobera	Nuefchatel
Blanco		
Enchilado		
Adobado		

II. 2.2 Producción y consumo de queso fresco.

Entre 2005 y 2012, la producción industrial de leche y derivados lácteos registró un comportamiento favorable en la mayor parte de los productos. De acuerdo a la información proporcionada por el INEGI, destacan la producción de yogurt y quesos, con unas tasas de crecimiento promedio de 7,3 y 5,7 %, respectivamente (Hervás, 2012).

Mientras que en el 2013 el volumen de producción de queso fresco fue de 119,894 toneladas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Producción de lácteos en México, 2007-2013.

Producción industrial de leche y derivados lácteos (toneladas)							
Producto	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Leche * ¹	4,463,782	4,583,680	4,586,287	4,441,358	4,275,036	3,845,646	3,436,997
Yogurt * ²	631,462	611,977	489,004	688,210	694,345	711,245	661,198
Leche (polvo) * ³	234,412	231,295	220,223	235,838	241,074	254,678	232,608
Crema y mantequilla * ⁴	988,730	929,470	784,620	1,035,803	1,046,237	1,088,772	1,029,550
Quesos * ⁵	229,632	239,939	220,876	275,293	275,411	290,715	287,863
Queso fresco * ⁶	92,197	94,314	85,400	114,377	107,820	110,452	119,894

1/ Incluye leche pasteurizada, homogeneizada entera, descremada, rehidratada y de sabores

2/ Incluye yogurt natural, yogurt con frutas y/o cereales, para beber y licuados.

3/ Incluye leche entera, descremada y para lactantes.

4/ Incluye mantequilla y margarina

5/ Incluye quesos Amarillo, Chihuahua, Crema, Doble Crema, Fresco, Manchego, Oaxaca, Panela y Otros.

6/ Incluye Queso Fresco, Oaxaca y Panela

Fuente: SAGARPA, 2013

El consumo de quesos se da en todos los niveles socioeconómicos, y alcanza la cantidad de 2.8 kg per cápita anual promedio. Los quesos Oaxaca y panela (frescos), son de los más consumidos en el país (Rodríguez y Durán, 2010).

Los quesos, los yogurts y las leches industrializadas (pasteurizada, ultra pasteurizada y en polvo) ocupan los primeros lugares de comercialización (Cuadro 2) en las zonas urbanas, ya que estas poseen vías de comunicación accesibles y concentran grupos con niveles de ingreso más altos, por otra parte, en las zonas rurales el consumo de lácteos se limita principalmente a leche bronca y los productos artesanales, aunque estos últimos también pueden tener presencia en el mercado de las zonas urbanas (Secretaría de Economía, 2012).

En el país existen un gran número de pequeñas empresas cuyos procesos de elaboración de quesos frescos son artesanales; sin embargo, la mayor producción está dada por las grandes empresas, quienes contribuyen con más del 60% del total de la producción anual en el país (INEGI, 2010).

Las principales empresas son Chilchota Alimentos y Sigma Alimentos, que conjuntamente tienen una participación de mercado del 50%, adicionalmente participan Lala, Alpura y La Esmeralda con aproximadamente 18% (Secretaría de Economía, 2012).

II. 3 Riesgos microbianos por consumo de queso fresco

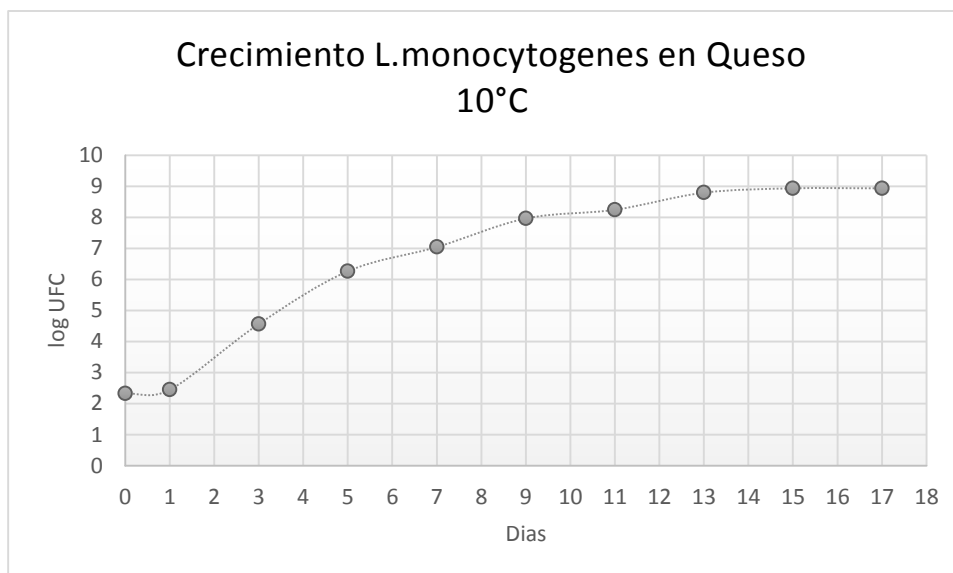
Se entiende por riesgo a la probabilidad de que ocurra un peligro, que en este caso será la probabilidad de que el consumo de queso fresco pueda provocar una enfermedad en el consumidor por estar contaminado con un microorganismos patógeno o una toxina (WHO, 1997).

El contenido de nutrientes y propiedades físico-químicas brindan un medio ideal para el desarrollo de microorganismos patógenos, lo cual, asociado con prácticas inadecuadas de producción y manufactura, convierten la leche cruda en un alimento que puede ser de alto riesgo (Weir *et al.*, 2007), especialmente para sub-poblaciones susceptibles como mujeres embarazadas, pacientes inmunocomprometidos, niños y adultos mayores (CDC, 2007).

En una investigación donde se estudiaba la calidad microbiológica de dos tipos de queso fresco expandido en diferentes mercados de la ciudad de Guadalajara; México, se encontraron patógenos como *E. coli* O157:H7, *Salmonella* y *L. monocytogenes*; concluyéndose que el producto presentaba una deficiente calidad microbiológica, probablemente debido, a malas prácticas de higiene durante su elaboración y distribución (Vitella *et al.*, 2011).

Uhlich en el 2006, observó que *L. monocytogenes* puede desarrollar más de 4 logaritmos en queso blanco a temperatura de 10°C en un periodo de 15 días. También se analizó *Salmonella* en queso suave pudiendo observar su desarrollo de 4 logaritmos en tan solo 3 días almacenándolo a 25 °C (Figura 1).

A)



B)

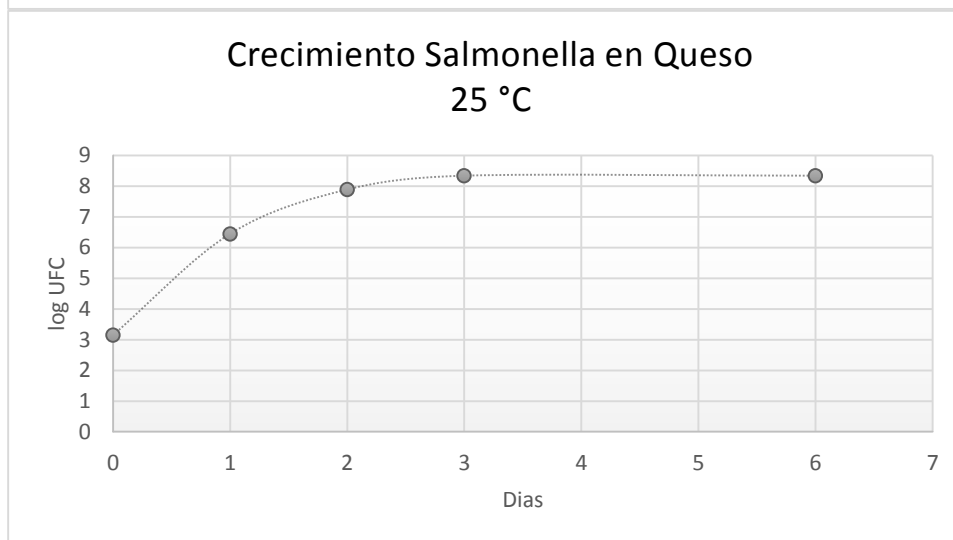


Figura 1. Dinámica de desarrollo de *L. monocytogenes* en queso fresco almacenado 10 °C (A) y *Salmonella* almacenado a 25 °C (B).

II.3.1 Enfermedades transmitidas por consumo de quesos.

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) constituyen uno de los problemas sanitarios más comunes y de mayor impacto sobre la salud de las personas en el mundo. La región latinoamericana experimentó al menos 6,000 brotes de diversos tipos de enfermedades de origen alimentario entre 1993 y 2002. Sin embargo, esta estimación se encuentra todavía muy por debajo de la incidencia real del problema según los expertos (OPS, 2005).

La aparición de brotes de ETAs perjudica tanto a la industria alimentaria, al comercio y al turismo, provocando pérdidas de ingresos, desempleo y demandas. Además, el deterioro de los alimentos ocasiona pérdidas cuantiosas y puede influir negativamente en el prestigio de las marcas y en la confianza de los consumidores (Diaz *et al.*, 2010).

Durante 1993-2006 en E.U.A, un total de 30 estados informaron de 121 brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos causadas por productos lácteos contaminados. El número de brotes por lácteos reportados aumentó en 1998 después de que la vigilancia de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos fue mayor (Langer, 2006).

El 60% de los brotes (73) involucraron productos lácteos sin pasteurizar. De los 121 brotes, 65 (54%) se asociaron a queso y 56 (46%) a leche. De los 65 brotes con queso, 27 (42%) fue queso elaborado con leche sin pasteurizar. De los 56 brotes que involucran a la leche, el porcentaje fue aún mayor (82%) de producto sin pasteurizar.

Las personas enfermas que fueron afectadas por los productos lácteos sin pasteurizar, eran generalmente más jóvenes (60% de los casos era de <20 años) que en los brotes en donde los productos lácteos eran pasteurizados. De los 60 brotes relacionados con por productos lácteos sin pasteurizar (el 23% de los pacientes eran <20 años).

La proporción de personas hospitalizadas fue mucho mayor entre quienes consumieron productos no pasteurizados que aquellos que consumieron productos cuyo proceso si se realizó (Cuadro 3).

Cuadro 3. Incidencia de enfermos, hospitalizados y muertes según si el producto fue pasteurizado o no pasteurizado.

Producto	Brotos	Casos	Hospitalizaciones	Muertes
Queso no pasteurizado	27	641	131	2
Queso pasteurizado	38	744	17	1
Total	65	1385	148	3

(Langer, 2006).

Es evidente que el riesgo de enfermedad por productos no pasteurizados es mayor comparándolos con aquellos que si recibieron el proceso térmico.

En Carolina del norte se reportó un brote de listeriosis asociado a consumo de queso fresco estilo mexicano elaborado con leche cruda en donde se vieron involucrados 11 mujeres y 1 adulto inmunocomprometido de 70 años de edad, todos los quesos eran elaborados artesanalmente y carecían de etiqueta en donde se garantizara buenas prácticas de manufactura. El estudio se extendió hasta dar con el ganado que producía la leche, sin embargo ninguna el ganado fue diagnosticada con *L.monocytogenes*, lo cual indica que la contaminación fue ambiental (CDC,2001).

En febrero de 1997 - California reporto dos brotes por consumo de queso fresco estilo mexicano, 93 personas fueron afectadas por *Salmonella*, en algunos pacientes la cepa era multiresistente a antibióticos. Los quesos fueron obtenidos por los consumidores en mercados locales cuyos quesos eran elaborados con leche cruda (Cody et al., 2004).

A pesar de que la venta de quesos frescos estilo mexicano elaborados con leche cruda en EUA es ilegal existen registros a lo largo de los años sobre los brotes que se han reportado debido a su consumo. En el periodo de 1998 al 2011 hubo un total de 26 brotes por este tipo de queso, 20 fueron por quesos sin pasteurizar y 6 por queso pasteurizado. Algunas de las causas que generaron los brotes fue el uso

de leche cruda y/o contaminación post-pasteurización empleando malas prácticas de manufactura. Se reportaron mayores casos de hospitalización cuando el queso no era pasteurizado. Los principales agentes patógenos asociados a las enfermedades causadas fueron *Salmonella* y *L. monocytogenes* (Gould, 2014).

En Francia, lugar donde la producción de quesos frescos también es común, se han producido varios brotes. Un queso blando elaborado con leche cruda de vaca fue la fuente de un brote por *L. monocytogenes* entre 20 personas. Once mujeres embarazadas se vieron afectadas; dos sufrieron abortos espontáneos, dos mortinatos, y cinco nacimientos prematuros (Goulet *et al*, 1995).

En Vermont, la infección por *Salmonella Derby* ocurrió en ocho personas, dando lugar a los síntomas de la diarrea, calambres abdominales y fiebre (Vogt *et al*, 1981). Los quesos frescos no pasteurizados fueron los responsables.

En el siguiente cuadro se muestran otros brotes donde los principales agentes patógenos son *Salmonella* y *L. monocytogenes* en quesos frescos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Brotes generados por consumo de queso alrededor del mundo.

Año	Variedad	Patogeno	Casos	País
1976	Manchego	<i>Salmonella</i>		España
1977	Suiss	<i>S.aureus</i>	12	Canadá
1983	Casero	<i>S.zooepidermicus</i>	16	EUA
1985	Fresco	<i>L. monocytogenes</i>	142	EUA
1992	Mozzarella	<i>S.Javiana</i>	147	EUA
1993	Fresco	<i>S.paratyphi B</i>	273	Francia
1995	Fresco	<i>L. monocytogenes</i>	20	Francia
2000	Fresco	<i>L. monocytogenes</i>	13	EUA
2006	Fresco	<i>Salmonella</i>	13	EUA
2014	Fresco	<i>Salmonella</i>	17	EUA
2015	Fresco	<i>L. monocytogenes</i>	30	EUA

(Fuente: CDC, 2000; CDC, 2006; Fernández, 2008; CDC, 2015; CDC, 2014;.)

II.3.2. Posibles fuentes y mecanismos de contaminación.

El alimento que, en este caso es queso fresco se entiende como un ecosistema en donde los microorganismos dotados de una notable capacidad adaptativa manifiestan su vitalidad compitiendo por los nutrientes y superando diversos factores. El conocimiento de tales factores y las estrategias que siguen los microorganismos son fundamentales para desarrollar medios de prevención y control, tanto del deterioro microbiano como de la sobrevivencia y desarrollo de microorganismos patógenos (Fernández, 2008).

Es esencial conocer y familiarizarse con las fuentes y los mecanismos de contaminación como requisito para detectarlos de manera efectiva y tomar las medidas pertinentes que nos ayudarán a controlar el proceso y evitar la introducción de patógenos al alimento. Debe actuarse sobre la base de que el germen patógeno se encuentra presente en el alimento por preparar o procesar, y precisar la importancia de inhibir el desarrollo del patógeno o inactivarlo y lograr un alimento libre de patógenos, tal es el caso de la pasteurización en la leche. La prevención de un brote radica en el conocimiento de los factores propiciadores de la disposición, sobrevivencia y desarrollo de los agentes microbianos.

La calidad de la leche comercial y de sus derivados elaborados en una industria de quesos, depende principalmente de la calidad de la leche cruda, eficiencia de los procesos térmicos, y la calidad sanitaria de utensilios con que se procesará (Rangel, 2000). En la Figura 2 se muestra el proceso general de producción de queso fresco.

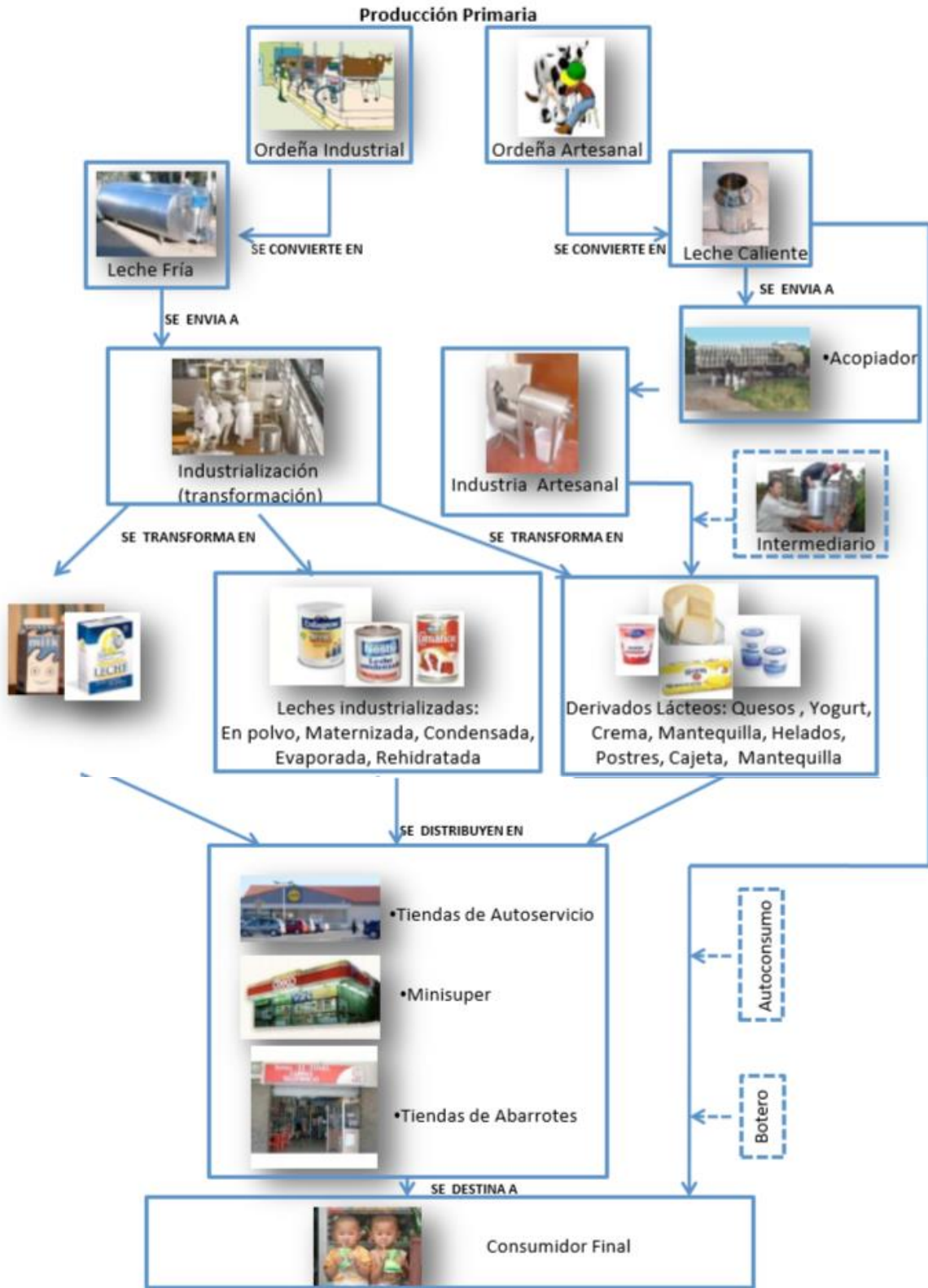


Figura 2. Producción y distribución de queso fresco y derivados lácteos en México.
Fuente: Secretaria de Economía, 2012

Las principales causas de presencia y actividad de microorganismos patógenos y deterioradores que ocurren durante la fabricación de quesos son:

A. Elevada carga microbiana en la materia prima:

- Uso de leche cruda
- Uso de leche mal pasteurizada
- Uso de leche defectuosa (mala cadena de frío)
- Uso de equipo mal saneado

B. Cultivos lácticos defectuosos:

- Contaminados
- Con vitalidad mermada
- Con pérdida de la capacidad para llevar a cabo los procesos bioquímicos que les caracterizaban
- Infectados por bacteriofagos

C. Sustancias antimicrobianas en la leche:

- Antibióticos excretados en la leche
- Residuos de germicidas aplicadas en el equipo
- Conservadores adicionados a la leche cruda

D. Fallas tecnológicas:

- Inoculo insuficiente de cultivos indicadores
- Inadecuada temperatura de conservación de la leche inoculada

E. Ausencia de empaque

F. Manejo durante la comercialización:

- Rotura del empaque
- Abuso de la temperatura
- Rebasamiento del periodo de caducidad

G. Manejo del producto poco higiénico de los operarios a lo largo del proceso de producción

(Kousta *et al.*, 2009).

Teniendo en cuenta lo anterior, en todas las etapas en el procesamiento del queso puede ocurrir la contaminación y la proliferación de microorganismos, poniendo en una zona de alto peligro al consumidor y generar un posible brote de ETA. La pasteurización es uno de los métodos más efectivos para controlar la presencia de patógenos en los lácteos, sin embargo es importante vigilar y controlar las etapas posteriores para que no exista reingreso de patógenos al producto comprometiendo la inocuidad del producto final.

II.4 Principales microorganismos patógenos asociados a quesos frescos.

II.4.1 *Listeria monocytogenes*.

L. monocytogenes es el microorganismo patógeno responsable de la listeriosis, enfermedad de carácter grave transmitida por los alimentos. A pesar de presentarse con una baja frecuencia, en la actualidad es una de las ETAs más letales conocidas con un porcentaje de letalidad del 20% (CDC, 2014).

El género *Listeria* se divide en seis especies (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, y *L. grayi*), donde *L. monocytogenes* es patógena para el hombre (Cossart, 1997). Es una bacteria Gram positiva, aerobia o anaerobia facultativa, móvil a 25° C e inmóvil a 37° C, capaz de desarrollar a temperaturas entre 1° C y 45° C con una óptima de crecimiento de 37° C. Se le considera un patógeno psicrótrofo, es decir, capaz de desarrollar a temperaturas de refrigeración, lo cual le diferencia de otras bacterias patógenas como *Salmonella* o *Staphylococcus aureus*, que son inhibidas en su crecimiento a bajas temperaturas. En cuanto al pH, desarrolla en un rango entre 4,4 y 9,4, crece en presencia de un 10% de NaCl y sobrevive a un 16 a 20% posibilitando su sobrevivencia y proliferación en el queso fresco ya que sus características son ideales para el desarrollo teniendo un pH cercano a la neutralidad, una actividad de agua de 0.98, y temperaturas de refrigeración de 4 - 7°C aproximadamente (Marzocca *et al.*, 2004).

Este microorganismo se encuentra ampliamente distribuido tanto en el ambiente terrestre (suelo, plantas, ensilaje, materia fecal, aguas residuales), en el ambiente acuícola y también en lugares donde se procesan alimentos. En plantas de producción de alimentos puede encontrarse en el suelo, aguas estancadas, equipos de procesamiento, cintas transportadoras, cámaras de frío y túneles de congelación, entre otros. Su crecimiento en este entorno se ve favorecido por la alta humedad y la presencia de nutrientes (FAO, 2007).

La enfermedad afecta principalmente a los adultos mayores, las mujeres embarazadas, recién nacidos y adultos con sistemas inmunológicos debilitados. Sin embargo, en raras ocasiones, las personas sin estos factores de riesgo pueden también verse afectados (Schlech *et al.*, 1983).

Una persona con listeriosis suele tener fiebre y dolores musculares, a veces precedidos por diarrea u otros síntomas gastrointestinales. Casi todo el mundo que ha sido diagnosticado con listeriosis tiene infección "invasivo", en el que las bacterias se propagan más allá del tracto gastrointestinal. Los síntomas varían con la persona infectada:

- Mujeres embarazadas: suelen tener fiebre y otros síntomas no específicos, tales como la fatiga y dolores en el cuerpo. Sin embargo, las infecciones durante el embarazo puede llevar al aborto involuntario, muerte fetal, parto prematuro, o infección que amenaza la vida del recién nacido.
- Las personas inmunodeprimidas: los síntomas pueden incluir dolor de cabeza, rigidez en el cuello, confusión, pérdida del equilibrio y convulsiones, además de fiebre y dolores musculares. (Painter *et al.*, 2007).

La emergencia de la listeriosis humana transmitida por alimentos como un asunto del máximo interés de salud pública comprenden los cambios importantes en la producción, procesamiento y distribución de los alimentos, la utilización cada vez mayor de la refrigeración como medio de conservación primaria de los

alimentos, los cambios en los hábitos de comida de la población, particularmente respecto a la comodidad de los alimentos ya preparados y un incremento del número de personas consideradas de alto riesgo de sufrir la enfermedad (ancianos, gestantes, recién nacidos, inmunodeprimidos) (Rocourt, 1997).

La contaminación de la leche puede originarse a través de la alimentación de las vacas con ensilaje de mala calidad, en el cual la bacteria se multiplicó durante la maduración. También puede originarse a través de vacas con mastitis subclínica, o por presencia del patógeno en el ambiente del lugar de ordeño o sobre las superficies de los estanques de recepción de leche en la planta lechera, entre otros factores. La presencia del patógeno en leche cruda representa un peligro potencial para el consumidor frente al hábito de consumir leche cruda o quesos elaborados a partir de leches no tratadas térmicamente. Numerosos estudios demostraron que la pasteurización a 72 °C durante 15 o más segundos, son suficientes para destruir el bajo número de células de *L. monocytogenes* habitualmente presentes en leche cruda. El aislamiento de la bacteria en productos lácteos pasteurizados obedecería por lo tanto a un proceso deficiente o a una re contaminación post tratamiento térmico (Schöbitz, 2003).

II.4.2 *Salmonella*.

Salmonella es un género de bacterias que pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Es un agente productor de zoonosis de distribución universal. Se han identificado más de 2500 serotipos of *Salmonella* en una gran diversidad de nichos ecológicos. La clasificación más reciente de *Salmonella*, basada en la secuenciación de DNA, considera solamente 2 especies: *S. enterica* y *S. bongori*. (Uribarren, 2014).

Salmonella puede crecer entre 7-49 °C, su crecimiento se ve reducido a <15 °C. Es muy importante destacar que la temperatura de refrigeración minimiza su

crecimiento y la de congelación lo detiene, pero no inactivan la bacteria (Lake *et al.*, 2002).

Crece a niveles de pH que varía entre 3.5 y 9, la tolerancia al ácido depende del tipo y tamaño del ácido al cual se expone el microorganismo, en caso de los productos lácteos al tener un pH cercano a la neutralidad *Salmonella* podría desarrollar (ICMSF, 1996).

Cuando *Salmonella* pasa del medio ambiente a los productos lácteos ya sea por contaminación cruzada, ingreso post-pasteurización, contaminación directa, etc. es capaz de multiplicarse a una velocidad muy elevada, tal y como lo observo Uhlich en el 2006, donde sólo bastan 48 hrs para que pase de 3 Log de UFC a más de 7 Log de UFC en queso a temperatura de 25°C. Por tanto, la temperatura es un factor clave en el desarrollo de *Salmonella*.

Las infecciones provocadas por *Salmonella* pueden generar síntomas agudos – como náuseas, vómitos, calambres abdominales, diarrea minal, fiebre y dolor de cabeza. El tiempo de latencia suele ser de 6 a 48 horas. La dosis infectiva puede ser de tan sólo 15 a 20 células; depende de la edad y la salud del huésped. Los síntomas agudos pueden durar de 1 a 2 días o puede ser prolongada, de nuevo dependiendo de factores del huésped, dosis ingerida y características de las cepas.

S. Typhi y *S. Paratyphi* A, B y C producen la fiebre tifoidea en los seres humanos. Varios órganos pueden estar infectados, dando lugar a lesiones. La tasa de mortalidad de la fiebre tifoidea es del 10% en comparación con menos del 1% para la mayoría de las formas de la salmonelosis. *S. dublin* tiene una tasa de letalidad del 15% cuando septicémica en los ancianos, y *S. Enteritidis* está demostrando aproximadamente una tasa de letalidad del 3.6% en los brotes de origen hospitalario, siendo los ancianos los más afectados. (FDA, 2012)

Para fines preventivos se deberá tener una correcta pasteurización del producto lácteo y hacer conciencia sobre la importancia de este microorganismo en los alimentos. Así mismo, es indispensable mantener la cadena de frío durante el transporte, almacenamiento y distribución de los quesos.

II.4.3. Detección de Microorganismos por qPCR.

La detección de microorganismos por métodos convencionales es eficaz, sin embargo se requiere de periodos prolongados para su confirmación. Con esto en mente, diversos grupos de investigación han evaluado nuevas herramientas de diagnóstico durante años para acortar el tiempo de análisis.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Los recientes avances en la tecnología de PCR incluyen el desarrollo de dispositivos de qPCR. Esta técnica añade un módulo óptico a un ensayo de PCR estándar, lo que permite la captura de señales fluorescentes a partir de productos de PCR marcados. Este método de detectar el amplicón, fragmento de ADN replicado durante la reacción de PCR, es la principal diferencia entre las tecnologías de PCR convencionales y en tiempo real, el instrumento detecta la intensidad de la señal fluorescente durante cada ciclo de replicación de la PCR (Mackay, 2004). Registros en el software del ordenador muestra la cantidad de fluorescencia en unidades de fluorescencia relativa (RFU). El ciclo de amplificación en el que la fluorescencia excede un nivel umbral definido se conoce como el ciclo umbral (Ct). El software de análisis de datos permite el cálculo en tiempo real, eliminando la necesidad para el análisis post-amplificación de PCR convencional (Corless *et al.*, 2000).

Los ingredientes químicos en la PCR en tiempo real, son semejantes a los utilizados en la PCR punto final solo que aquí se emplea un fluoróforo o un indicador para evidenciar la amplificación. Los iniciadores deben ser diseñados especialmente para garantizar una alta especificidad y para que generen

amplicones de un tamaño que oscile entre 100-200 pb; si éstos son más grandes, la eficiencia de la reacción disminuye considerablemente (Tamay, 2013).

Dentro de sus aplicaciones se puede observar que es una herramienta de gran utilidad en la industria alimentaria ya que permite detectar con mayor facilidad la presencia de patógenos en los productos alimenticios, arrojando una especificidad, sensibilidad y velocidad superiores.

El uso de qPCR en diferentes matrices alimentarias tales como carne de pollo, filete de pescado, huevo, salsas, hot dogs y comida rápida ha mostrado resultados satisfactorios para la detección de *Salmonella* y *L. monocytogenes* pudiendo facilitar las pruebas de rutina aplicando los beneficios ya mencionados (Malorny, 2004; Peng, 2000). Por otra parte el queso fresco muestra una matriz compleja donde puede haber presencia de inhibidores que afecten los resultados de qPCR. Por esta razón es necesario verificar y validar la técnica para su uso en diferentes alimentos (Stock, 2006).

La qPCR aún no puede sustituir por completo los métodos de detección convencionales debido a sus actuales limitaciones técnicas y reglamentarias. Sin embargo, con el diseño de ensayo de cuidado y conocimiento de estas limitaciones, puede ser una herramienta poderosa en microbiología de los alimentos. Su capacidad para reducir el tiempo para detectar organismos puede liberar al personal de laboratorio para realizar otras tareas, lo que aumenta el rendimiento de las pruebas de laboratorio y la eficiencia de los programas de garantía de calidad. Además, el análisis rápido de muestras puede permitir la liberación rápida de producto, liberando espacio de almacenamiento valioso y permitiendo que los alimentos que son comercializados aprovechen mejor su vida útil (Hanna, 2005).

II.4.4. Detección de microorganismos por tecnología ANSR de Neogen.

La tecnología ANSR es un ensayo molecular basada en la amplificación isotérmica NEAR™ por sus siglas en ingles (Nicked Enzyme Amplification Reaction). El mecanismo de amplificación implica la unión de un oligonucleótido

molde a una secuencia específica de ADN diana. La plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una endonucleasa específica. La hebra “dañada” es reconocida y reparada por la acción de una ADN polimerasa termoestable, desplazando la hebra original con la porción recién sintetizada. Este producto de ADN desplazado se une a una segunda plantilla y las mismas reacciones conducen a la formación de un segundo producto. El segundo producto es homólogo a la secuencia diana y puede detectarse usando una sonda molecular específica. La señal fluorescente se genera en tiempo real, la amplificación y detección se completa dentro de 10 min. Todo el ensayo se realiza a una temperatura constante de 56 ° C usando un instrumento de detección de fluorescencia de temperatura controlada. El software analiza la señal fluorescente; mediante un algoritmo se interpretan los resultados como negativo, positivo, o no válido basado una línea de base. Cada tubo de reactivos ANSR también contiene un control positivo interno, la señalización en un segundo canal de fluorescencia independientemente de la presencia de ADN diana, este indica o evidencia el correcto funcionamiento del proceso de amplificación (Mozola *et al.*, 2013).

El ensayo completo de ANSR requiere de corto tiempo después del enriquecimiento (10 a 24 h) con un aproximado de 30 minutos, pocos reactivos, mano de obra e instrumentación. En pruebas de inclusividad se detectaron 113 cepas entre *S. entérica* y *S. bongori*, en pruebas de exclusividad no produjo ninguna detección con 38 cepas no pertenecientes a *Salmonella*, en su gran mayoría Enterobacterias. Como todo método molecular requiere de una previa validación en la matriz alimenticia en donde se requiere aplicar. ANSR fue validado inicialmente para la detección de *Salmonella* spp. en canales de pollo, carne de pavo molida cruda, carne de res cruda tierra, perros calientes, cereal de avena, en acero inoxidable, plástico, hormigón sellada, baldosas de cerámica y las superficies de goma, sin embargo el desarrollo de estudios actuales sigue en proceso (Caballero, 2014).

III. JUSTIFICACIÓN:

Las condiciones en que se manipulan los alimentos a lo largo de la cadena productiva hasta su consumo final, determinan su calidad, incluyendo su inocuidad. Motivo por el cual una empresa quesera situada en el estado de Querétaro interesada en mejorar la calidad de su producto solicitó apoyo para evaluar las prácticas sanitarias que se realizan para la producción del alimento y la incidencia de patógenos.

Por otra parte el consumo de quesos artesanales expendidos en mercados es una práctica común en México, sin embargo el uso de leche no pasteurizada en su producción representa un riesgo para la salud. De acuerdo a lo reportado por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) *Salmonella* es un agente epidemiológico recurrentemente vinculado a la producción de queso fresco.

La detección de microorganismos patógenos requiere de cuatro a cinco días para obtener un resultado presuntivo positivo o negativo. Además estas técnicas no permiten la recuperación de bacterias que se encuentren en un estado viable no cultivable.

Por lo tanto la evaluación de técnicas moleculares permitirá detectar la presencia de *Salmonella* en menos de 30 horas. Con un nivel apropiado de sensibilidad, especificidad y precisión permitirá ahorrar tiempo, esfuerzo, costo y al mismo tiempo obtener un panorama más completo de la incidencia de este microorganismos patógeno en el producto lácteo. Información que permitirá mejorar las prácticas de manufactura dentro de la empresa para obtener un queso fresco e inocuo.

IV. OBJETIVOS.

IV.1 Objetivo general.

Investigar la incidencia de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en quesos frescos que son expendidos en la ciudad de Querétaro.

IV.2 Objetivos específicos.

Determinar el perfil de microorganismos indicadores e incidencia de *Salmonella* y *L. monocytogenes* a lo largo del procesamiento de quesos frescos (Asadero, Oaxaca, Ranchero y Panela).

Determinar el perfil de microorganismos indicadores e incidencia de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en quesos frescos (oaxaca y panela) que se expenden en mercados públicos en el estado de Querétaro.

Validar dos técnicas moleculares para la detección de *Salmonella* a partir de quesos frescos.

Comparar la detección de *Salmonella* mediante una técnica de qPCR y la tecnología ANSR.

V. METODOLOGIA

V.1 Materiales:

V.1.1 Material biológico:

Listeria monocytogenes (LCDC81-860)

Listeria monocytogenes (LCDC 260)

Listeria monocytogenes (Scott A)

Salmonella Montevideo (ATCC 8387)

Salmonella Thomson (ATCC 6391)

Salmonella enterica (ATCC 13076)

Salmonella Abaetetuba

V.1.2 Medios de cultivo:

Agar base sangre (BD Bioxon)

Agar cuenta estándar (DIBICO)

Agar soya tripticasa (DIBICO)

Agar hierro y triple azúcar (BD Bioxon)

Caldo soya tripticasa (DIBICO)

Caldo neutralizante (BD Difco)

Caldo LEB (Acumedia)

Caldo ANSR #2 (Neogen)

Agar xilosa lisina desoxicolato de sodio (BD Bioxon)

Agar sulfito bismuto (BD Bioxon)

Caldo tetrionato (BD Difco)

Caldo Rappaport Vassiliadis (BD Difco)

Agar Oxford modificado (Acumedia)

Peptona de caseína (BD Bioxon)

Caldo bilis verde brillante al 2% (BD Bioxon)

Caldo lauril sulfato con MUG (BD Difco)

V.1.3 Equipo:

Incubadora de precisión 30°C (Thermo scietific)

Incubadora de precisión 35°C (Felisa)

Incubadora precisión 22°C (Blue M)

Centrifuga (EBA 20 HETICH)

Cámara de electroforesis (Bio-rad)

Fototransiluminador (KODAK Eda 290)

Termociclador PCR punto final (Techne TC-512)

Termociclador qPCR (Rotorgene de Qiagen)

Nanodrop (Thermo Scientific 2000c)

Se emplearon materiales, utensilios y equipos comunes en un Laboratorio de Microbiología.

V.2 Métodos

V.2.1 Recolección de muestras y puntos de muestreo dentro de la empresa.

En una empresa productora de queso fresco, localizada en el estado de Querétaro, se realizaron visitas periódicas durante un año (Diciembre 2013 – Noviembre 2014)) colectandose un total de 300 muestras.

En primer término, se determinaron los posibles puntos de contaminación en la empresa, en base a un estudio observacional del proceso de producción (Figura 3) se llevaron a cabo muestreos en diferentes etapas: recepción de la leche,

pasteurización, cuajado, moldeado, refrigeración, empackado y almacenamiento. Se colectaron muestras de producto, superficies, equipos, utensilios y operarios.



Figura 3. Diagrama general del proceso de producción del queso fresco.

Se seleccionaron como puntos de muestreo aquellas etapas que pudiesen comprometer la inocuidad del producto, considerando que la leche es un producto altamente perecedero. En el Cuadro 5 se detallan los materiales de los que se tomaron las muestras de acuerdo a la naturaleza de cada grupo (operarios, producto, superficies, equipo, utensilios y otros).

Cuadro 5. Muestras analizadas durante el procesamiento del queso fresco.

Tipo de muestras	Descripción de muestras
Productos	Queso Ranchero, Panela, Oaxaca, Asadero. Leche.
Superficies	Pisos Mesas de trabajo Charolas
Operarios	Manos Mandil Fómites
Equipos	Tinas Bandas
Utensilios	Balanza Moldes Lira Cuchillo Palas Cajas
Otros	Bolsa de empaque

V.2.2 Recolección de muestras de queso fresco en mercados públicos de la ciudad.

En este bloque del trabajo de investigación se colectaron 100 muestras de queso fresco (50 quesos panela y 50 quesos oaxaca) expendidos en 6 mercados del estado de Querétaro.

V.2.3 Preparación de las muestras de queso fresco obtenidas de la empresa y de mercados públicos.

Las muestras se colectaron con guantes, material y equipo estéril. Las muestras se transportaron en hieleras al Laboratorio de Microbiología de Alimentos para realizar el análisis, después de no más de 2 horas de su recolección.

Debido a la variedad de los materiales incluidos en el estudio, se describe la preparación realizada previa al análisis por tipo de muestra:

Superficies (manos, mandiles y guantes de operadores, equipo y utensilios): se utilizaron bolsas whirl pack con esponja. La esponja se hidrató con 15 mL de caldo neutralizante. La esponja se froto en un área de 100 cm³ (10 x 10 cm) de las superficies muestreadas. Posteriormente, las muestras se homogenizaron en un homogeneizador peristáltico durante 1 minuto a velocidad media y a partir de esta suspensión se prepararon diluciones decimales en diluyente de peptona (0.1%).

Producto (materiales sólidos en proceso y producto final): se pesaron 10 gr de cada una de las muestras y se colocaron dentro de bolsas comerciales de polietileno, a las cuales se adicionaron 90 ml de diluyente de peptona (0.1%), se mezclaron en el homogeneizador peristáltico durante 1 minuto a velocidad media y se prepararon diluciones decimales en diluyente de peptona (0.1%).

Leche: se colectaron 10ml del líquido en tubo limpio y esteril. Posteriormente se homogenizo durante 1 minuto en vortex a velocidad media y se prepararon diluciones decimales en diluyente de peptona (0.1%).

En las muestras colectadas de la empresa como de mercados se determinó la presencia de microorganismos indicadores e incidencia de patógenos: bacterias mesófilas aerobias (BMA), organismos coliformes totales (OCT), *E. coli*, *Salmonella* y *L. monocytogenes*.

V.2.4 Análisis microbiológico.

V.2.4.1 Microorganismos indicadores.

El recuento de BMA se llevó a cabo por vaciado en placa partiendo de las diluciones realizadas previamente, el proceso fue conforme se indica en el manual de análisis bacteriológicos (BAM) de los Estados Unidos (FDA; 1998).

Para el análisis de OCT y *E.coli* se utilizó la técnica de número más probable (NMP). La prueba presuntiva para OCT se realizó en caldo lactosado y los tubos que resultaron positivos (es decir los que presentaron producción de gas dentro de las 24 a 48 hrs de incubación a 35°C) fueron confirmadas en caldo lactosa bilis verde brillante (CLBVB) (a 35°C por 24 a 48 hrs). A la par se inocularon tubos con caldo lauril sulfato con MUG, agua peptonada y CLBVB para determinar la presencia de *E.coli*. La combinación de la producción de gas a partir de la fermentación de la lactosa en caldo verde brillante, la prueba de indol positiva en agua peptonada y la presencia de la enzima β -glucoronidasa a 44.5°C se consideró como presencia de *E.coli*.

En resumen el cuadro 6 se especifica los medios de cultivo utilizados para cada grupo indicador y las condiciones requeridas para permitir su desarrollo.

Cuadro 6. Grupo indicador y el medio en el cual se desarrolla.

Grupo de microorganismos	Condiciones/medios de cultivo
Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA)	Vaciado en placa Agar cuenta estándar Incubación a 35°C/48 h
Organismos Coliformes Totales (OCT)	NMP Caldo lactosado (confirmación en CLBVB) Incubación a 35°C/24 h y 48 h
<i>E.coli</i>	NMP Caldo lactosado (confirmación en CLBVB, CLS con MUG y agua peptonada) Incubación a 45°C/24h y 48h

V.2.5 Microorganismos patógenos

Salmonella y *L. monocytogenes* se investigaron en la empresa en muestras compuestas obtenidas de manos (3-5 individuos) y producto (25 g). En los quesos obtenidos en mercados se emplearon porciones de 25g para los análisis.

V.2.5.1 Detección y aislamiento de *Salmonella* por el método tradicional.

Todas las muestras se preenriquecieron y homogeneizaron (225 ml) con caldo lactosado (BD, Bioxón). Después de incubar a 35°C por 24 h, se tomaron alícuotas (1 ml) del caldo preenriquecido y se inocularon en caldos de enriquecimiento (tetracionato y caldo Rappaport). Los tubos fueron incubados a 43°C durante 24 h y posteriormente de cada de enriquecimiento se procedió al aislamiento de *Salmonella* en medios de cultivo sólidos: agar XLD (agar xilosa lisina desoxicolato) y agar sulfito bismuto (BD Bioxon). Las colonias que presentaron morfología característica del patógeno se aislaron e inocularon en agar triple azúcar hierro (TSI), agar lisina – hierro (LIA, BD Bioxon) y Urea. Las colonias con perfil bioquímico acorde con *Salmonella* se aislaron en agar soya tripticasa para llevar a cabo pruebas serológicas con antisuero polivalente.

V.2.5.2 Detección y aislamiento de *L.monocytogenes* por el método tradicional.

El procedimiento empleado para el aislamiento de *L.monocytogenes* consistió en homogenizar la muestra en un caldo de pre-enriquecimiento LEB (225 ml) e incubar por 24 h y 48 h a 35°C. Posteriormente se tomó una asada del cultivo para estriarlo en agar Oxford Modificado (MOX). Las placas se incubaran a 30 °C durante 24 a 48 h (USDA, 2001). Se seleccionaron aquellas colonias que mostraron un desarrollo característico del patógeno y se sometieron a pruebas bioquímicas SIM, y pruebas de utilización de ramnosa, xilosa y manitol.

V.2.6 Detección de *Salmonella* y *L.monocytogenes* mediante la reacción en cadena de la polimerasa punto final (PCR) en muestras de empresa.

De las muestras pre-enriquecidas en caldo lactosado se tomaron alícuotas de 1 ml y se transfirieron a caldo soya tripticasa incubándolo durante 24 h a 35 °C, posteriormente se tomó 1 ml del caldo y se transfirió a un micro tubo. Para *L. monocytogenes* de las muestras pre-enriquecidas con caldo LEB se tomó directamente 1 ml y se transfirió a un micro tubo. El tubo se centrifugó (4500 g por

10 min) y se decantó el sobrenadante; se agregó 1 ml de solución salina, se repitió el proceso de lavado y finalmente se resuspendió la muestra en solución salina. Se homogenizó en vortex y se extrajo el ADN mediante el calentamiento en un termobloque (99 °C por 60 min).

V.2.6.1 Condiciones de amplificación de PCR

El mezcla de reactivos del PCR consistió en 12.5 µL de master mix Go-Taq colorless - Promega, 1 µL de cada iniciador (InvA F: CGCGCTTGATGAGCTTTACC, InvA R: CTCGTAATTCGCCGCCATTG para *Salmonella*, el Hly F: CCTAAGACGCCAATCGAA y Hly R: AAGCGCTTGCAACTGCTC para *L. monocytogenes*) 2 µL de ADN y 8.5 µL de agua grado molecular para dar un volumen final de reacción de 25 µL. El PCR se realizó con el equipo termociclador (Techne). El programa de amplificación para *Salmonella* consistió en una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C durante 5 min, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 93 °C durante 10 s, hibridación a 42 °C durante 42 s y extensión a 72 °C durante 45 s, extensión final de 72 °C por 10 min. El programa de amplificación para *L. monocytogenes* consistió en una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C durante 5 min, seguido por 25 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, hibridación a 60 °C durante 25 s y extensión a 72 °C durante 25 s, extensión final de 72°C por 5 min.

V.2.6.2 Electroforesis

Se prepararon 150 ml de agarosa al 1.5% en buffer TAE 1X y se calentó hasta completa disolución. Se colocó el gel en la cámara de electroforesis y una vez enfriado se añadió 1L de buffer TAE 1X, verificando que el buffer cubra por completo el gel. Se colocó 1 µl de buffer de carga sobre las muestras y posteriormente se agregan 3.5 µl de la suspensión dentro de las fosas del gel de agarosa. Se llevó la electroforesis a 100V/90min. El gel se retiró cuidadosamente y se colocó en una solución de bromuro de etidio (0.2 µg/ml). Después de 20 min de revelado el gel se colocó en el transiluminador UV y se adquirió la imagen.

V.2.7 Detección de *Salmonella* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) para muestras de mercado.

V.2.7.1 Evaluación de sensibilidad.

Para la evaluación de la sensibilidad se elaboraron tres mezclas con diferentes cantidades de células de *Salmonella* (10, 100 y 10^8 UFC) y se inocularon porciones de 25g de queso fresco, se adicionó el caldo de pre-enriquecimiento para *Salmonella* dejándolo incubar 24 horas y se aplicó el procedimiento seleccionado de qPCR.

V.2.7.2 Extracción de ADN de queso fresco

De las muestras para realizar la evaluación de sensibilidad y muestras de mercados públicos (25 g) pre-enriquecidas en caldo lactosado (225 ml) se tomaron 1.8 ml del caldo y se transfirieron a micro tubos. Utilizando el Kit “Power Food” de Mo Bio se realizó la extracción siguiendo el protocolo de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

La pureza del ADN extraído se midió en base a la absorbancia a 260-280 nm usando el espectrofotómetro.

V.2.7.3 Condiciones de amplificación de qPCR.

La mezcla de reactivos para qPCR consiste en 10 µl de master mix Quantifast (Qiagen), 1 µl de cada iniciador (InvA F: CGCGCTTGATGAGCTTTACC, InvA R: CTCGTAATTCGCCGCCATTG), 2 µl de ADN y 6 µl de agua grado molecular para dar un volumen final de reacción de 20 µl. El qPCR se realizó con el equipo termociclador Rotor Gene (Qiagen). El programa de amplificación consistió en una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C durante 5 min, seguido por 32 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, hibridación a 65 °C durante 45 s y extensión a 72 °C durante 45 s, al final de los ciclos, el instrumento mostró la Temperatura de fusión (Tm) de los amplicones producidos. Cuando la Tm se corresponde con la Tm de los controles positivos, consideramos la reacción exitosa.

V.2.8 Detección de *Salmonella* mediante la tecnología ANSR en quesos de mercado.

V.2.8.1 Validación de la tecnología ANSR en queso panela y Oaxaca.

La activación de cepas se realizó suspendiendo 100 µl de *Salmonella* resistente a rifampicina en caldo soya tripticasa adicionado con rifampicina, dejándolo incubar por 24 h. Posteriormente se realizaron diluciones decimales en diluyente de peptona hasta obtener concentraciones de 10, 50 y 100 células/ml.

Se pesaron 25 g de cada uno de los quesos y se colocaron dentro de bolsas comerciales de polietileno, a las cuales se les adiciono 225 ml de caldo de enriquecimiento ANSR, a los dos tipos de queso se le inoculo 10, 50 y 100 células de cada patógeno y se mezcló en el homogeneizado peristáltico durante 1 minuto a velocidad media, posteriormente se incubaron a 35 °C por 24 h. La experimentación se realizó por triplicado.

Pasando las 24 h de incubación, el recuento de los patógenos se llevó a cabo haciendo diluciones decimales en diluyente de peptona partiendo del caldo de enriquecimiento e inoculándolo en placas de agar soya tripticaseina adicionado con rifampicina por método de extensión en superficie.

Análogamente se realizó la detección de ambos patógenos siguiendo el protocolo de NEOGEN recomendado para el equipo y tecnología ANSR.

V.2.8.2 Detección de *Salmonella* mediante la tecnología ANSR en quesos de mercado.

De las muestras tomadas de mercados públicos se porcionaron 25 g de cada queso y se añadió el caldo de enriquecimiento ANSR #2 para homogeneizarlo e incubar por 24 h a 35 °C. Posteriormente se tomaron 50 µl del caldo y disponen en los tubos de racimo con los 450 µl de buffer de lisis, el tubo debe ser calentado por 10 min a 34 – 38°C y después por 20 – 40 min a 80 – 85°C. Una vez finalizada la lisis se tomaron 50 µl de sobrenadante y se hidratan los reactivos liofilizados que son introducidos en el lector para que pueda iniciar la prueba de detección de *Salmonella*.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

VI.1 Perfil microbiano del procesamiento de queso fresco en una empresa establecida en Querétaro.

La empresa de lácteos involucrada en este estudio es una pequeña empresa dedicada a la producción de queso fresco (Oaxaca, asadero, panela, ranchero) y otros derivados lácteos. Como industria competente busca el mejoramiento continuo de sus productos, para figurar en un mercado más amplio y cada vez más exigente.

La instalación cuenta con una sola área de producción para quesos frescos aunque esta zona se encuentra subdividida de acuerdo al tipo de queso que se elabora. Al entrar a las instalaciones se ubica el área de lavado de manos, botas y mandil, posteriormente está el área de trabajo donde hay una pequeña zona exclusiva para la recepción de la leche y sus correspondientes pasteurizadores. En el área central se tienen las diferentes líneas de proceso de los diferentes productos lácteos. Las cámaras de refrigeración se encuentran divididas de acuerdo a la materia que se conserva en ellos, una es para la materia prima en uso y otra es para el producto ya terminado listo para ser liberado y expandido en tiendas de la región. El espacio donde se lava el material sucio este separado del área de empaque y de producción.

En los muestreos realizados a la empresa se llevó a cabo un análisis observacional con la finalidad de detectar aquellas posibles violaciones a las buenas prácticas de manufactura (BPM) que pudieran afectar a la inocuidad microbiana del queso fresco.

Conocer el perfil microbiológico es importante ya que nos permite corroborar o refutar las sospechas sobre las deficientes prácticas sanitarias y la posible presencia de microorganismos patógenos y/o sus toxinas. Durante el procesamiento de los alimentos existan múltiples oportunidades de contaminación con microorganismos. De ahí la importancia de que en el sistema de producción de quesos frescos o cualquier alimento existan programas con un enfoque preventivo como el de las BPM aplicadas a un proceso ya estandarizado.

A lo largo de los muestreos se colectaron un total de 300 muestras las cuales incluyeron materiales en proceso, superficies, utensilios, y producto final de los cuatro principales tipos de quesos que elabora la empresa (Oaxaca, asadero, panela, rancho).

VI.1.1 Microbiología a lo largo del procesamiento del queso Oaxaca .

Los resultados obtenidos para el recuento de los microorganismos indicadores analizados en la línea de procesamiento se encuentran condensado en la Figura 4.

En la elaboración del queso Oaxaca es inevitable una estrecha manipulación del producto. Se inicia con la cuajada de la leche para obtener una pasta desuerada que debe ser transportada directamente a la malaxadora cuyo trabajo es concederle la textura característica que poseen los quesos de pasta hilada, donde se somete al calentamiento de aproximadamente a 70 °C y trabajo mecánico que efectúa el equipo.

Hasta este punto, a pesar de que en el análisis de la leche pasteurizada con la que se elabora la pasta se obtuvieron valores bajos de BMA (<1 log UFC/ml) y OCT (<1 log UFC/ml), se puede apreciar en la Figura 4 que la pasta previa al malaxado muestra un recuento de BMA elevado pero un bajo número en OCT, esto puede deberse a la presencia y multiplicación de microorganismos inoculados como cultivo iniciador los cuales desarrollan ciertas características deseables en el queso y que se incluyen en el grupo de BMA, pero no en el de OCT.

Una vez que la pasta fue malaxada, las tiras de queso son enfriadas y porcionadas en las mesas de trabajo para que el operador las pese, le den forma a los quesos y finalmente son sometidos al empaquetado.

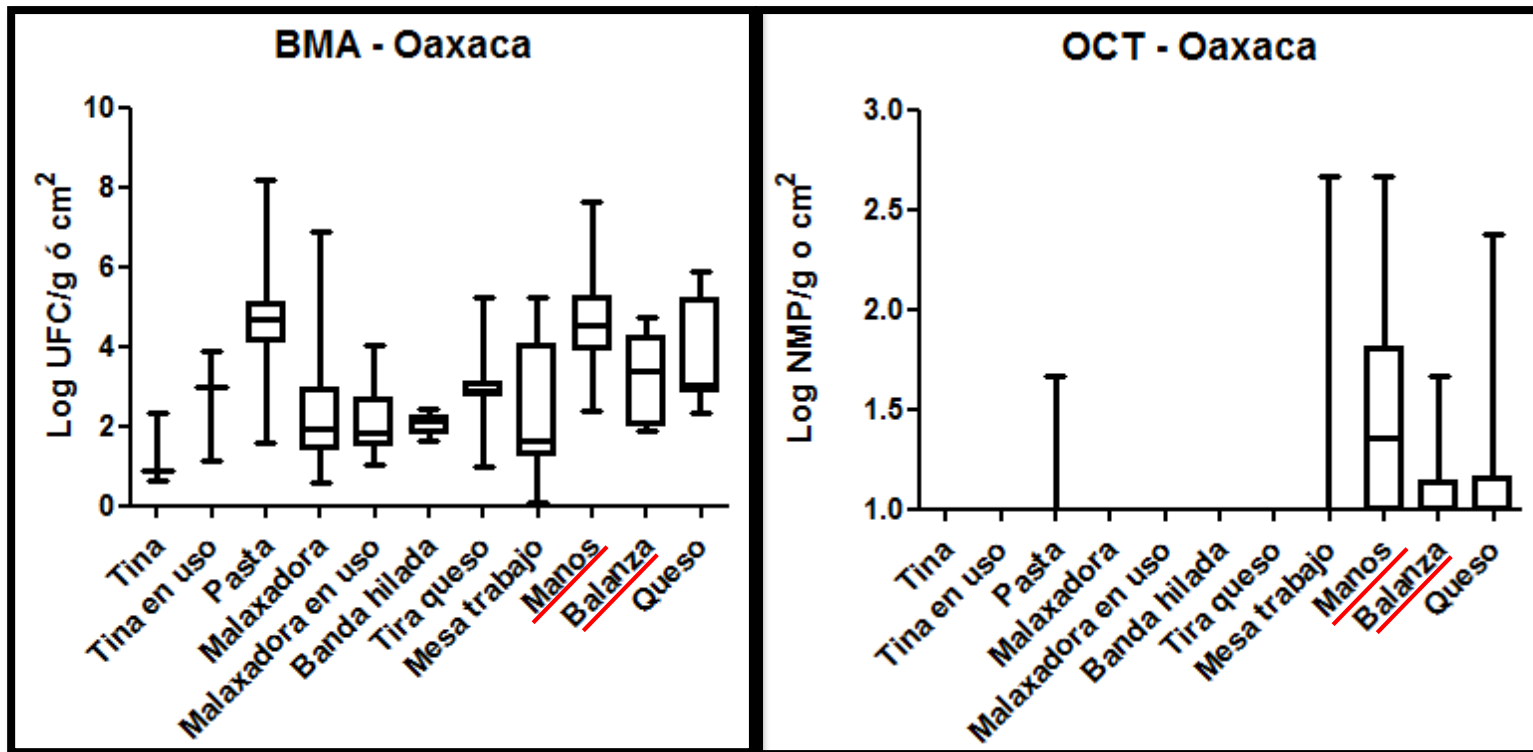


Figura 4. Contenido de BMA (A) y OCT (B) a lo largo línea de producción de queso Oaxaca. Las cajas muestran los percentiles 25, 50 y 75; y los brazos el valor mínimo y máximo. Los elementos subrayados en rojo indican muestras contaminadas con *E. coli*.

En estas etapas se observa en la Figura 4 que después del malaxado la flora disminuye significativamente, a pesar de la gran variabilidad mostrada en la pasta previo al malaxado, este tratamiento térmico es capaz de inactivar efectivamente la población bacteriana hasta lograr niveles de sobrevivientes (BMA) alrededor de 2 log UFC/g. Sin embargo después de ser pesado y manejar el producto para el empaque se observa que hay muestras donde el número de BMA es 1 log UFC/g más de elevado y una concentración de OCT que sobrepasa lo permitido por la norma oficial mexicana. Es importante mencionar que en las manos de operarios se encontraron números elevados de OCT y la presencia de *E.coli* demostrando que están expuestas a fuentes de contaminación y no se higienizan con la frecuencia o intensidad requerida. El proceso completo queda expuesto al peligro de contaminación en la mayoría de etapas, ya que el operador tiene que manejar la pasta o el queso para empaque. Por lo tanto el buen lavado de manos es indispensable para tener contacto con el producto reduciendo el riesgo de contaminación (CDC, 2002).

VI.1.2 Microbiología a lo largo del procesamiento del queso Ranchero.

En la Figura 5 se muestran los resultados del análisis microbiológico realizado a la línea de procesamiento del queso ranchero.

A diferencia del proceso de elaboración de queso oaxaca, en el ranchero no existe un proceso térmico post-pasteurización que ayude a reducir la carga microbiana que ingrese a lo largo del proceso.

Después del cuajado de la leche pasteurizada, se obtiene la pasta desuerada que es sometida a una molienda pasando por cuchillas que desmoronaran por completo el queso, aquí es donde el operario se encarga de porcionar la pasta en mesas para ir distribuyendola en anillos que le darán forma a las distintas presentaciones del producto final.

En la Figura 5 se observa que la pasta tiene un elevado número de BMA y OCT lo que nos indica que el producto está siendo expuesto a fuentes de contaminación. A lo largo de los muestreos se pudo observar que en algunas

ocasiones la pasta era mezclada con recortes de otros quesos que habían sido almacenados y todo era molido para obtener la pasta muestreada. Por otra parte el análisis de utensilios para la elaboración de este queso también muestran en algunos casos números elevados de microorganismos tal y como se observa en la Figura 5 donde el anillo en uso mostró hasta 5 log de BMA y 2 log de OCT, sin embargo la pasta y el producto final tienen una carga de microorganismos más elevada y similar, pudiendo ser la fuente de aporte microbiano y los residuos en los utensilios y manos pueden provenir de la pasta.

Una vez que se obtiene el queso moldeado, este se dispone en charolas de acero inoxidable y es llevado a las cámaras de refrigeración para escurrir el suero restante del queso. Pasando esta etapa el queso es llevado al área de empaque.

En algunas charolas que fueron analizadas se encontraron números elevados de BMA's y aunque los OCT eran bajos, hubo presencia de *E. coli* en algunas muestras. Evidentemente también se encontró *E. coli* en la pasta para moler y en queso listo para empacar.

VI.1.3 Microbiología a lo largo del procesamiento del queso panela.

En la Figura 6 se muestran los resultados del análisis microbiológico realizado a la línea de procesamiento del queso.

El procesamiento del queso panela comienza partiendo de una pasta cuajada elaborada con leche pasteurizada, pasando por un proceso de desuerado hasta obtener una masa drenada y firme lista para ser moldeada por el operario.

Una de las partes tradicionales o distintivas de este queso es su forma que adquiere al momento de ser moldeado. El tipo molde clásicamente tiene forma de canasto y suele ser de plástico, es importante mencionar que posee perforaciones pequeñas que facilitan el drenaje del suero. Ya que se tiene la porción indicada, el queso es prensado manualmente. Los moldes se disponen en charolas de metal y son enviados a reposar en la cámara de refrigeración para que después sean sometidos al empaquetado.

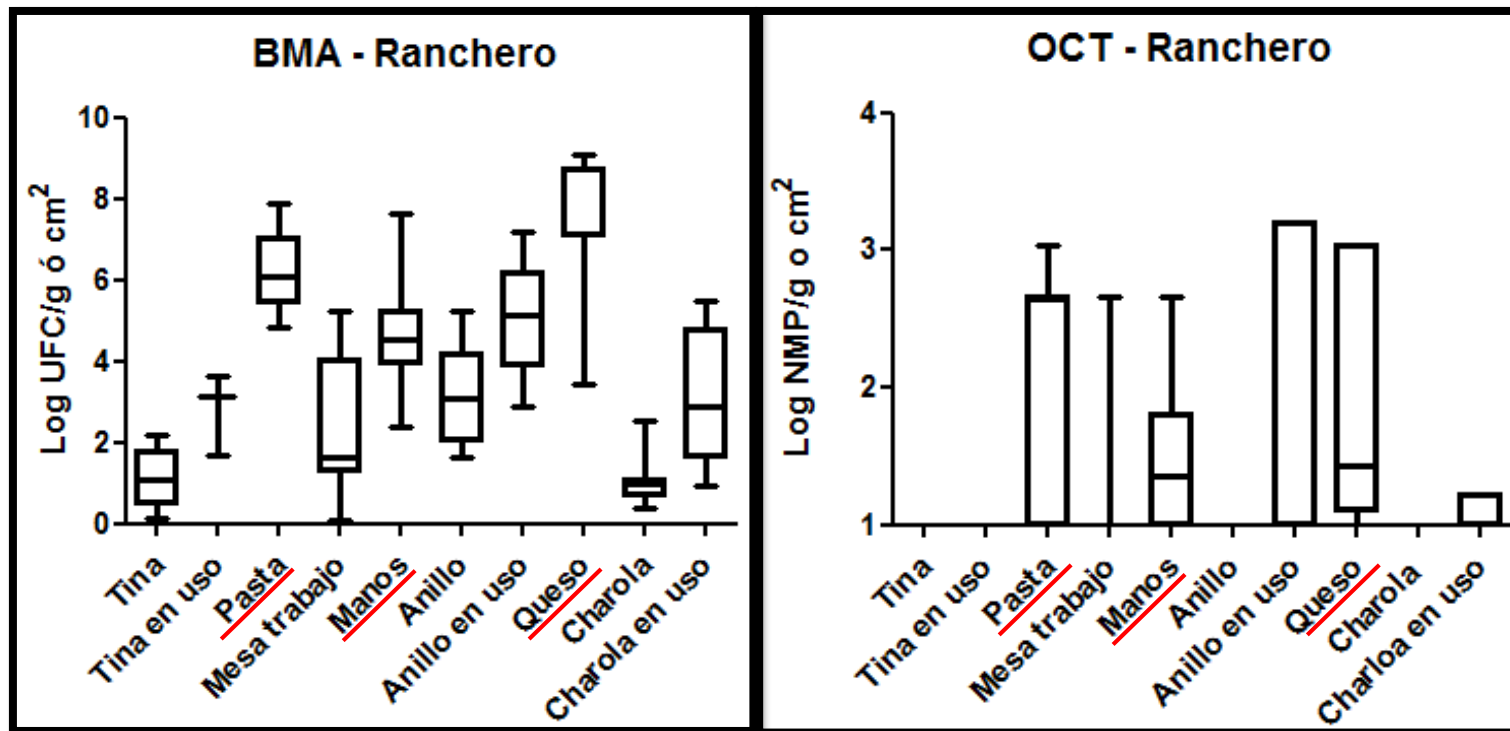


Figura 5. Recuento de grupos indicadores BMA (A) y OCT (B) en línea de producción de queso Ranchero. Las cajas muestran los percentiles 25, 50 y 75; y los brazos el valor mínimo y máximo. Los elementos subrayados en rojo indican muestras contaminadas con *E. coli*.

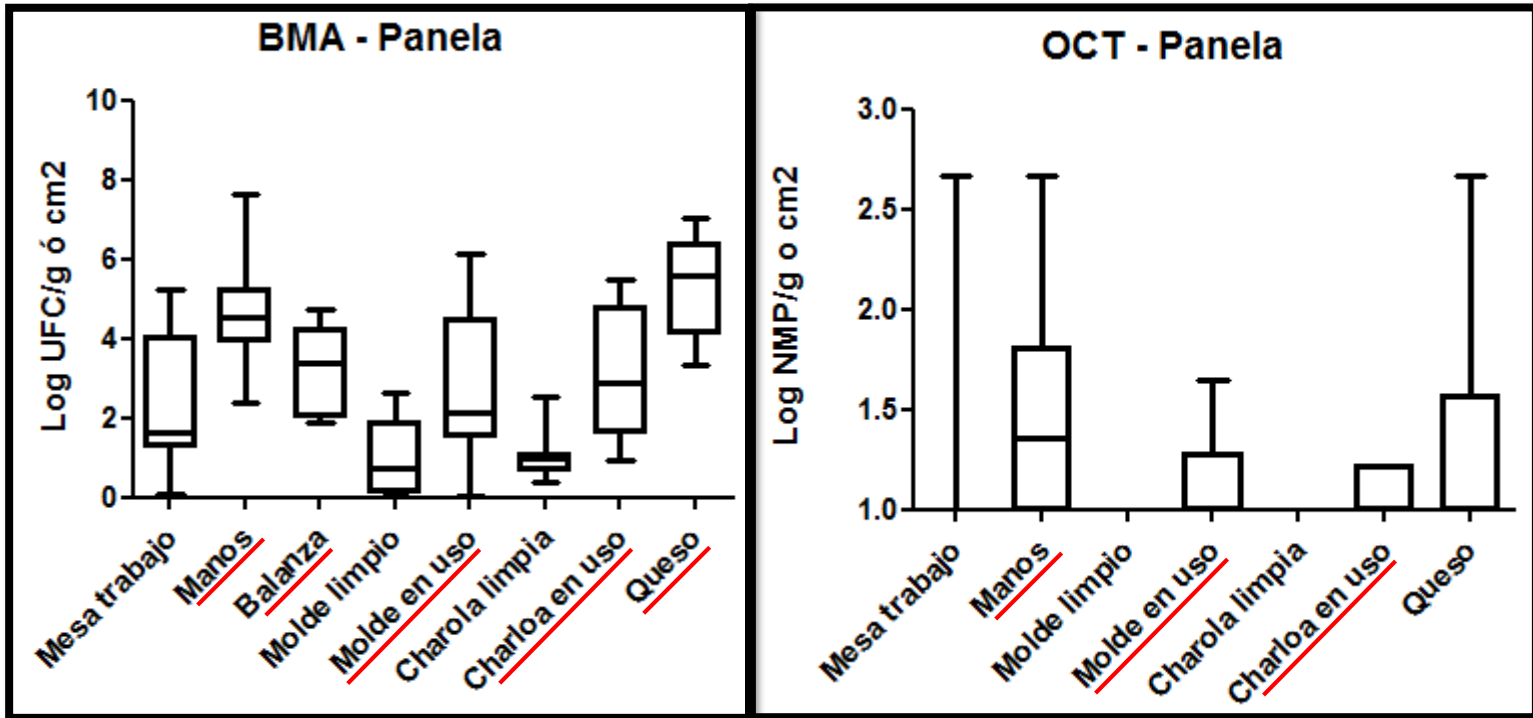


Figura 6. Recuento de grupos indicadores BMA y OCT en línea de producción de queso panela. Las cajas muestran los percentiles 25, 50 y 75; y los brazos el valor mínimo y máximo. Los elementos subrayados en rojo indican muestras contaminadas con *E. coli*.

En la Figura 6 se puede observar que algunos moldes en uso tuvieron un recuento de BMA y OCT elevado, al igual que se encontró *E. coli*. El lavado de los moldes era complicado ya que el plástico duro presentaba orificios muy pequeños y en ocasiones partículas de masa quedaban atrapadas en los orificios. El encargado de lavar los utensilios debe verificar que cada uno quede correctamente lavado y no presente residuos de queso. Sin embargo, esta inspección es visual y por tanto subjetiva.

Por otra parte se observó que una etapa de prensado se hacía a temperatura ambiente, pudiendo favorecer la proliferación de microorganismos indeseables en el producto final. A pesar de que la pasta tenga menor contenido acuoso y sea menos susceptible al deterioro microbiano que la leche, sigue siendo un medio nutritivo e ideal para el desarrollo de microorganismos. En un molde se encontró *Salmonella*.

Se debe tomar en cuenta que tampoco existe un proceso térmico después de la pasteurización en elaboración de este queso que permita inactivar los patógenos que ingresen durante el proceso. La presencia de patógenos en el queso representa un peligro para el consumidor, dado que el queso es comercializado como un alimento listo para consumo.

VI.1.4 Microbiología a lo largo del procesamiento del queso Asadero.

El queso asadero tiene una gran semejanza con el queso Oaxaca tanto en su proceso de elaboración como en sus características, sin embargo a diferencia del Oaxaca, el contenido de humedad es mayor (Aguado, 1999) y la presentación final es en bloques, mientras que el Oaxaca se presenta regularmente trenzado. En la Figura 7 se muestran los resultados del análisis microbiológico realizado a la línea de procesamiento del queso.

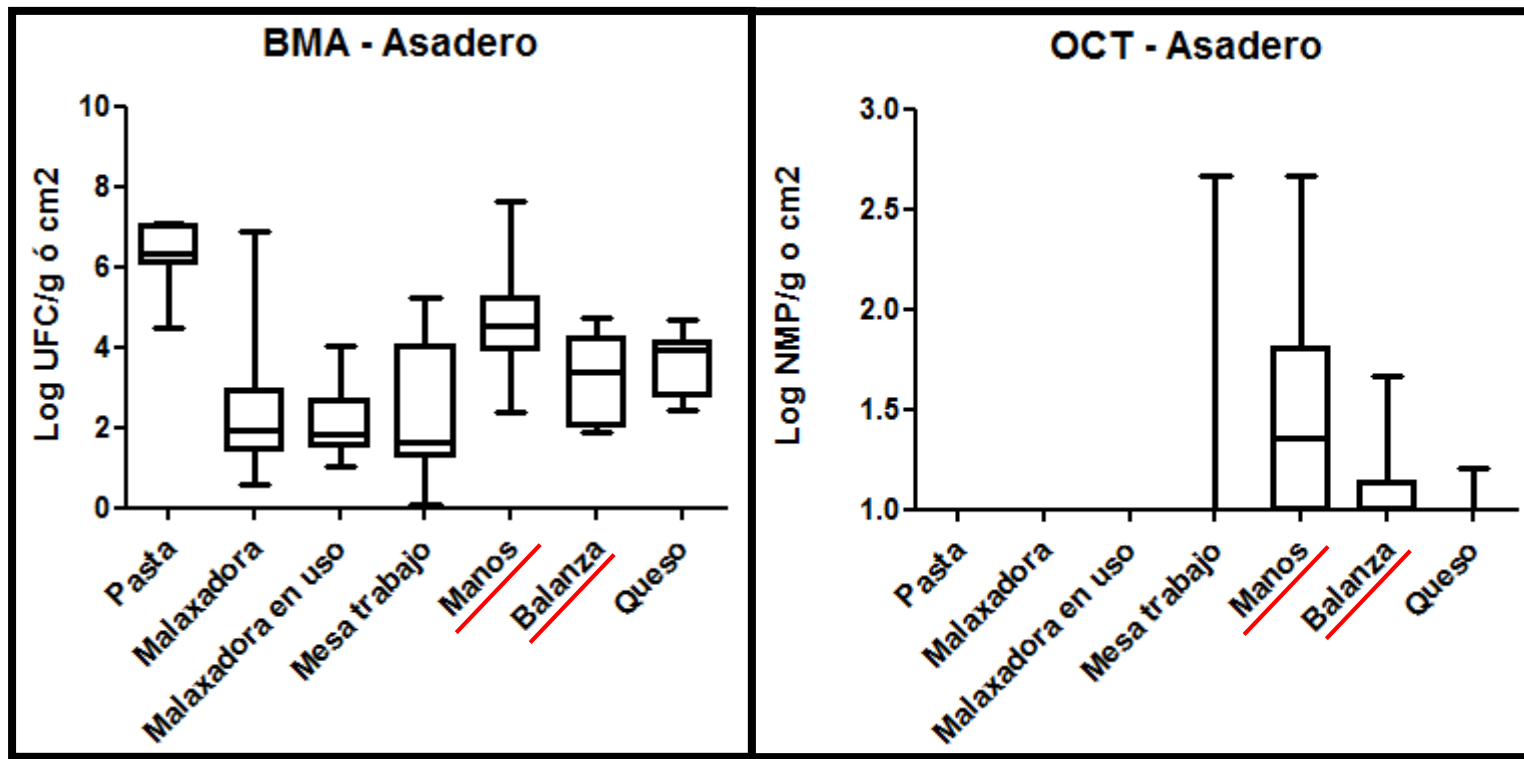


Figura 7. Recuento de grupos indicadores BMA y OCT en línea de producción de queso Asadero. Las cajas muestran los percentiles 25, 50 y 75; y los brazos el valor mínimo y máximo. Los elementos subrayados en rojo indican muestras contaminadas con *E. coli*.

En el proceso de elaboración cuando se obtiene la pasta cuajada de leche pasteurizada, esta es sometida a un proceso de calentamiento para obtener (al igual que el queso Oaxaca) las características de elasticidad.

Como se puede observar en la Figura 7, la pasta previa a ser malaxada tiene un número elevado de BMA's y un bajo recuento de OCT, esto al igual que el queso Oaxaca se puede explicar debido al recuento de cultivo iniciador que es añadido intencionalmente.

Una vez que la pasta se sometió al calentamiento, se debe porcionar sobre la mesa para ser enfriado, darle forma de bloque y posteriormente pesarla para enviarla al área de empaquetado.

Notoriamente se observa en la Figura 7 que los OCT ingresan al proceso y alimento final después del malaxado, provenientes de manos, y superficies de los equipos, aunque es en bajos números. El producto final cumple con lo requerido por la norma mexicana en cuanto a microorganismos indicadores y muestra la menor variabilidad en el contenido microbiano comparado con los otros tipos de quesos; sin embargo en uno de los quesos se encontró *Salmonella*.

A pesar de que el queso tenga la característica de ser fundente y se acostumbre darle un tratamiento térmico para realizar platillos gratinados o aportar suavidad a ciertas preparaciones calientes antes de comerlo, es inaceptable la presencia de patógenos en el producto final, ya que existe el riesgo de que el queso sea consumido sin tratamiento adicional como una botana o aperitivo, generando un riesgo para el consumidor.

VI.1.5 Microbiología en otros puntos de muestreo importantes de la empresa.

En la Figura 8 se muestran los resultados del análisis microbiológico realizado en puntos de muestreo adicionales a los procesos de producción de quesos.

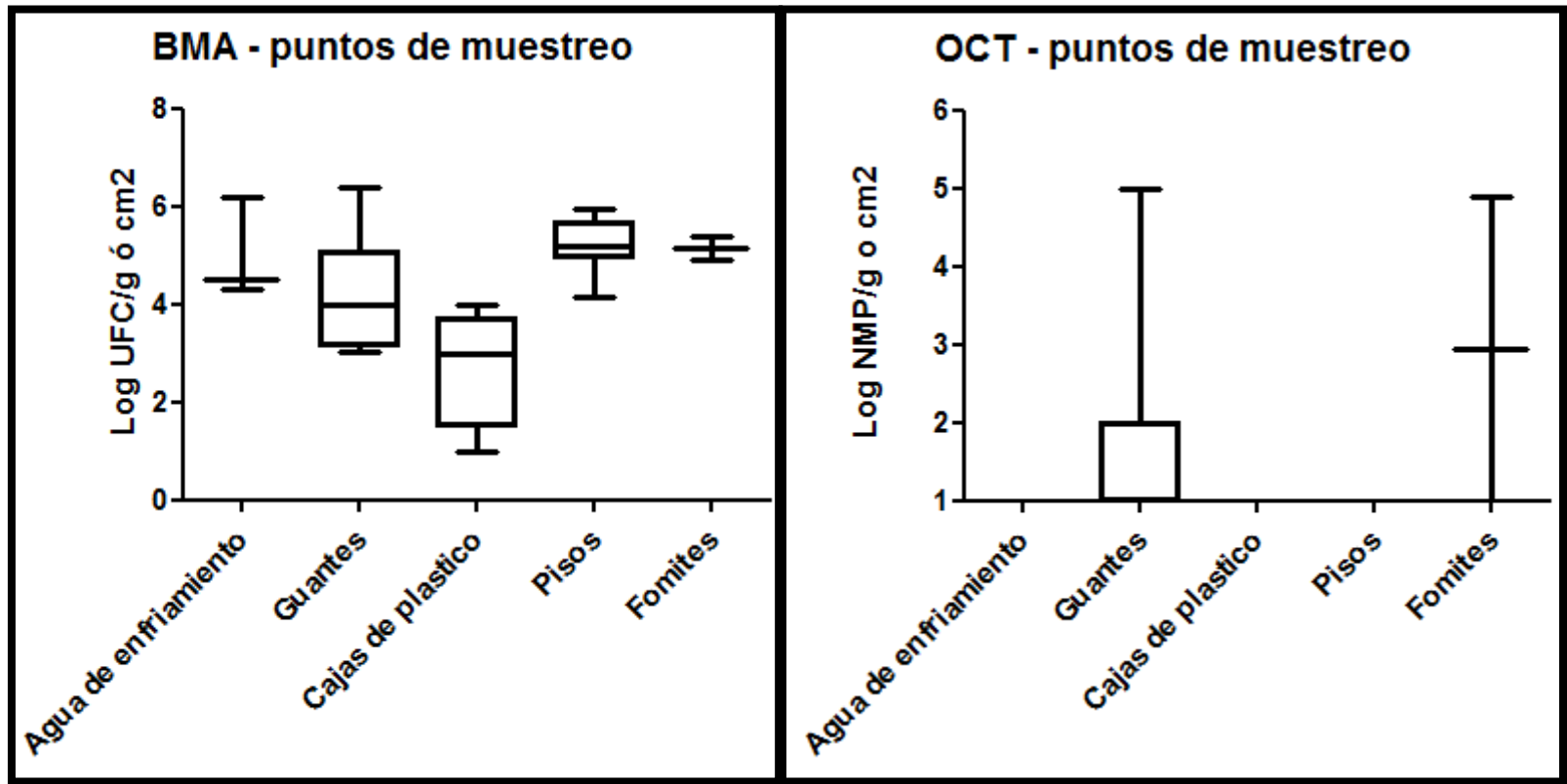


Figura 8. Recuento de grupos indicadores BMA y OCT en puntos adicionales a las líneas de producción de queso.

A lo largo del procesamiento de quesos en la empresa se pudieron observar prácticas que favorecen la contaminación y proliferación de microorganismos.

Por una parte se observó que la leche pasteurizada no representaba algún problema ya que cumplía con los límites de microorganismos permitidos por la norma y no se detectaron patógenos. Aunque se han encontrado cepas de *Salmonella* y *L. monocytogenes* resistentes al calentamiento entre 60 y 67.5 °C en leche (D'Aoust et al, 1987) se ha comprobado que a 72°C por 15 s puede llegar a destruirlos (Bradshaw et al, 1985), la empresa utiliza temperaturas por encima de 68 °C.

Es inevitable que el queso no sea manipulado por los operarios, aunque la planta es semi-tecnificada hay etapas que requieren de la mano del operador. Desafortunadamente en los muestreos se pudo apreciar que no existía algún protocolo adecuado para lavado de manos, mostrando un contenido variable en OCT. De igual manera el uso de guantes será una fuente de contaminación si estos no son bien lavados y se manipula la pasta de queso caliente o moldeo de queso rancho.

Cuando los quesos fundentes (Oaxaca y Asadero) son elaborados la pasta es malaxada e inmediatamente se somete al agua de enfriamiento, la cual es reutilizada para enfriar todos los quesos. En la Figura 8 se observa que en aguas de enfriamiento el número de BMA's es alto y desafortunadamente se encontró *E.coli* en 3 muestras. Si por algún motivo hay un queso contaminado y toca el agua de enfriamiento, existe la probabilidad que los siguientes quesos sean contaminados por el agua, incluso la misma agua puede ser una fuente de contaminación si esta no es purificada antes de usarse. Otro factor a desventaja es que el agua se evacua directamente por el piso hasta que llegar al sistema de drenaje. Lo ideal es contar con un sistema y zona exclusiva para desechar el agua de enfriamiento.

El piso del área de trabajo presentaba grietas e irregularidades que pueden propiciar la persistencia de microorganismos y afectan la eficiencia de los procesos de limpieza y desinfección. Cabe mencionar que la limpieza general se hacia todas

las mañanas al comienzo del primer turno de trabajo, permitiendo que aquellas áreas que quedaron impregnadas de suero, agua o salpicadura de leche del día anterior exista un desarrollo de microorganismos y permanezca ahí en caso de que la limpieza no sea exhaustiva por las mañanas.

En algunas ocasiones cuando los utensilios o mesas eran lavados se secaban con franelas que también usaban para secarse las manos, en la Figura 8 se observa que hay alrededor de 6 logaritmos de BMA's y OCT's indicándonos que es una posible fuente de contaminación o propagación de microorganismos en las superficies que tenga contacto. El uso de franelas no se recomienda en la producción de alimentos y puede ser sustituido por toallas de papel desechables.

Si la empresa no cuenta con estandarización de protocolos para realizar las actividades cotidianas es evidente que a pesar de estar trabajando con leche pasteurizada la reincidencia de microorganismos patógenos post-pasteurización sea factible debido a la combinación de distintos puntos de contaminación en el proceso, afectando la inocuidad del producto final.

VI.2 Detección de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en queso fresco producido en una empresa

La presencia de *Salmonella* y *L. monocytogenes* fue investigada en 300 muestras compuestas de queso, utensilios, manos, pisos, y herramientas. *Salmonella* se encontró en 4 muestras: dos de producto final, una de manos y una de molde. La identificación de los patógenos se realizó mediante pruebas bioquímicas y una prueba de PCR de punto final que emplea iniciadores dirigidos al gen *InvA* (Figura 9).

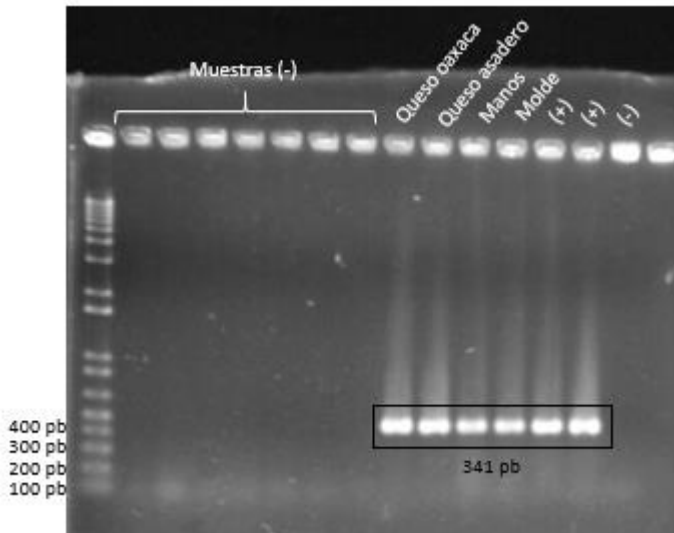


Figura 9. Confirmación de cepas de *Salmonella* por PCR. En el primer pozo se muestra el marcador de peso molecular. A partir del pozo 8 se observan las bandas correspondientes al producto de amplificación esperado (341 pb).

La presencia de *Salmonella* en manos implica un riesgo para todas las etapas en la elaboración de quesos debido a la necesaria manipulación de producto, incluso el contacto con el queso listo para ser empacado es crítico ya que se realiza sin guantes permitiendo obtener un producto final contaminado. Por otra parte un molde de queso panela también estaba contaminado con el patógeno, lo que implica una mala higienización del material pudiendo reincidir en la contaminación de más quesos si éstos no son bien lavados y desinfectados. Dos productos finales estaban contaminados con *Salmonella* manifestando la necesidad de estandarizar los protocolos de higienización general de la empresa que permita eliminar la presencia del patógeno.

Listeria monocytogenes no fue detectada en ningún material bajo técnicas tradicionales y PCR a lo largo de los muestreos en la empresa.

Alessandria *et al.*, en el 2010 realizaron muestreos periódicos a una empresa productora derivados lácteos y queso fresco. En el estudio se analizó la incidencia *L. monocytogenes*, sin embargo ninguna de las muestras se evidenció el patógeno utilizando las metodologías recomendadas por la ISO 11290.

Normalmente para las empresas de lácteos es difícil eliminar este patógeno cuando el equipo para producir el queso es grande, de un lavado difícil, que propicie la persistencia el desarrollo y la propagación del patógeno. Lo que se recomienda es tener equipos sencillos, fáciles de desarmar para su limpieza y que todas las superficies planas donde se trabaja el queso sean de acero inoxidable, evitando grietas y facilitando el lavado (Kousta, 2010).

Es importante mencionar que en la empresa de Querétaro se utiliza un coctel de BAL que se inoculan en la leche pasteurizada para producir características deseables en el producto final. Las superficies donde se trabaja el queso son de acero inoxidable, los equipos como la malaxadora, las tinas de desuerado y empaquetadoras son de tamaño mediano, de superficie lisa y fáciles de lavar. El contacto con el ambiente exterior (como posible fuente de contaminación) es escaso ya que se debe entrar por el área de limpieza personal, la leche es transportada de la pipa a los pasteurizadores mediante mangueras y las materias primas son supervisadas para que lleguen en buen estado. La combinación de todos estos factores puede explicar la ausencia de *L. monocytogenes* en la planta, sin embargo el recuento de microorganismos indicadores y presencia de *Salmonella* demuestran que aún hay puntos débiles sobre los cuales se debe de trabajar.

VI.3 Perfil microbiano e incidencia de *Salmonella* en quesos comercializados en mercados.

En México una forma de venta de alimentos como queso fresco se realiza en mercados establecidos o sobre ruedas, donde los quesos se exhiben sobre puestos removibles para su venta (Montañez *et al*, 2006). Muchos de estos quesos producidos artesanalmente son populares entre los consumidores ya que prefieren estos quesos por su microbiota natural que concede olores y sabores deseables (Vitella *et al*, 2011).

En la Figura 10 se observa que el contenido de BMA fue muy superior en contraste con los quesos de la empresa semi-tecnificada, indicándonos la obvia exposición a fuentes de contaminación.

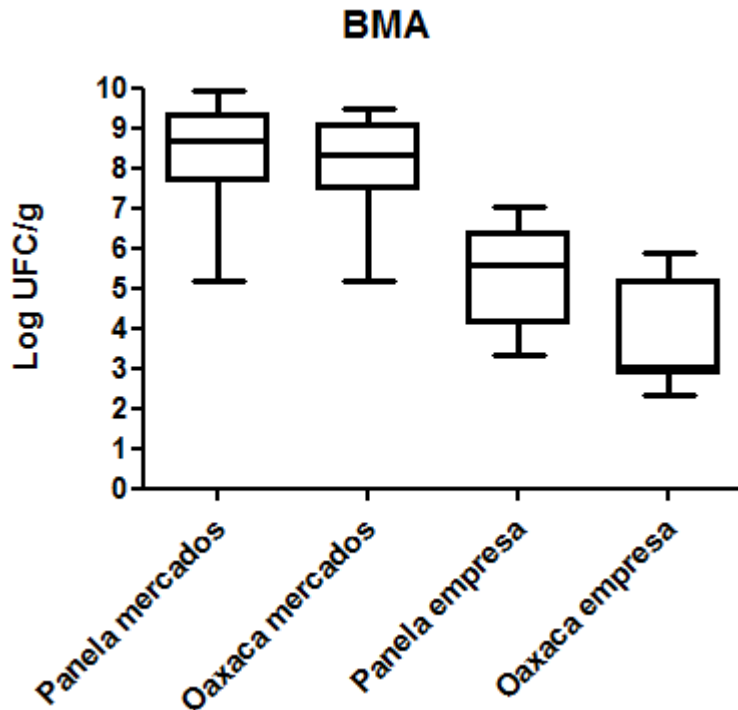


Figura 10. Recuento de BMA's en Queso panela y oaxaca expendidos en mercados de la ciudad.

En 64% de las muestras se encontró *E.coli* y 9% estaban contaminadas con *Salmonella*.

Los resultados de este análisis resaltan el riesgo por consumo de queso. Vitela *et al.*, 2011 encontraron 20% muestras de queso fresco expandido en mercados contaminadas con *Salmonella*. Ellos mencionan que las condiciones que manejan los proveedores son antihigiénicas y el manejo del queso por los vendedores finales promueve el ingreso y desarrollo de patógenos. Generalmente los quesos frescos comercializados en mercados en nuestro país son artesanales, por tanto podrían producirse a partir de leche cruda o mezclas de leche pasteurizada en su elaboración, malas prácticas de manufactura, deficiente cadena de frío durante el transporte y comercialización (López, 2000; Motañez, 2006).

Lo que se observó en los muestreos realizados en la ciudad de Querétaro fue que la temperatura promedio a la que el queso se mantiene en las vitrinas de exhibición es de 17 °C. Normalmente el queso suele venderse a granel y el comerciante continuamente está retirándolo de la vitrina para pesarlo y venderlo al cliente. Esto promueve que el queso se exponga a temperatura ambiente y su refrigeración no sea continua. Inclusive en varios de los puestos el queso se dispone en vitrinas que carecen de sistema de refrigeración o el vendedor suele dejar el queso afuera ya que el flujo de clientes es muy frecuente y le facilita atender al consumidor con mayor rapidez. La exposición a temperaturas superiores a 7°C promueve el desarrollo de microorganismos patógenos en el producto.

La logística de algunos mercados es imprudente ya que los puestos no estaban distribuidos por categorías y se encontraban los negocios mezclados sin importar las desventajas que podría figurar para la inocuidad de los alimentos. En algunas ocasiones la venta de queso fresco se encontraba rodeada de negocios que expendían carne fresca a temperatura ambiente (típico mostrador sin refrigeración) favoreciendo la atracción de moscas. No obstante hay estudios donde se demuestra que las moscas pueden ser transmisoras de patógenos a través de su superficie corporal, regurgitación de comida y defecación en alimentos (Quiceno *et al.*, 2010).

Otra circunstancia que se observó fue la venta de quesos frescos, carnes frías y/o carne fresca en el mismo local comercial. Se pudo observar las malas prácticas por parte de los trabajadores que carecían de capacitación ya que varios de los utensilios tenían contacto con las carnes y el queso fresco sin pasar por un proceso de lavado y desinfección, propiciando contaminación cruzada entre los alimentos. Incluso trabajadores que estaban porcionando carne se limpiaban las manos con trapos y tomaban el queso para atender el pedido del cliente, contaminando los microorganismos presentes en la carne cruda, los del trapo y los del dinero cuando tampoco se lavaban las manos al cobrar, directamente al queso.

Por otra parte la presencia de materia extraña en el queso fresco de mercado como pelo y virutas de metal indica el pobre mantenimiento del equipo con el que se realizan los quesos e incluso las malas prácticas de manufactura por parte de los trabajadores que posiblemente no usaron cofia durante su elaboración y/o comercialización.

En México la regulación por parte de secretaria de salud para la producción y venta de queso fresco es muy limitada ya que solo existen anteproyectos que sugieren BPM para algunos tipos de quesos mexicanos, los reportes por brotes de queso en el país son de poca cobertura o aislada y las autoridades no suelen inspeccionar la producción y comercialización del queso expandido en mercados (Béltran *et al.*, 2014).

VI.3.1 Validación de tecnología ANSR en queso fresco.

VI.3.1.1 Recuento de *Salmonella* resistente a rifampicina utilizando caldo de enriquecimiento ANSR en quesos (oaxaca y panela) y detección con el equipo ANSR.

Se evaluó el desarrollo de *Salmonella* en el queso fresco (Oaxca y panela) enriquecido en el caldo ANSR #2 para verificar que la concentración final en el caldo ANSR es suficiente para que el equipo lo pueda detectar, ya que el límite inferior de detecciones de 4 log UFC/g.

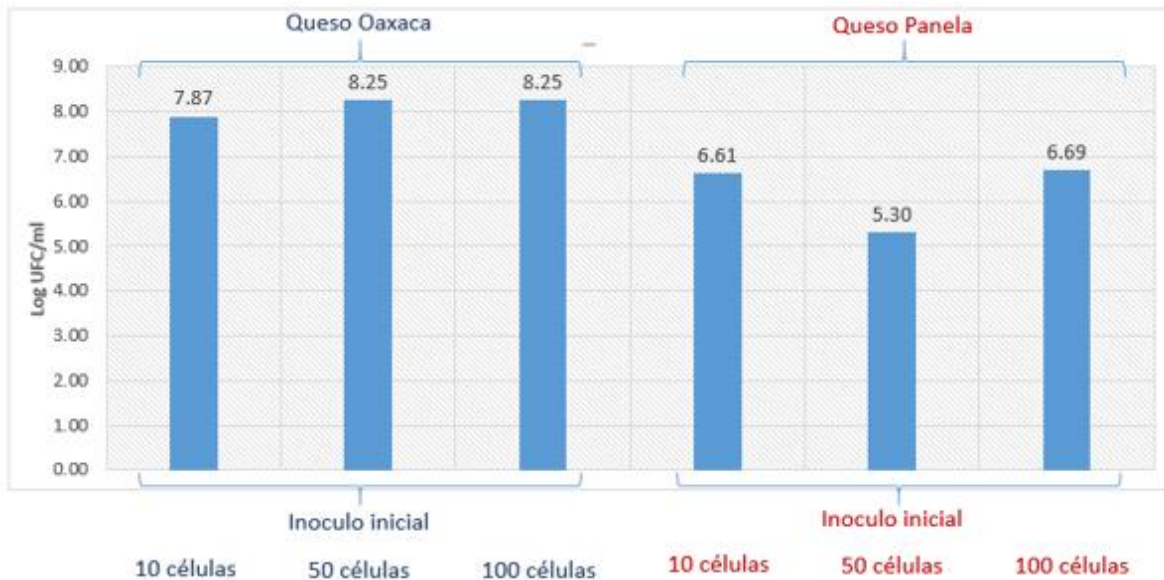


Figura 11. Recuento de *Salmonella* en queso fresco después de utilizar caldo de enriquecimiento ANSR #2 incubandolo por 24 h a 35 °C.

En la Figura 11 se puede observar que durante el enriquecimiento del queso Oaxaca y panela, *Salmonella* es capaz de alcanzar 8 log UFC/g y alrededor de 6 log UFC/g respectivamente. Es importante mencionar que los quesos fueron obtenidos de un supermercado y mostraron un contenido de 5 log UFC/g de BMA en queso Oaxaca y 8 log UFC/g en panela. El nivel de la flora asociada en el queso panela, podría estar inhibiendo el desarrollo del patógeno. El experimento se realizó por triplicado, en la mayoría de los casos el patógeno fue detectado, aún cuando se inocularon 10 células solo en 1 caso no se pudo detectar.

VI.3.1.2 Detección de *Salmonella* en quesos de mercados mediante la tecnología ANSR.

En la Figura 12 se puede observar que el número de muestras que detectó la tecnología ANSR fue más alta que las que se detectaron por metodología tradicional.

Sin embargo solo una muestras positiva coincidió entre ambas técnicas.

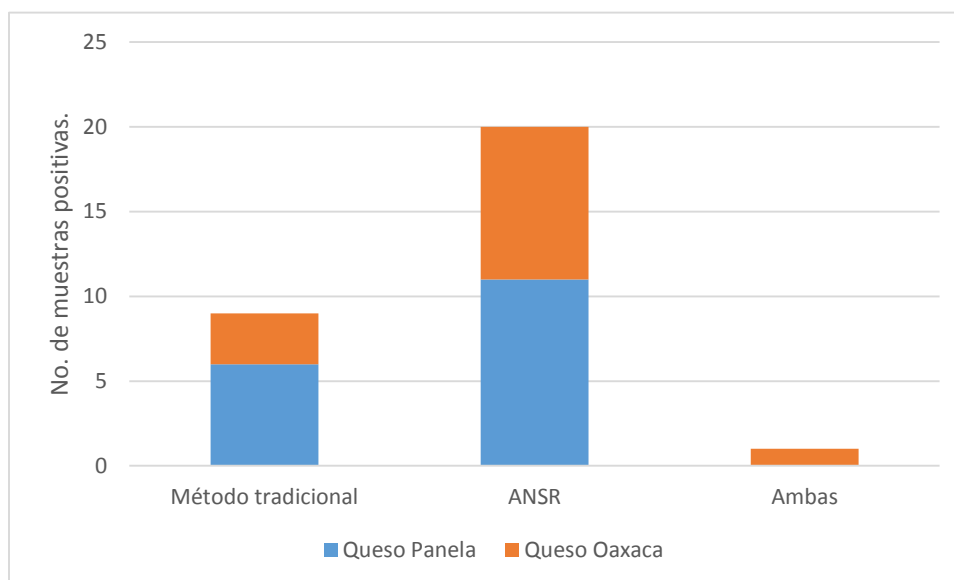


Figura 12. Muestra número de muestras positivas utilizando la tecnología ANSR, metodología tradicional y un contraste entre ambas técnicas.

De acuerdo a los parámetros definidos en la ISO 16140:2003 para validar métodos alternativos en el análisis de microorganismos en alimentos se debe realizar el cálculo de sensibilidad relativa (RS), especificidad relativa (RE) y precisión relativa (RA) tal y como se detalla en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Sensibilidad (RS), especificidad (RE) y precisión relativa (RA) de la detección de *Salmonella* a partir de queso Oaxaca y panela mediante ANSR.

Matriz	PA*	NA*	ND*	PD*	Sum N	RA (%) (100*(PA+ND))/N	N+ = PA +ND	RS (%) (100*PA)/N+	N- = NA + PD	RE (%) (100+NA)/N-
Oaxaca	1	39	2	8	50	80%	3	33%	47	82.9%
Panela	0	33	6	11	50	66%	6	0%	44	75%

*PA = resultados positivos por ambas técnicas

*NA = resultados negativos por ambas técnicas

*ND = resultados positivos por método de referencia pero negativos por método alternativo

*PD = resultados positivos por métodos alternativo pero negativos por método de referencia

*N+ = PA sumado a ND

*N- = NA sumado a PD

Se puede observar en el cuadro 7 que la técnica es poco específica y sensible de acuerdo a los parámetros calculados ya que hubo poca concordancia con el método de referencia.

En el primer protocolo proporcionado por la empresa se recomendaba la homogenización de los reactivos y la muestra lisada mediante la acción de la pipeta al succionar y soltar el sobrenadante de la muestra lisada en el tubo liofilizado, esto promovía la contaminación de las otras muestras que estuvieran en el mismo canal (Caballero *et al*, 2015). Posteriormente se incluyó la homogenización con vortex en este paso. Aproximadamente 40 muestras de queso se trabajaron sin esta modificación

También se pudo observar que al momento de hacer la lisis, los tubos en tira deben ser calentados a 80°C sin embargo, estos no cuentan con alguna tapa que selle el contenido cuando están siendo utilizados y claramente al final de la lisis se observa la condensación del vapor producido por el calentamiento en la parte superior del tubo. La distancia entre cada tubo es de sólo unos milímetros, lo que puede propiciar la contaminación de los demás tubos cuando se está haciendo la lisis.

Adicionalmente Tan *et al*, 2008., observó que la tecnología de amplificación enzimática mellada por sus siglas en inglés NEAR que es la base del equipo ANSR puede ser una excelente alternativa para la detección de patógenos, pero existe la probabilidad de generar amplificaciones no específicas que generen fluorescencia pudiendo originar cierto número de resultados falsos positivos. Como se detectó en la comparación realizada en este trabajo.

Después de analizar el recuento de microorganismos indicadores en los quesos de mercado cabe la posibilidad de hacer un contraste entre las muestras que estaban naturalmente contaminados (que presentaban un promedio de 9 log de BMA's) con cepas que pudieron estar estresadas o con daño subletal y los quesos de la validación (que presentaron entre 8 y 5 log) cuya *Salmonella* estuvo activa en caldo soya tripticasa, representando un trabajo difícil para el caldo ANSR de recuperar en 24 horas aquellas células del patógeno que estaban naturalmente en

queso y con flora asociada abundante. Una posible solución es añadir algún reactivo que inhiba la presencia de la flora asociada y/o extender el enriquecimiento haciendo una resiembra que permita recuperar al menos los 4 log de células durante el enriquecimiento para que el equipo logre detectarlo. Aunque el tiempo se extendería, podría seguir siendo una buena alternativa ya que el método tradicional puede durar hasta 6 días para confirmar la presencia del patógeno.

VI.3.2 Detección de *Salmonella* mediante qPCR en quesos frescos.

VI.3.2.1 Validación de una técnica de qPCR cualitativa en quesos frescos.

En esta valoración se partió de queso fresco inoculado con distintos niveles de células de *Salmonella* para conocer el límite de detección, es importante dado que en los alimentos los patógenos generalmente se encuentran en bajas concentraciones (FAO, 2004).

Las extracciones de DNA se realizaron con el kit power food (Mo-Bio) y la pureza fue medida con el espectrofotómetro, todas las muestras tenían valores de 1.7 a 1.9 en absorbancia de 260/280 nm.

En el qPCR se puede apreciar la amplificación en tiempo real en la Figura 13, donde las muestras inoculadas con 10^8 células tienen valores Ct de 23 y 24, las muestras con 100 células tienen un Ct de 26 y las de 10 células un Ct de 27; es importante analizar las curvas de disociación para verificar que los productos sean específicos. En la Figura 14 se puede observar que las curvas a partir de las muestras inoculadas son específicas de *Salmonella*, y el límite de detección es de 10 células previo al preenriquecimiento.

A 75°C se aprecian curvas en las muestras de control negativo, los cuales se deben a la formación de dímeros de los iniciadores (Eurogentec, 2013). Para corroborar esta información se realizó una electroforesis en gel de agarosa para analizar si al revelarlo hay presencia de bandas que no correspondan al patógeno. Se observó que en las muestras negativas no hubo amplificación pero en la parte inferior se aprecian los dímeros de los iniciadores.

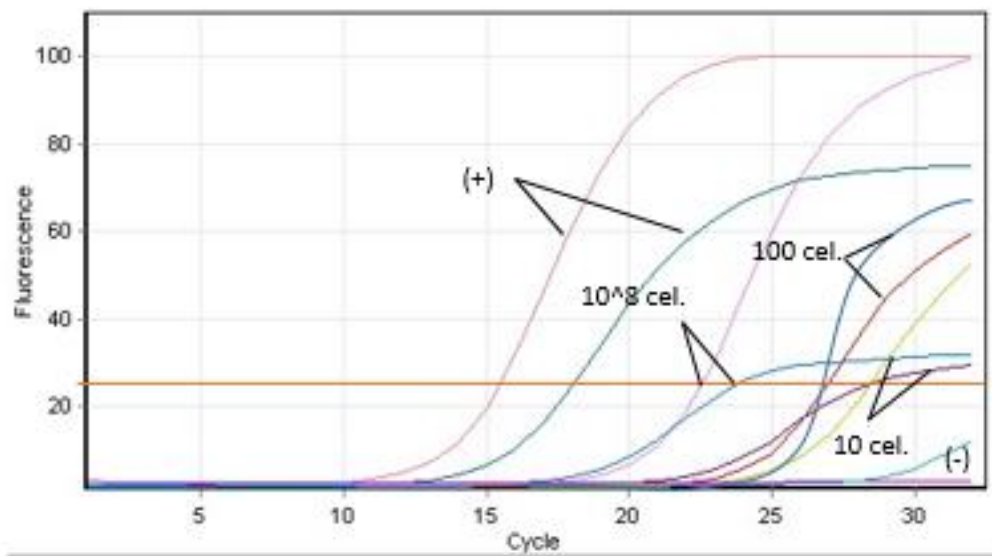


Figura 13. Curvas de amplificación de qPCR para muestras de queso fresco inoculadas con 10^8 , 100 y 10 células, preenriquecidas e incubadas por 24 h a 35°C .

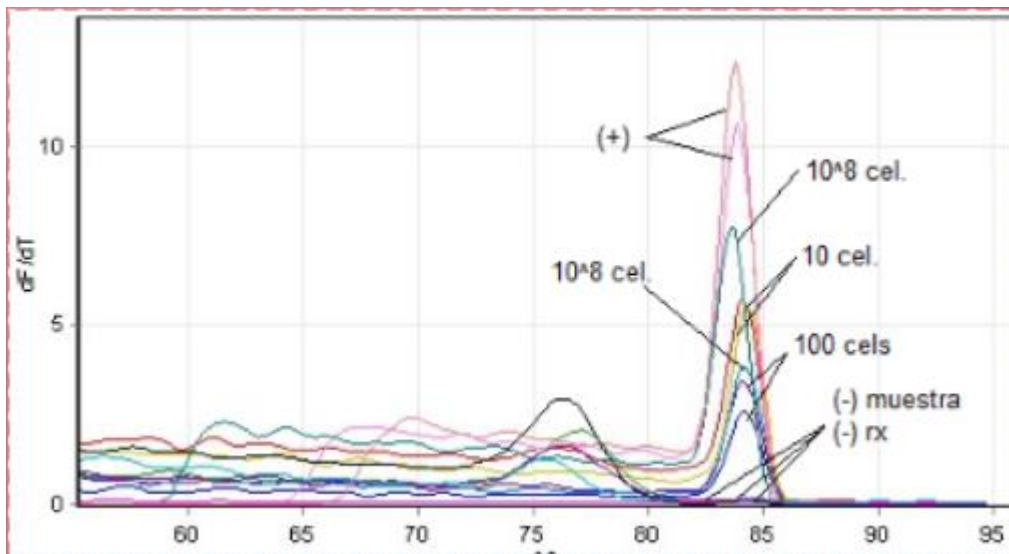


Figura 14. Curvas de disociación de productos de amplificación a partir de queso inoculado y preenriquecido.

En la Figura 15 se muestra que no hubo alguna banda que no corresponda a *Salmonella* y que la presencia de los dímeros de primer genera fluorescencia aunque no aparezca alguna banda específica en el gel.

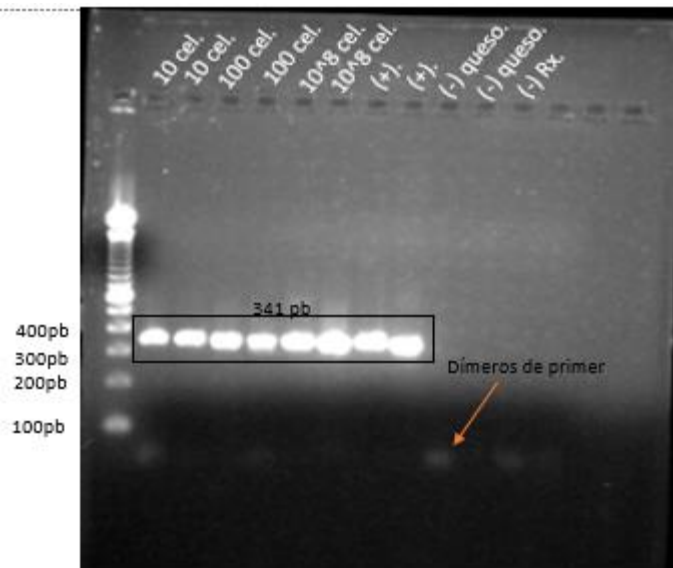


Figura 15. Productos obtenidos de qPCR a partir de muestras inoculadas (primeros 8 carriles) y las muestras negativas que generaron curvas inespecíficas (carriles 9-11).

Csordas *et al*, 2004 detectaron *Salmonella* mediante la técnica de qPCR utilizando SYBR Green y distintos pares de iniciadores con la finalidad de analizar cuál era el mejor. Encontraron que los iniciadores dirigidos al gen *invA* generaron una curva de disociación cercana a los 75°C y otra a los 85°C, fundamentando que la de 75°C era debido a la formación de dímeros de los iniciadores. Una posible solución para eliminar la formación de dímeros fue la reducción de la concentración de iniciadores en la mezcla de reacción.

VI.3.2.2 Detección de *Salmonella* por qPCR en muestras de quesos de mercado.

Una vez validada la técnica, se utilizó para detectar *Salmonella* a partir de queso comercializado en mercados. Simultáneamente se llevó a cabo la detección por cultivo (método tradicional).

En 9 de 100 muestras de queso (3 - Oaxaca y 6 - panela) analizadas se detectó la presencia de *Salmonella*; en 8 de ellas la detección fue tanto por la técnica de qPCR como por el método tradicional, en un caso la presencia del patógeno sólo fue evidenciada por el método de cultivo tradicional.

En la Figura 16 se puede observar que en la curva de amplificación la muestra 48 no generó fluorescencia, lo cual puede deberse a la presencia de inhibidores de qPCR. Los valores Ct de las muestras que sí amplificaron son de 19 a 22. Las lecturas del espectrofotómetro en un radio de absorbancia de 260/280 para la muestra 48 tuvo un valor de 1.28 lo cual nos indica una posible contaminación por proteínas. Se ha reportado que la presencia de inhibidores en el queso como proteasas e iones de calcio son capaces de interferir en la reacción de qPCR (Powell *et al.*, 1993; Bickley *et al.*, 1996).

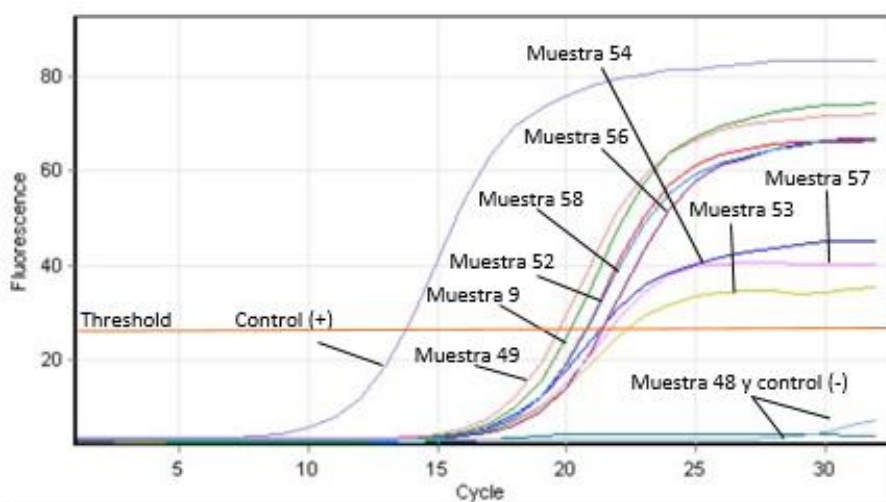


Figura 16. Curva de amplificación por qPCR de muestras queso fresco naturalmente contaminado por *Salmonella*.

En la figura 17 se puede apreciar que en la curva de disociación los productos generados de la amplificación son específicos de *Salmonella* con respecto al control positivo.

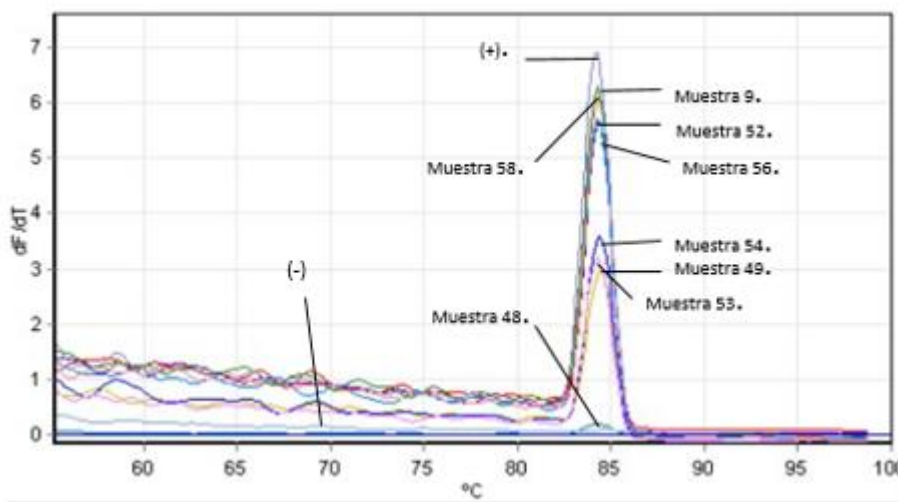


Figura 17. Curvas de disociación de productos de amplificación a partir de muestras de queso fresco contaminadas naturalmente por *Salmonella*.

Para las demás muestras de mercado se pudo observar que en las curvas de amplificación (Figura 18) se generó fluorescencia después del ciclo 35, indicando la formación de dímeros de iniciadores, en la Figura 19 los picos generados a temperaturas de disociación inferior que los productos específicos de *Salmonella* corresponden a los dímeros de iniciador.

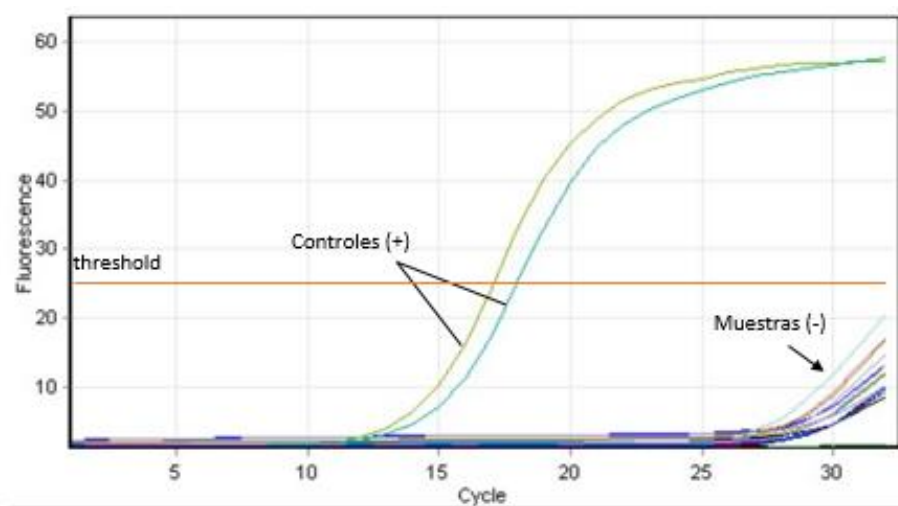


Figura 18. Curva de amplificación por qPCR de muestras de mercado negativas a *Salmonella*.

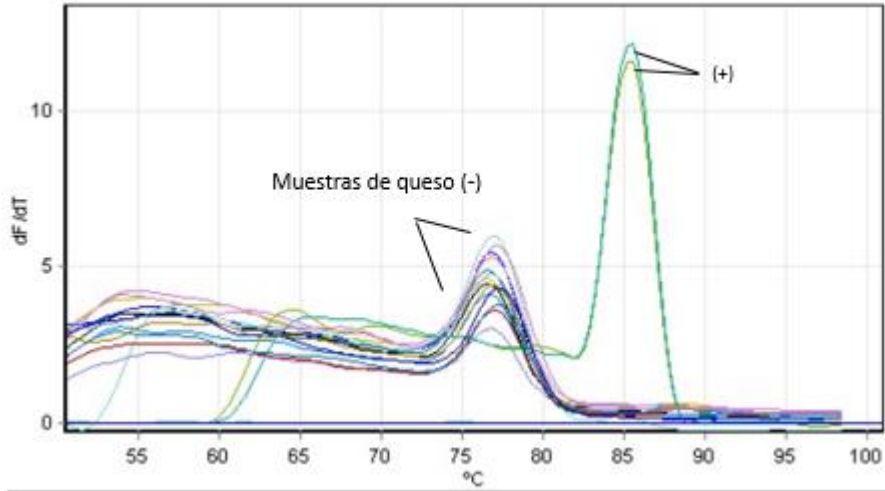


Figura 19. Temperatura de fusión en muestras de queso fresco negativas a *Salmonella*.

De acuerdo a los parámetros calculados según la ISO 16140:2003 la técnica muestra una especificidad del 100%, la sensibilidad fue de 88% debido a que la muestra 48 no pudo ser detectada por la metodología alternativa (Cuadro 8).

Cuadro 8. Sensibilidad (RS), especificidad (RE) y precisión relativa (RA) de la detección de *Salmonella* a partir de queso Oaxaca y panela mediante qPCR.

Matriz	PA*	NA*	ND*	PD*	Sum N	RA (%) (100*(PA+ND))/N	N+ = PA +ND	RS (%) (100*PA)/N+	N- = NA + PD	RE (%) (100+NA)/N-
Queso fresco	8	71	1	0	100	98.75%	9	88.8%	71	100%

*PA = resultados positivos por ambas técnicas

*NA = resultados negativos por ambas técnicas

*ND = resultados positivos por método de referencia pero negativos por método alternativo

*PD = resultados positivos por métodos alternativo pero negativos por método de referencia

*N+ = PA sumado a ND

*N- = NA sumado a PD

Una de las grandes ventajas de PCR en tiempo real es su rapidez. Los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea sin necesidad de una acción posterior. El equipo ofrece el manejo de una gran cantidad de muestras y los ensayos son relativamente cortos, mientras que los procedimientos convencionales necesitan de múltiples equipos y requieren de mayor tiempo para la detección del microorganismo.

La utilización de un método molecular como PCR ofrece la posibilidad de una alta sensibilidad y especificidad si el protocolo es generado y validado correctamente.

En este trabajo se decidió explorar dos técnicas moleculares con la finalidad de ofrecer una herramienta alternativa a la metodología tradicional. Se pudo observar que la tecnología de ANSR es sencilla, el protocolo de enriquecimiento, extracción y detección se resume en pasos rápidos y fáciles de ejecutar. En contraste, qPCR es un protocolo más complejo, desde la selección de iniciadores, reactivos, métodos de extracción, condiciones de amplificación, así como la minuciosidad y delicadeza que demanda ejecutar el protocolo. Cada técnica ofrece cualidades y algunos puntos importantes sobre los cuales se debe de trabajar.

En cuestión de resultados se puede ver que la detección por ANSR requiere de afinar y optimizar la técnica para detección de patógenos en queso fresco, particularmente en queso panela. Solo un resultado coincidió con la metodología tradicional. El equipo Neogen sigue trabajando en modificaciones y mejoras del protocolo para llevar a cabo sus ensayos (Caballero *et al*, 2015). Por otra parte la detección mediante qPCR puede ser una opción factible para la detección de *Salmonella* en queso fresco, ya que todos los resultados coincidieron con la metodología tradicional, a pesar de que no es un protocolo cuantitativo, es una buena alternativa si se habla de detección, ya que ofrece una alta especificidad, sensibilidad, rapidez y poco trabajo.

VII. Conclusiones.

En el queso fresco producido industrialmente se encontró *Salmonella*. Las posibles fuentes que operan en el proceso de producción son manos de los operarios y utensilios. Es necesario la implementación de protocolos que aseguren procesos de higienización eficientes que prevengan la contaminación del producto final.

El consumo de queso fresco artesanal vendido en mercados de Querétaro representa un riesgo a la salud. Se encontró *E.coli* (64%) y *Salmonella* (9%). La autoridad sanitaria debe regular su producción y venta.

La detección de *Salmonella* en queso fresco mediante la tecnología ANSR de Neogen puede arrojar falsos negativos (8%) y falsos positivos (19%), se requiere realizar ajustes de la técnica para poner implementarla en la detección del patógeno en queso fresco. La flora asociada y su actividad durante el preenriquecimiento afecta la eficiencia de la detección mediante esta técnica.

La técnica de qPCR desarrollada en este proyecto puede ser una alternativa de detección cualitativa rápida, con una especificidad del 100% y sensibilidad de 88% de *Salmonella* en queso panela y Oaxaca.

VIII. Referencias bibliográficas.

Aguado, R. 1999. Elaboración de queso asadero con leche pasteurizada y maduración indirecta. Universidad Autónoma de Chapingo, México.

Alais, C. 2003. Science du lait. Principes des techniques laitieres. Editorial Reverté. 4° edición. Barcelona, España.

Asselt, E, D., Jong, A, E, I., Nauta, M, J. 2008. Cross contamination in the kitchen: estimation of transfer rates for cutting boards, hands and knives. Journal of applied microbiology.

Beltran, M., Gerba, C., Porto, A., Luchansky, J., Chaidez, C. 2014. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from small Mexican retail markets of queso fresco. International Journal of Environmental Health Research

Bickley, J., Short, J., Mcdowell, D., Parkes, H. 1996. Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. Letters in applied microbiology. 22, 153 – 158.

Bowen, D. 2005. Cheese shop seeks better precautions. New York Times, Estados Unidos.

Bradshaw, G., Peeler, T., Corwin, J., Hunt, M., Tierney, T., Larkin, P. 1985. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in milk. Journal of Food Protection, 48, 743–745.

Buyser, M.L., Dufour, B., Maire, M. y Lafarge, V. 2001. "Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries". International Journal of Food Microbiology.

Caballero, O., Alles, S., Lucas, R., Tolan, J., Mozola, M., Rice, J. 2014. Validation of the ANSRTM Salmonella Method for Detection of Salmonella spp. in a Variety of Foods. Journal of AOAC International. Vol. 97. No. 2.

Campo, M., Cástulo I.; Gómez H., Héctor E.; Alaníz de la O. 2008. Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. e-Gnosis, vol. 6, 2008, pp. 1-17.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1981. Salmonellosis associated with raw milk, Montana. Morbidity and Mortality Weekly Report. 30:211-2.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2001. Outbreak of Listeriosis Associated With Homemade Mexican-Style Cheese --- North Carolina, October 2000--January 2001. Morbidity and Mortality Weekly Report. 50(26);560-2.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). 2002. Guideline for Hand Hygiene in Health-care Settings. Morbidity and Mortality Weekly Report. vol. 51.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). 2006. Outbreak of Multidrug-Resistant Salmonella enterica serotype Newport Infections Associated with Consumption of Unpasteurized Mexican-Style Aged Cheese --- Illinois, March 2006--April 2007. Morbidity and Mortality Weekly Report. 57(16);432-435.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2007. *Salmonella* Typhimurium infections associated with raw milk and cheese consumption, Pennsylvania, February 2007. Morbidity and Mortality Weekly Report. 56(44);1161-1164.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2008. Outbreak of *Listeria monocytogenes* Infections Associated With Pasteurized Milk From a Local Dairy --- Massachusetts, Estados Unidos, October 2007. Morbidity and Mortality Weekly Report. 57(40);1097-1100.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). 2014. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Roos Foods Dairy Products. Disponible en: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-02-14/index.html>.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). 2015. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Soft Cheeses Distributed by Karoun Dairies, Inc. (Final Update). Disponible en: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/soft-cheeses-09-15/index.html>.

Codex Alimentarius, 2003. Principios generales de higiene de los alimentos. Roma, Italia.

Cody SH, Abbott SL, Marfin AA, Schulz B, Wagner P, Robbins K, Mohle-Boetani JC, Vugia DJ. Two outbreaks of multidrug-resistant *Salmonella* serotype typhimurium DT104 infections linked to raw-milk cheese in Northern California. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 1999; 281(19):1805-1810.

Colwell, R. R., 2009. Viable but not cultivable bacteria. *Uncultivated microorganisms*. Berlin: Springer.

Corless, CE., Guiver, M., Borrow, R., Edwards-Jones, V., Kaczmarski, EB., Fox AJ. 2000. Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. *J Clinical Microbiology* 38(5):1747–52.

Csordas, A., Barak, J., Delwiche, M. 2004. Comparison of primers for the detection of *Salmonella enterica* serovars using real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 187-193.

D'Aoust, J., Emmons, B., McKellar, R., Timbers, E., Todd, D., Sewell, M. 1987. Thermal inactivation of *Salmonella* species in fluid milk. *Journal of Food Protection*, 50, 494–501.

Deschênes, G., Casenave, C., Grimont, F., Desenclos, J, C., Benoit, S., M. Collin, S. Baron, P. Mariani, P.A. Grimont, and H. Nivet. 1996. Cluster of cases of haemolytic uraemic syndrome due to unpasteurised cheese. *Pediatric nephrology*, 203-5.

ELIKA, 2013. Technical details of *Salmonella*. Fundacion Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, España.

http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/Documento82/1.Salmonella.pdf

Escamilla, J. L., 2007. Buenas Prácticas de Manufactura y Procedimientos de Operación Estándar de Sanidad, para la Industria Láctea. Universidad Autónoma de Hidalgo, México.

FAO. 2007. Codex Alimentarius, Directrices Sobre la Aplicación de Principios Generales de Higiene de los Alimentos para el Control de *Listeria monocytogenes* en los Alimentos. <http://www.codexalimentarius.net/search/advanced.do?lang=es>

Fernández, E. 2008. Microbiología e inocuidad de los alimentos. 2ª. Ed., universidad autónoma de Querétaro, México.

Fuentes, F., Campas, N., Meza, M. 2005. Calidad sanitaria de alimentos disponibles al público de ciudad obregón. Instituto tecnológico de Sonora, México.

Fernández, E. 1997. Manual del curso de microbiología sanitaria de agua y alimentos. D.I.P.A. Facultad de Química. Universidad autónoma de Querétaro, México.

FAO, 2014. Perspectivas de inocuidad en los alimentos. <http://www.fao.org/americas/perspectivas/inocuidad/es/>. Consultado en febrero 2014.

Gonzales, E. 2010. Caracterización de la composición físico química del queso fresco elaborado artesanalmente en Sehuatitlán. Facultad de medicina veterinaria en Veracruz, México.

Gould, L., Mungai, E., Barton, C. 2014. Outbreaks Attributed to Cheese: Differences Between Outbreaks Caused by Unpasteurized and Pasteurized Dairy Products, United States, 1998–2011. *Foodborne Pathogens and Disease*, 545-551.

Goulet, V., Jacquet, C., Vaillant, I., Rebiere, E., Mouret, C., Lorente, E., Maillot, F., Stäiner, J., Rocourt, A. 1995. Listeriosis from consumption of raw-milk cheese. *Lancet*, 1581-1582.

© World Health Organization, 1997. Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control. National Advisory Committee On Microbiological Criteria For Foods. Estados Unidos.

Hanna, S., Connor, C., Wang, H. 2005. Real-time Polymerase Chain Reaction for the Food Microbiologist: Technologies, Applications, and Limitations. *Journal of Food Science*.

Hervas, A. 2012. El mercado del queso en México. Oficina económica y comercial de la embajada de España en México. Instituto español de comercio exterior.

ICMSF.1996. Salmonellae. Ch 14 In: *Microorganisms in food 5: Microbiological specifications of food pathogens*. Blackie Academic and Professional, London, p. 217–264

INEGI, 2010. Encuesta Industrial Mensual. <http://dgcnesyp.inegi.org.mx/cgi-win/bdieintsi.exe/SER173532>

Kato, L., Garcia, L., Rosas, G., Rubio, C., 2003. Evolución y perspectivas de la industria de Lácteos en México. Universidad autónoma metropolitana de Azcapotzalco, México.

KERR, K. G. y LACEY, R. W. 1992. Higiene y seguridad alimentaria. Revisiones sobre ciencia y tecnología de los alimentos. Ed. Acribia, Zaragoza, España

Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P., Drosinos, E. 2009. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control* 21, 805-815.

Langer, A., Ayers T., Grass, J., Lynch, M., Angulo, F., Mahon, B. 2006. Nonpasteurized Dairy Products, Disease Outbreaks, and State Laws. *Medscape journal*, Estados Unidos.

López, C., Hernandez, H. 2000. Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Manchego and Chihuahua Mexican cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 149-153.

Mackay, I. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology Infections*, 10(3):190–212.

Montañez, C., Rubio, M., Nuñez, F., Alonso, R. 2006. Detección de *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes* en quesos frescos y semimadurados que se expenden en vía pública en la ciudad de México. *E-Journal UNAM*, Vol. 37-4.

Mozola, M., Norton, P., Alles, S., Lucas, R., Tolan, J., Caballero, O., Pinkava, L., Hosking, E., Luplow, K., Rice, J. 2013. Validation of the ANSRTM *Salmonella* Method for Detection of *Salmonella* spp. in Selected Foods and Environmental Samples. *Journal of AOAC International*, Vol. 96. No. 4.

NORMA Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos.

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

Rodríguez, M., Duran, R. 2007. Los quesos de México y del mundo. Tecnológico de Estudios superiores de Ecatepec, México.

Reséndiz M.R. 2012. El queso fresco artesanal de la canasta básica y su calidad sanitaria en tzuapán. Actas Iberoamericanas de conservación animal. Universidad autónoma de Puebla, México.

Roig, A. 2004. Risk's in dairy products. Universidad autónoma de Barcelona, España.

Rangel, J. 2000. Efecto del malaxado sobre la viabilidad de *Listeria monocytogenes* y organismos coliformes durante la elaboración de queso Oaxaca. Facultad de química. Universidad autónoma de Querétaro, México.

Romero, R., Mestres, J., 2004. Tecnología para producción de lácteos. 2da Edición, universidad politécnica de Cataluña, España.

Ruegg, L. 2005. Milk Quality Factsheet. University of Wisconsin, Estados Unidos.
http://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/2011/09/estafilococos-aureus_spanish.pdf

Santos A., M. 2006. Elaboración a pequeña escala de quesos mexicanos con leche pasteurizada. Primer simposio de leche. Chihuahua.

Secretaría de economía. 2012. Análisis del sector lácteo en México. Dirección general de industrias básicas.

SAGARPA, 2010. Análisis del mercado de la leche y productos lácteos en México. Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. Distrito Federal, México.

THIMOTHE, J.; NIGHTINGALE, K.K.; GALL, K.; SCOTT, V.N.; WIEDMANN, M. 2004. Tracking of *Listeria monocytogenes* in Smoked Fish Processing Plants. Journal of Food Protection

OPS, 2005. Mejorar la inocuidad de los alimentos en América Latina. Organización Panamericana de la Salud, Bolivia.

PROFECO, 2000. Calidad de queso. Revista del consumidor, México. http://www.profeco.gob.mx/revista/pdf/est_00/quesos.pdf

Powell, H., Gooding, C., Garret, S., Lund, B., Mckee, R. 1994. Proteinase inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction. Letters in Applied Microbiology. 18, 59-61.

Quiceno, J., Bastidas, X., Rojas, D., Bayona, M. 2010. La mosca doméstica como portador de patógenos microbianos, en cinco cafeterías del norte de Bogotá. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, 13 (1): 23-29, 2010.

Tan, E., Erwin, B., Dames, S., Ferguson, T., Buechel, M., Irvine, B., Voelkerding, K., Niemz, A. 2008. Specific versus Nonspecific Isothermal DNA Amplification through Thermophilic Polymerase and Nicking Enzyme Activities. Biochemistry, 9987-9999

Torres. M., Mendoza. M., Castro. J., Gomez. C., Garay. L., Navarro. V., Villarruel. A. 2011. Incidence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and Staphylococcal Enterotoxin in two types of mexican fresh cheeses. Journal of food protection, 79, 84.

Uribarren, T. 2014. Recursos en bacteriología – salmonelosis. Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/salmonelosis.pdf>.

Vogt, R.L., Hakey, A., and Allen, J. 1981. *Salmonella* enteritidis serotype Derby and consumption of raw milk. The journal of infectious diseases, 144(6), 608.

Weir E., Mitchell J., Reballato S., Fortuna D. 2007. Public Health: Raw milk and the protection of public health. CMAJ: Can Med Assoc J, Canadá.

Washington State Department of Agriculture. 2006. The truth about raw milk sales. <http://agr.wa.gov/FoodAnimal/Dairy/docs/rawmilktruth.pdf>