



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y
BIOQUÍMICA**

TESIS

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN LECHE FRESCA Y PROCESADA MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA:

LUISA MAZAS MARTÍNEZ

ASESORA:

DRA. MARÍA DE JESÚS RAMÍREZ ALTAMIRANO

COMISIÓN REVISORA:

**M.C. MINERVA DONAJÍ MÉNDEZ LÓPEZ
M.C. AYMARA JUDITH DÍAZ BARRITA
JOSÉ LÓPEZ MATADAMAS**

OAXACA DE JUÁREZ, OAXACA

JUNIO 2023

Dedicatoria

Dedico con mucho orgullo este trabajo de tesis a mis padres David Mazas y Carmen Martínez, por el gran apoyo que me brindaron en todos los sentidos para que alcance esta meta y convertirme en una profesionista más de la familia. Por siempre confiar en mí y que esto es fruto del gran esfuerzo que realizaron para darme acceso a una educación, de días de desvelos, días en el que prefirieron pasar necesidades a que yo me quedara sin algo para la escuela. Muchas gracias, por tanto, son mi mayor ejemplo a seguir.

Luisa Mazas Martínez

Agradecimientos

A Dios, por la vida y ser mi fortaleza en medio de todos los obstáculos.

Gracias al Instituto Tecnológico de Oaxaca por la formación que me han dado en todos estos años de estancia en sus instalaciones.

A mis hermanos, en especial a Lidia y Froylan, por siempre darme fuerzas, apoyo y palabras de aliento para culminar esta etapa de mi vida.

Agradezco infinitamente a mi asesor Dr. Luis Javier Toledo Flores y a la Mtra. Edith Bernabé Pérez, por la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por la confianza que me han brindado siempre, por acompañarme en este camino, por compartir conmigo sus sabidurías y vastos conocimientos, por ser personas de gran calidad. Me siento muy alagada de tener una amistad con ellos, son personas que admiro y respeto mucho.

Agradezco también a Moisés Contreras por todo el amor y apoyo que me brinda, por estar siempre para mí, significa mucho en mi vida.

A mis compañeras de laboratorio E.I.Q. Maribel Vásquez Concha y E.I.Q. Yanitza Soledad Bohórquez Mendoza por la ayuda prestada en el trabajo experimental.

Al H. Jurado por, por sus valiosas sugerencias durante la revisión del presente trabajo y por todo el tiempo dedicado al mismo.

RESUMEN

Las enfermedades bacterianas transmitidas por los alimentos se están convirtiendo en un problema creciente de salud pública para todo el mundo, especialmente para los países en desarrollo. Estas constituyen una causa importante de morbilidad y mortalidad en nuestro país y en todo el mundo lo cual constituye un factor importante para explicar el riesgo socioeconómico de una parte importante de la población, pues representa gastos médicos, días no laborales, disminución de la capacidad física, entre otras. Un porcentaje importante de la producción de leche en México no pasan por un proceso de pasteurización el cual permite eliminar las bacterias nocivas al calentar la leche a una temperatura específica durante un tiempo determinado, como consecuencia, la carga microbiana representa un riesgo sanitario y es indicativo claro de la calidad del producto.

La contaminación de la leche industrializada, por otra parte, puede originarse por inadecuadas temperaturas aplicadas en los procesos, condiciones deficientes de almacenamiento y transporte, y sobre todo, las condiciones sanitarias en que se realizan las operaciones de producción de los productos lácteos. En general, la leche puede albergar bacterias patógenas y/o que pueden alterar el producto, tales como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*, entre otras, responsables principalmente de enfermedades transmitidas por alimentos.

El objetivo general del estudio fue evaluar mediante métodos cualitativos y cuantitativos el riesgo sanitario presente en leche fresca y procesada que se consumen en México, aplicando técnicas de biología molecular. Se adquirieron muestras de leche de pequeñas unidades productoras de la región de Valles Centrales, Oaxaca, las cuales se almacenaron a una temperatura de 4–8 °C y se procesaron en un lapso máximo de 2 h después de su traslado al laboratorio. Se adquirieron primers y sondas de los microorganismos del estudio de una empresa biotecnológica. Se realizó la extracción de ADN genómico mediante lisis alcalina, centrifugación e incubaciones periódicas. La pureza del ADN se determinó estableciendo la relación de absorbancia 260/280 entre un rango de 1.8 – 2.0. La integridad se evaluó utilizando un gel de agarosa al 1%. Las muestras del ADN se utilizaron para el análisis de PCR estándar para la identificación de las bacterias patógenas. Se realizaron ensayos de PCR con las que se evaluaron la calidad de ADN extraído de las bacterias

control. Se optimizaron gradientes de temperatura y concentración de primers. Como control positivo de amplificación se utilizó una muestra de ADN genómico de E–coli DH5. Las reacciones fueron programadas en un termociclador utilizando los primers sintetizados y el ADN genómico correspondientes a cada microorganismo. Se empleó la técnica de electroforesis con geles de agarosa al 0.7% a 2% con las que se analizaron los resultados de reacciones de alineamiento, integridad de ADN y productos de la PCR. Se extrajo el ADN de las muestras de leche mediante los reactivos HotShot, los cuales se utilizaron para su análisis por PCR. Los resultados del estudio permitirán contar con un método rápido para determinar la calidad sanitaria/inocuidad de la leche fresca y procesada para su consumo por parte de los ciudadanos.

Los resultados de análisis bacteriológico tanto por método convencional como por método de biología molecular, sugieren la presencia de microorganismos patógenos con una mayor cantidad en leche fresca que en leche procesada.

Los dos métodos utilizados en este estudio son confiables, pero cabe resaltar que la PCR es un método eficiente y que se obtienen resultados en menor tiempo comparado con el método convencional.

Palabras clave: Primers, termociclador, ADN genómico, PCR, qPCR, reactivos HotShot

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS.....	6
Objetivo general:.....	6
Objetivos específicos	6
Capítulo 1.....	7
FUNDAMENTO TEÓRICO	7
1.1 Leche.....	8
1.1.1. Definición	8
1.1.2. Características esenciales de la leche	8
1.1.2.1. Propiedades fisicoquímicas.....	10
1.1.2.1.1. Características organolépticas.....	10
1.1.2.1.2. Propiedades químicas.....	11
1.1.3. Composición nutricional de la leche de ganado vacuno	15
1.1.4. Microbiología de la leche cruda.....	19
1.1.4.1. Calidad microbiológica de la leche	19
1.1.4.2. Problemas microbiológicos.....	20
1.1.4.3. Especificaciones sanitarias de la leche.....	23
1.2. Microorganismos mesófilos aerobios.....	24
1.2.1. Escherichia Coli.....	26
1.2.1.1. La toxiinfección alimentaria por E. coli	28
1.2.2. Salmonella spp.	28
1.2.2.1. Salmonelosis.....	29
1.2.3. Listeria Monocytogenes	30
1.2.4. Staphylococcus Aureus.....	31
1.2.4.1. Toxiinfección alimentaria producida por Staphylococcus aureus.....	33
1.3. ADN.....	33
1.3.1. Definición, estructura y función.	33
1.3.2. Replicación del ADN.....	35
1.4. Métodos moleculares para la detección de microorganismos patógenos	37
1.4.1. Técnicas de PCR.....	38
1.4.2. Historia de la PCR	39
1.4.3. Definición.....	41
1.4.4. Taq Polimerasa.....	43

1.4.5. Primers para PCR.....	43
1.4.6. Pasos de la PCR.....	44
1.4.7. PCR convencional	46
1.4.8.....	47
1.4.9. Aplicaciones y limitaciones de la PCR	48
1.5. Electroforesis	48
1.5.1. Definición.....	48
1.5.2. Componentes de la electroforesis en gel de Agarosa	50
1.5.2.1. Agarosa.....	50
1.5.3. Uso de la electroforesis	51
Capítulo 2.....	53
DESARROLLO EXPERIMENTAL	53
OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	54
2.1. Detección o cuantificación de microorganismos por métodos tradicionales (NOM-210-SSA1-2014).	58
2.1.1. Aislamiento de <i>Salmonella spp</i>	58
2.1.2. Cuantificación de <i>Escherichia coli</i>	59
2.1.3. Cuantificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	59
2.1.4. Cuenta de Bacterias Mesófilas Aeróbicas.....	60
2.1.5. Cuenta de Organismos Coliformes Totales y Fecales.....	60
2.2. Métodos moleculares	61
2.2.1. Extracción de ADN	61
2.2.1.1. A partir de cultivos puros.....	61
2.2.1.2. A partir de muestras de alimentos	61
2.2.2. Cuantificación de ácidos nucleicos	62
2.2.2.1. Espectrofotometría	62
2.2.3. Primers y sondas	63
2.2.3.1. Selección de Pimers y sondas	63
2.2.4. Estandarización de la PCR	64
2.2.5. PCR estándar	65
2.2.5. Análisis electroforético	67
Capítulo 3.....	69
RESULTADOS Y DISCUSIONES	69
Capítulo 3.....	83

CONCLUSIONES	83
Capítulo 4	86
REFERENCIAS	86

Índice de tablas

Tabla 1.1. Principales propiedades químicas de la leche.	14
Tabla 1.2. Composición general de la leche en diferentes especies (por cada 100 gr).....	18
Tabla 1.3. Límites máximos permisibles de algunas bacterias en la leche.	23
Tabla 1.4. Condiciones de crecimiento de E. coli.....	26
Tabla 1.5. Límites máximos permisibles de Staphylococcus aureus en productos y subproductos de la leche.	32
Tabla 1.6. Primers utilizados para evaluar las poblaciones bacterianas.	63
Tabla 1.7. Componentes de la reacción de PCR para la detección de microorganismos en leches.	64
Tabla 1.8. Programa ALE PCR de ciclado de PCR.	65
Tabla 1.9. Resultados del método tradicional para la detección de microorganismos en muestras de leches,.....	71

INTRODUCCIÓN

La leche constituye el primer sustento de los mamíferos después del nacimiento. Es el alimento más completo, rico en proteínas, carbohidratos, minerales, vitamina y calcio, y su valor nutrimental es particularmente alto debido al equilibrio de los nutrimentos que lo componen (Mourad, Bettache, & Samir, 2014). La leche es una materia prima agroindustrial utilizada para una gran variedad de productos alimentarios que incluyen la leche pasteurizada, ultrapasteurizada, yogur, quesos, crema, leche en polvo, y mantequilla.

México produjo en 2020 poco más de 12.7 millones de toneladas de leche, de las cuales, alrededor del 98.7% es leche de ganado bovino y el restante de ganado caprino (SIAP, 2020). Este volumen de producción ubica a nuestro país en el lugar 14° mundial, y representa el 2% de la producción mundial (CANILEC, 2019). Cuatro estados: Jalisco, Coahuila, Durango y Chihuahua, contribuyen con la mitad de la producción nacional. El valor de esta producción alcanzó 78.2 mil millones de pesos en 2018. México exporta 722 millones de dólares e importa 2,011 millones de dólares, lo cual origina un déficit anual de casi 1.3 mil millones de dólares. El gasto promedio mensual en leche y productos lácteos en los hogares de México en 2017 alcanzó 455 pesos. El 10.1% del gasto en alimentos dentro del hogar está representado por este tipo de productos (INEGI, 2019), lo cual lo ubica como un producto importante en la dieta nacional.

En el contexto mundial, México ocupa el quinto lugar en compra de leche líquida con 3.5% de las importaciones globales. A nivel nacional, al cierre de 2018, la producción de leche de bovino aumentó 240 millones 683 mil litros, en relación con el mismo periodo de 2017. Al cierre de 2018, la elaboración de derivados y fermentados lácteos como quesos, crema y yogurt, alcanzó un



volumen de un millón 150 mil toneladas, con un valor de 52 mil 104 millones de pesos (SADER, 2018).

Por otra parte, las enfermedades bacterianas transmitidas por los alimentos se están convirtiendo en un problema creciente de salud pública para todo el mundo, especialmente para los países en desarrollo (Fung, Wang, & Menon, 2018). Estos males constituyen una causa importante de morbilidad y mortalidad a lo largo y lo ancho del planeta. Esta situación constituye un factor importante para explicar el riesgo social y económico de una parte importante de la población, pues representa gastos médicos, días no laborales y disminución de la capacidad para realizar tareas físicas, entre otras (OMS,2015).

Estudios realizados en varios países han monitoreado la presencia de diferentes tipos de patógenos en la leche fresca, con niveles de prevalencia de hasta 13% para bacterias como *Campylobacter jejuni* y *Listeria monocytogenes*. En algunos estudios, casi un tercio de todas las muestras de leche contenían al menos un tipo de patógeno. Un porcentaje importante de la producción de la leche en México no pasa por un proceso de pasteurización, el cual consiste en calentar rápidamente la leche a no menos de 72 ° C y mantener esa temperatura durante al menos 15 segundos. Posteriormente, el alimento debe almacenarse bajo refrigeración a temperaturas de 2 a 4°C. La ausencia de pasteurización propicia una alta carga microbiana, la cual representa un indicativo claro de mal manejo del producto. Adicionalmente, la contaminación microbiana de este alimento es consecuencia de las inadecuadas temperaturas aplicadas en los procesos, así como condiciones deficientes de almacenamiento y transporte.



En México las 5 bacterias más comunes en los casos de enfermedades de origen alimentario, en general, son *Vibrio Cholerae*, *Listeria*, *Salmonella*, *Campylobacter* y *Escherichia coli*, las cuales han sido detectadas por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud (Jiménez Corona, 2018). Los productos lácteos derivados de la leche pueden albergar bacterias patógenas y/o que pueden alterar el producto, tales como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas aeruginosa* entre otras, responsables principalmente de enfermedades transmitidas por alimentos (Chams y col.,2016) Cuatro de los patógenos más importantes incluidos en la norma sobre especificaciones sanitarias de la leche y productos lácteos en México incluyen *E.coli*, *Salmonella* spp., *L.monocytogenes* y *S. aureus* (SSA, 2010).

Según los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés), desde 1993 a 2012, se registraron 127 brotes vinculados a la leche cruda o productos lácteos crudos tales como helados, queso fresco o yogur. Causaron 1,909 enfermedades y 144 hospitalizaciones. Los CDC señalan que la mayoría de las enfermedades transmitidas por los alimentos no forman parte de los brotes reconocidos, y por cada enfermedad reportada, muchas otras ocurren (FDA, 2018).

Los métodos convencionales para la identificación de microorganismos patógenos dependen de las características del cultivo de éstos en una serie de medios nutritivos bajo condiciones particulares de tiempo y temperatura. Estos métodos implican el pre enriquecimiento y el enriquecimiento selectivo, seguidos de los pasos de aislamiento y las pruebas de identificación. Los pasos de enriquecimiento y aislamiento son técnicas principalmente de cultivo, en tanto que



la identificación se basa en el análisis bioquímico (NOM-114-SSA1-1994). Por lo anterior, estos métodos tienen la desventaja de desarrollarse en tiempos relativamente largos, además de ser laboriosos.

Más recientemente y en diversos países, investigadores han desarrollado una serie de métodos rápidos para la detección de patógenos transmitidos por los alimentos en productos alimenticios para prevenir brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. Los métodos de detección rápida son generalmente más sensibles, específicos, con tiempo eficiente, ahorro de trabajo y mayor confiabilidad que los métodos convencionales (Law, Ab Mutalib, Chan, & Lee, 2015).

Un resultado rápido y oportuno puede evitar que personas enfermen por ingerir alimentos contaminados con microorganismos patógenos involucrado en enfermedades transmitidas por alimentos (Yáñez, Máttar, & Durango, 2008). Dentro de los métodos rápidos se incluyen técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y PCR multiplex que requieren gel de agarosa para la tipificación de organismos. El análisis para la detección mediante PCR es laborioso, es relativamente lento, no es adecuado para el análisis de alto rendimiento y es difícil de automatizar (Zhao, Lin, Wang, & Oh, 2014). por otra parte, la PCR cuantitativa (qPCR), no requiere procesamiento posterior a la PCR, lo cual permite bajo riesgo de contaminación cruzada, análisis de alto rendimiento y automatización (Fricker, MesselhäuBer, Busch, Scherer, & Ehling-Schulz, 2007).

Por lo anterior, en este proyecto se pretende aplicar un método rápido para la detección y cuantificación de patógenos en leche fresca y procesada mediante técnicas moleculares, e implementarlo como una de las grandes oportunidades en la vigilancia sanitaria de la leche y los

productos lácteos. La Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010 contiene las disposiciones sanitarias con relación a la leche fresca y procesada en México. De acuerdo con la norma, la leche pasteurizada, apta para el consumo humano, debe estar exenta de la presencia de *Salmonella* spp., y *Listeria monocytogenes*. Permite, a su vez, la presencia de no más de 3 NMP/ml de *Escherichia coli* y hasta 10 NMP/ml de *Staphylococcus aureus* (SSA, 2010).



OBJETIVOS

Objetivo general:

Aplicar una técnica de biología molecular para detectar y cuantificar *Escherichia coli*, *Salmonella sp* y *Staphylococcus aureus* en leche fresca y procesada, que se utiliza como materia prima en la industria láctea de los Valles Centrales del estado de Oaxaca.

Objetivos específicos

- Detectar la presencia de *Escherichia coli*, *Salmonella sp* y *Staphylococcus aureus* en muestras de leche fresca y procesada en la región de los Valles Centrales de Oaxaca.
- Cuantificar los niveles de contaminación por *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, y *Staphylococcus aureus* en muestras de leche fresca y procesada en la región de los Valles Centrales de Oaxaca.





Capítulo 1

FUNDAMENTO TEÓRICO



1.1 Leche

1.1.1. Definición

La leche es un alimento básico para el ser humano en sus primeras etapas de crecimiento y desarrollo, debido a su riqueza en los nutrientes requeridos por el hombre para mantener su equilibrio orgánico vital.

Otra definición de la leche es la de la Norma Oficial Mexicana (NOM-155-SCFI-2012)

“Es el producto obtenido de la secreción de las glándulas mamarias de las vacas, sin calostro el cual debe ser sometido a tratamientos térmicos u otros procesos que garanticen la inocuidad del producto; además puede someterse a otras operaciones tales como clarificación, homogeneización, estandarización u otras, siempre y cuando no contaminen al producto y cumpla con las especificaciones de su denominación.”

1.1.2. Características esenciales de la leche

La leche fresca está compuesta por agua, proteína, grasa, lactosa, vitaminas y minerales (Walstra, Wouters, & Geurts, 2005). Estos componentes determinan la calidad de la leche y varían según la raza y el tipo de alimentación que se le ofrezca al animal. La proporción de agua en la leche se encuentra entre el 85.3 y 88.7% (p/p), la proteína equivale entre 2.3 y 4.4 % (p/p) y la lactosa entre 3.8 y 5.3% (p/p) (Philpot & Nickerson, 2000). La grasa fluctúa entre 2.5 a 5.5% (p/p) y es considerada la variable más importante para la industrialización de la leche, un porcentaje más alto de grasa indica que la leche es de alta calidad, además es una variable que incrementa el valor económico de la misma (Michalsky y col., 2006).

La función natural de la leche es la de ser un alimento exclusivo de los mamíferos jóvenes durante el periodo crítico de su existencia, tras el nacimiento, cuando el desarrollo es rápido y no puede ser sustituido por otros alimentos.

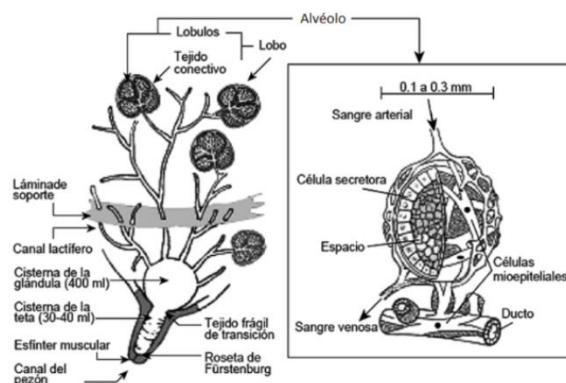
Secreción de la leche

La ubre de la vaca está diseñada para producir y ofrecer al becerro nacido un fácil acceso a la leche. Se encuentra suspendida por fuera de la pared del abdomen posterior y no está soportada por ninguna estructura ósea.

En el caso de la vaca, está constituida por cuatro glándulas mamarias; cada una de ellas presenta una unidad funcional en sí misma que opera independientemente de las demás y drena la leche por medio de su propio canal. La ubre es la glándula exócrina debido a que la leche es sintetizada en células especializadas agrupadas en alvéolos, y luego excretada fuera del cuerpo por medio de un sistema de conductos que funcionan de la misma forma que los afluentes de un río.

Figura 1

Sistema secretor y conductor de la leche.



Nota: Esta imagen presenta la composición del sistema secretor y conductor de la leche en un mamífero. Tomado de Wattiaux M. 20. Secreción de leche por la ubre de una vaca lechera. Babcock Institute, Universidad de Wisconsin-Madison.

1.1.2.1. Propiedades fisicoquímicas

1.1.2.1.1. Características organolépticas

Son todas aquellas que se aprecian en forma simple y rápida o indirectamente por nuestros sentidos, como el color, olor, sabor, textura.

La leche también puede definirse desde un punto de vista físico-químico. Según Gigli (2015) se trata de una sustancia coloidal formada por distintos componentes químicos: proteínas, grasas, azúcares, vitaminas y minerales. El agua es el componente más abundante en la leche de todos los Mamíferos (por lo que se trata de un líquido).

Es un líquido de composición compleja, opaco, de color blanco o blanco amarillento, color que está determinado por la dispersión y absorción de la luz por las gotas de grasa y las micelas de proteína. De sabor ligeramente dulce, el olor es característico inespecífico y reacción iónica (pH) próxima a la neutralidad (Alais, 2018).

La grasa se encuentra en forma de glóbulos, rodeados por una membrana, que están emulsionadas en el suero lácteo.

De modo análogo, en el suero lácteo se hallan dispersas las partículas de proteína de tamaños diversos denominados micelas, que están formadas principalmente por sales cálcicas de las caseínas. En el suero están disueltas partículas lipoproteicas, denominadas también microsomas lácteos, formadas por restos de membranas celulares, célula somáticas, principalmente leucocitos (10^8 /l leche).

En el suero lácteo se hallan disueltas además diferentes proteínas, carbohidratos, minerales y otros compuestos.

El punto de congelación de la leche es de -0.53 hasta -0.55°C . debido a su gran persistencia se utiliza para determinar el aguado de la leche.

1.1.2.1.2. Propiedades químicas

Gravedad específica: oscila entre $1.028 - 1.034$ expresada en grados de densidad. Al determinar la densidad de la leche con el lactodensímetro, ese valor debe ajustarse para una temperatura de 150°C , adicionando o restando el factor de corrección de 0.0002 por cada grado centígrado leído por encima o por debajo de los 150°C .

Densidad de la leche: está relacionada con la combinación de sus diferentes componentes: el agua (1.000 g/ml); la grasa (0.931 g/ml); proteína (1.346 g/ml); lactosa (1.666 g/ml) minerales (5.500 g/ml) y Sólidos no grasos (S.N.G. $=1.616 \text{ g/ml}$).

Por lo anterior la densidad de una leche entera sería aproximadamente de 1.032 g/ml , una leche descremada de 1.036 g/ml y una leche aguada tendría una densidad aproximada de 1.029 g/ml .

pH (concentración de hidrogeniones). El pH es el logaritmo del inverso de la concentración de iones de hidrógeno. Cuando la concentración de iones de hidrógeno es de 10^{-1} a 10^{-7} , corresponde a un pH de 1 a 7 es decir, medio ácido. Si la concentración de iones de hidrógeno es de 10^{-7} a 10^{-14} (pH 7 a 14) el medio será alcalino (el pH $=7$ es neutro). Dichas variaciones dependen del estado

de sanidad de la leche y de los microorganismos responsables de convertir la lactosa en ácido láctico.

Acidez: la leche cruda presenta una acidez titulable resultante de cuatro reacciones, de las cuales las tres primeras corresponden a la acidez natural de la leche cruda y la cuarta reacción corresponde a la acidez que se va formando en la leche por acción de las bacterias contaminantes.

Acidez natural se debe a:

- Acidez de la caseína anfótera, constituye cerca de 2/5 partes de la acidez natural
- Acidez de las sustancias minerales, del CO_2 y de ácidos orgánicos naturales, aproximadamente las 2/5 partes de la acidez natural.
- Reacciones de los fosfatos, cerca de 1/5 parte de la acidez natural.

La determinación de la acidez de la leche es muy importante porque puede dar lugar a determinar el grado de alteración de la leche. Regularmente una leche fresca debe tener una acidez de 0.15 a 0.16%, valores menores pueden indicar que es una leche proveniente de vacas con mastitis, aguada o que contiene alguna sustancia química alcalina. Porcentajes mayores del 0.16%, indican que la leche contiene bacterias contaminantes.

Potencial de oxidorreducción: El potencial de oxidorreducción (Eh), mide las propiedades oxidantes (+) o reductoras (-) de una solución, el cual se visualiza en la corriente eléctrica entre dos electrodos sumergidos en la solución. La leche tiene un Eh (+) entre los valores de 0.20 a 0.30 voltios. El Eh de la leche se debe al contenido de: oxígeno, sustancias reductoras naturales (reductasa aldehídica, ácido ascórbico y tratamientos tecnológicos).

La contaminación por bacterias incrementa el poder reductor de leche, ya que cuando las bacterias se multiplican hay un mayor consumo de oxígeno y producción de sustancias reductoras, reduciéndose el Eh, hasta valores negativos. Este fenómeno se utiliza para el análisis que se le hace a la leche con azul de metileno y la resazurina. La reducción del azul de metileno produce el leuco azul de metileno (incoloro) a un Eh de +0.054V y con la reducción de la resazurina (azul pizarra) se produce la resofurina (rosada) y la dihidrorresofurina (incolora), a un Eh de +0.18 y +0.19 V, la resazurina, reacciona antes que el azul de metileno y detecta la presencia de leucocitos. Mediante este método se podrá evaluar los cambios en la calidad de la leche (UNAD, 2016).

Viscosidad. La viscosidad de la leche indica la resistencia que se opone al fluido. La viscosidad es inversamente proporcional a la temperatura y depende de la composición del líquido, del estado físico de las sustancias coloidales dispersas, y del contenido de materia grasa. La leche es más viscosa que el agua y ello se debe al contenido de grasa en emulsión y a las proteínas que contiene en su fase coloidal. La viscosidad de la leche oscila entre 1.7 a 2.2 centipoises, siendo la de la leche completa de 2.2 y la de la leche descremada de 1.2. La leche homogenizada presenta un aumento en la viscosidad, entre 1.2 a 1.4 centipoises.

La viscosidad de la leche y sus productos es un dato importante en ingeniería para el cálculo de bombas que se requieren en el proceso, pero también es importante en la comercialización dado que el consumidor relaciona la viscosidad con el contenido graso de la leche.

Punto de congelación: Es una característica importante porque permite detectar la adición de agua en la leche. El punto de congelación de la leche debe oscilar entre un rango de -0.5130°C a -0.565°C

0C. Los componentes que influyen en el punto de congelación de la leche son la lactosa y las sales coloidales. El aumento de la acidez de la leche reduce la viscosidad de la leche.

Calor específico: Es el número de calorías necesarias para elevar en un grado centígrado la temperatura de una unidad de peso de la leche. Dicho valor es más alto que el del agua.

Punto de ebullición. La ebullición de la leche se inicia a partir de los 100.170C, pero cuandose reduce la presión del líquido, la ebullición ocurre a una temperatura menor. Este efecto es aplicado en la producción de leches concentradas al evaporar la leche mediante la reducción de la presión utilizando el vacío, lográndose evaporar parcialmente la leche a temperaturas entre los 50 a 700C, sin causar ningún deterioro a los componentes de la leche.

Tabla 1. Principales propiedades químicas de la leche.

Parámetro	Unidades	Mínimo	Estándar	Máximo
Densidad 20°C	g/cm ³	1.028	1.031	1.035
Extracto seco total	g/100 g	12.5	12.7	13
pH	Unid. pH	6.6	6.7	6.8
Punto crioscópico	°C	-0.51	-0.53	-0.565
Punto de ebullición	°C		100.17	
Potencial redox	Voltio		0.13	
Índice de refracción 20°C			1.338	
Calor específico	Cal/g*K	0.93	0.94	0.95
Tensión superficial 15°C	dina/cm	47	50	53
Viscosidad	cP		2.2	
Conductividad eléctrica 25°C	Ohm/cm	0.004		0.0005

1.1.3. Composición nutricional de la leche de ganado vacuno

La leche de vaca es un alimento de primera necesidad. De gran demanda por su alto valor nutricional que se refleja en sus componentes, es considerado un alimento, básico en la dieta de niños, ancianos, enfermos y en general de toda la población.

De todos los alimentos que consume el hombre, solo la leche tiene como único objetivo servir de alimento como tal. Consecuentemente, se espera que su valor nutritivo sea muy alto. La leche es un alimento casi completo, ya que solo es pobre en hierro, vitamina D y vitamina C. su riqueza en energía, proteínas de fácil asimilación, grasa, calcio, fosforo y varias vitaminas hacen de la leche un alimento básico del lactante y, en general, del niño en sus primeros cuatro años de vida, aunque también es muy importante en otras etapas de la vida.

La leche es un alimento muy complejo con más de 100,000 especies moleculares diferentes encontradas. Hay muchos factores que pueden afectar la composición de la leche tal como variaciones de la raza, variaciones de vaca a vaca, variaciones de grupo-manejo y consideraciones de alimentación, variaciones estacionales y variaciones geográficas. Con todo ello, solo se puede dar una composición aproximada de la leche (Castillo Bustos & Chavez Ariza , 2008).

Es un producto nutritivo complejo que posee más de 100 sustancias que se encuentran ya sea en solución, suspensión o emulsión en agua. Por ejemplo:

Proteínas

La proteína contenida en la leche es del 3,5% (variando desde el 2.9% al 3.9%). Esta “proteína láctea” es una mezcla de numerosas fracciones proteicas diferentes y de pesos moleculares

distintos, (ver figura 1). Las proteínas se clasifican en dos grandes grupos: caseínas (80%) y proteínas séricas (20%).

Caseína, la principal proteína de la leche, se encuentra dispersa como gran número de partículas sólidas tan pequeñas que no sedimentan, y permanecen en suspensión. Estas partículas se llaman micelas y la dispersión de las mismas en la leche se le llama suspensión coloidal.

El comportamiento de los diferentes tipos de caseína en la leche al ser tratada con calor, diferente pH (acidez) y diferentes concentraciones de sal, provee las características de los quesos, los productos de leche fermentada y las diferentes formas de leche.

La grasa y las vitaminas solubles en la leche se encuentran en forma de emulsión; esto es una suspensión de pequeños glóbulos líquidos que no se mezclan con el agua de la leche.

La lactosa (azúcar de la leche), algunas proteínas (proteínas séricas), sales minerales y otras sustancias son solubles; esto significa que se encuentran totalmente disueltas en el agua de la leche (Wattiaux).

Albumina

Es la proteína de la leche, que sigue en cantidad a la caseína, con una cifra aproximada de 0.5%. Mientras que la caseína es relativamente estable a la acción del calor, las albúminas se desnaturalizan con facilidad al calentarlas. Por esta razón durante el proceso de calentamiento a altas temperaturas se destruye gran parte de la proteína sérica.

Globulinas

Son proteínas de alto peso molecular que se encuentran preformadas en la sangre. También es posible que parte se produzca en las células del parénquima mamario. Son las proteínas que más fluctuaciones experimentan en el transcurso de un período de lactación, desde 9% al 16% del total de la proteína, que es la tasa que puede alcanzar en el calostro, disminuye hasta ser de sólo unas milésimas de dicho porcentaje en las últimas etapas de la lactancia. Los anticuerpos o inmunoglobulinas que se encuentran en el calostro son proteínas que se encuentran en el torrente sanguíneo, y hacen parte del sistema inmunológico cuya función es neutralizar y ayudar a destruir bacterias, así como otras partículas extrañas que hayan invadido el cuerpo; debido a esto se hace necesario el consumo de calostro en las primeras horas de vida del neonato (Agudelo y otros, 2005). (Agudelo Gómez, 2005).

Vitaminas

La leche contiene vitaminas como la A, D, E, K, B1, B2, B6, B12, C, carotenos, nicotinamida, biotina, ácido fólico, su concentración está sujeto a grandes oscilaciones. El calostro posee una extraordinaria riqueza vitamínica, contiene de 5 a 7 veces más vitamina C y de 3 a 5 veces más vitaminas B2, D y E que la leche normal. También influye la época del año, tiempo atmosférico, ambiente y la alimentación; este último factor repercute especialmente en los carotenos y en la vitamina A como consecuencia de la abundante ingestión de carotenos cuando la base de la alimentación son forrajes frescos.

La vitamina E por su parte es 10% más abundante en épocas en que el ganado tiene acceso a forraje más toscos, lo cual posiblemente dependa del mayor contenido graso de la leche en verano. Por lo general, la concentración de las vitaminas hidrosolubles se conserva constantemente. En la

vitamina C se observan fluctuaciones dependiendo de la alimentación. Son variadas las influencias de la manipulación de la leche sobre su contenido vitamínico ya que en el simple almacenamiento se producen pérdidas de vitaminas, dependientes de la temperatura y de las radiaciones lumínicas (Agudelo y otros, 2005).

Enzimas

Las enzimas contenidas en la leche se aprovechan para efectos de inspección y control, ya que muchas de ellas influyen en la calidad de la leche y en el origen de distintas alteraciones. Las enzimas de la leche carecen de valor desde el punto de vista alimenticio, sobre todo para los organismos ya desarrollados. Las enzimas lácteas tienen dos orígenes: las corporales y las enzimáticas. Las primeras llegan directamente a la leche -en la que se encuentran en forma libre- procedentes de la sangre, o bien de las células corporales. Pero también pueden llegar a la leche con las células. En ambos casos se trata de enzimas originadas en el organismo. Las segundas se originan en la leche misma, producto de la acción de los gérmenes.

Tabla 2. Composición general de la leche en diferentes especies (por cada 100 gr)

Nutriente (gr)	Vaca	Búfala	Mujer
Agua	88	84	87.5
Energía (Kcal)	61	97	7.0
Proteína	3.2	3.7	1.0
Grasa	3.4	6.9	4.4
Lactosa	4.7	5.2	6.9
Minerales	0.72	0.79	0.20

Nota: datos tomados de Wattiaux, Michel A. composición de la leche y valor nutricional.

Agua

El agua es la fase dispersante, en la cual los glóbulos grasos y demás componentes de mayor tamaño se encuentran emulsionados o suspendidos. Las sustancias proteicas se encuentran formando un coloide en estado de “sol” liófilo (albúmina), mientras que la lactosa y las sales se hallan en forma de solución verdadera. El peso específico de la leche oscila entre 1.027 y 1.035, con una media de 1.032. el punto de congelación se encuentra por término medio entre -0.54° y -0.55°C (valores límites: -0.51°C y -0.59°C) en virtud de la lactosa y sales disueltas; la técnica de su determinación se llama crioscopia y ha sido también adaptada en el examen de la leche para determinar posibles adulteraciones por adición de agua. También puede influir sobre el punto de congelación de la leche la acidificación, en cuyo caso el punto crioscópico disminuye. El calentamiento de la leche origina la elevación del punto de congelación (Lerche, 1969).

1.1.4. Microbiología de la leche cruda

1.1.4.1. Calidad microbiológica de la leche

Debido a su riqueza en nutrimentos, la leche es un medio de cultivo ideal para muchos microorganismos, algunos de ellos patógenos y otros que afectan las propiedades fisicoquímicas y organolépticas de la leche.

Los factores intrínsecos a la vaca como el medio ambiente, el manejo y el transporte de la leche son fuentes de contaminación de la leche si no se controlan adecuadamente.

Un estado limpio y bien manejado, el empleo de vacas sanas y las buenas prácticas de ordeño tienen un impacto positivo sobre la calidad microbiológica de la leche. Por el contrario, el estiércol, lodo y una elevada incidencia de mastitis afectan los parámetros microbiológicos de la leche.

Existen normas a nivel nacional que señalan que la cuenta máxima de bacterias mesófilas aerobias en leche apta para el consumo humano debe ser de 1,200,000 unidades formadoras de colonias (UFC/ml).

1.1.4.2. Problemas microbiológicos

La leche no pasteurizada puede contener una variedad de patógenos causantes de enfermedades, como lo demuestran numerosos estudios científicos. Estos estudios, junto con numerosos brotes transmitidos por alimentos, demuestran claramente el riesgo asociado con el consumo de leche cruda (FDA, 2018). Las Enfermedades bacterianas Transmitidas por los Alimentos (ETA) se están convirtiendo en un problema creciente de salud pública para todo el mundo, especialmente para los países en desarrollo (Fung y col., 2018). Estas pueden afectar a la población en general y están potencialmente involucrados diversos agentes biológicos, físicos y químicos (Torres y col., 2005).

El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) reporta que, desde 1993 a 2012, se registraron 127 brotes vinculados a la leche cruda o productos lácteos crudos tales como helados, queso fresco o yogur. Causaron 1,909 enfermedades y 144 hospitalizaciones. Por otra parte, la FDA señala que la mayoría de las enfermedades transmitidas por los alimentos no forman parte de los brotes reconocidos, y por cada enfermedad reportada, muchas otras ocurren. Sin embargo, las bacterias en la leche cruda pueden ser especialmente peligrosas para las personas con sistemas inmunes debilitados, (tales como pacientes de trasplante y personas con VIH/SIDA, cáncer y diabetes), niños, adultos mayores y mujeres embarazadas (FDA, 2018).

La OMS calcula que cada año mueren 1,8 millones de personas como consecuencia de enfermedades diarreicas atribuidas, en su mayoría, a la ingesta de agua o alimentos contaminados. Dicha organización es consciente de la necesidad de concienciar a los manipuladores de alimentos sobre sus responsabilidades respecto de la inocuidad de estos (WHO, 2006). La insalubridad de los alimentos ha representado un problema de salud para los humanos desde los albores de la historia, y muchos de los problemas actuales en esta materia no son nuevos. Aunque los gobiernos de todo el mundo se están esforzando al máximo por aumentar la salubridad del suministro de alimentos, la existencia de enfermedades de transmisión alimentaria y de zoonosis sigue siendo un problema de salud significativo tanto en los países desarrollados como en los países en vía desarrollo (Aguilera-Becerra y col., 2014).

La leche no es ajena al problema de insalubridad de alimentos anteriormente mencionado, desde hace miles de años la leche de vaca ha sido parte de la dieta humana, y es considerada un alimento vital en el desarrollo y crecimiento de los seres humanos. La calidad higiénica de la leche cruda es el efecto de las condiciones del entorno de la vaca en el momento del ordeño; en consecuencia, la contaminación encontrada se debe a las malas prácticas de higiene en la rutina de ordeño, las cuales favorecen el aumento de bacterias patógenas que afectan la calidad e inocuidad del producto. La producción de leche se hace con la expresa intención de proporcionar un alimento de alto valor nutritivo para el ser humano. Cada día se reconocen las cualidades de este producto en la alimentación de niños, adultos y personas de la tercera edad. Pero para que la leche cumpla con esas expectativas nutricionales debe reunir una serie de requisitos que definen su calidad: composición fisicoquímica, cualidades organolépticas y número de microorganismos presentes;

todos ellos señalados por la legislación vigente de cada país (Aguilera-Becerra y col., 2014; SSA, 2010).

En la cadena de producción de la leche, desde la finca hasta el consumidor final, es necesario cuidar todos aquellos factores que, si no se manejan adecuadamente, van a provocar deterioro del producto, con pérdidas incalculables, puesto que la leche, por ser un producto altamente perecedero, debe ser manejado correctamente desde su obtención hasta su consumo. Cada país establece parámetros mínimos permitidos en cuanto a flora bacteriana, al igual que controles de transporte y manipulación.

La leche es un alimento de alto riesgo y, por ende, uno de los de mayor impacto en la salud pública, por lo cual su producción y comercialización son objeto de una regulación que propugna su calidad e inocuidad, que se ven amenazadas desde el ordeño hasta que llega al consumidor final por peligros biológicos y químicos. La inadecuada manipulación de la leche cruda y las malas prácticas de ordeño en la producción primaria, así como la carencia o insuficiencia de enfriamiento de la leche cruda, lleva al crecimiento microbiano en menor tiempo, poniendo en riesgo a la población consumidora. Uno de los peligros más relevantes que se relacionan con el consumo de leche es la presencia de microorganismos patógenos que pueden causar alteración microbiológica en este alimento y generar ETA.

Cuando la leche se obtiene en condiciones higiénicas, y procede de vacas sanas, contiene microorganismos provenientes de la ubre y de los conductos galactóforos (Stilwell, 2003), y una vez extraída puede contaminarse en cada una de las etapas de la cadena productiva; dentro de los factores de contaminación exógena, se encuentran las heces del animal, el medioambiente, los

utensilios usados durante el proceso de ordeño, los tanques de almacenamiento, el transporte y la comercialización, así como la higiene del manipulador y el agua utilizada para los procesos de lavado y desinfección en las etapas de ordeño (Molineri y col., 2012). Cuando se ordeñan vacas enfermas, ya sea con manifestaciones clínicas o subclínicas, la leche puede venir contaminada vía endógena, con microorganismos patógenos tales como *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*.

1.1.4.3. Especificaciones sanitarias de la leche

Tabla 3. Límites máximos permisibles de algunas bacterias en la leche.

ESPECIFICACIONES	LÍMITE MÁXIMO
Mesofílicos aerobios UFC/mL	30000
Organismos Coliformes totales UFC/mL en planta	10
Organismos Coliformes totales UFC/mL en punto de venta	20
<i>Salmonella spp</i> en 25 mL	Ausente
<i>Staphylococcus aureus</i> en 25 mL	Ausente
<i>Listeria monocytogenes</i> en 25 mL	Negativo

Fuente: (SSA, 1994)



1.2. Microorganismos mesófilos aerobios

Los microorganismos mesófilos en alimentos son aquellos microorganismos que se desarrollan en presencia de oxígeno libre y a una temperatura comprendida entre 20°C y 45°C con una zona óptima entre 30°C y 40°C

El método de recuento de microorganismos mesófilos se basa en la certeza de que un microorganismo viable presente en una muestra de alimento, al ser inoculado en un medio de cultivo nutritivo sólido se reproducirá formando una colonia individual visible. Para que el conteo de las colonias sea posible se hacen diluciones decimales de la suspensión inicial de la muestra y se inocula el medio nutritivo de cultivo. Se incuba el inóculo a 30°C por 72 horas y luego se cuenta el número de colonias formadas. El conteo sirve para calcular la cantidad de microorganismos por gramo o por mililitro de alimento. (Chan, 2002)

Se debe considerar que el valor numérico obtenido puede no reflejar el número real de microorganismos viables en la muestra debido a las siguientes posibilidades:

Las células microbianas suelen agruparse formando cadenas, grumos, racimos o pares y no separarse a pesar de la homogeneización y dilución de la muestra, por tanto, una colonia puede provenir de una célula individual o de un agrupamiento bacteriano.

Las células microbianas que han sufrido graves lesiones son incapaces de multiplicarse.

Las condiciones inadecuadas de aerobiosis, nutrición y temperatura; la presencia de inhibidores y el uso incorrecto.

El recuento de microorganismos mesófilos sirve para realizar una estimación de número total de bacterias que hay en un alimento, sin identificar los diferentes tipos de gérmenes.

Esta determinación refleja la calidad sanitaria de los productos analizados indicando, además de las condiciones higiénicas de la materia prima, la forma como fueron manipulados durante su elaboración. Tiene un valor limitado como indicador de la presencia de patógenos o sus toxinas. Un recuento total de aerobios mesófilos bajo no asegura que un alimento esté exento de patógenos o de sus toxinas; tampoco un recuento total elevado significa, inevitablemente, presencia de microbiota patógena. Excepto en productos que se elaboran mediante fermentación, altos recuentos microbianos se consideran poco aconsejables para la mayor parte de alimentos. (Chan, 2002)

Su significado es diverso:

- Materia prima excesivamente contaminada.
- Deficientes métodos de manipulación durante la elaboración de los productos o platos preparados.
- Posibilidad de que entre ellos pueda haber patógenos, dado que también suelen ser mesófilos.
- Altos recuentos suelen ser signo de inmediata alteración del producto. Tasas superiores o iguales a 1.000.000 – 10.000.000 de bacterias por gramo de producto alimentario suelen ser ya inicio de descomposición.

1.2.1. *Escherichia Coli*

La *Escherichia coli* es una bacteria que se encuentra en el sistema digestivo de los animales y de los seres humanos, y al ser parte de la flora intestinal se puede utilizar como indicador favorito para detectar y medir la contaminación fecal en la evaluación de la seguridad de los alimentos y el agua (Anderson y col., 2005). Los representantes de esta especie son bacilos gramnegativos, oxidasa negativos, con un tamaño promedio de 1,1-1,5 μm de ancho y 2,0-6,0 μm de largo, para su crecimiento en laboratorio se utiliza el Agar Luria (Agar LB de Miller) (Scheutz y Strockbine, 2005). De acuerdo a sus requerimientos de oxígeno son anaerobios facultativos y pueden ser móviles por la presencia de flagelos peritricos o no móviles. Las cepas, *E. coli* serotipo O157:H7 (Entero hemorrágica, ECEH) es la más importante porque se ha considerado un patógeno emergente en relación con la salud pública por ser la causante de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) en el mundo (Sánchez y col., 2010).

Los rumiantes, y en particular el ganado bovino y ovino, son el principal reservorio de estas bacterias. Otros animales como las cabras, los cerdos, los caballos, las aves de corral, los perros y los gatos pueden actuar también como reservorio. Los animales portadores no muestran ningún signo clínico y eliminan las bacterias *E. coli* por las heces.

Tabla 4. Condiciones de crecimiento de *E. coli*

	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura	7-8	35-40	46
pH	4.4	6-7	10
Actividad del agua	0.95	0.995	---



Las bacterias *E.coli verotoxigénicas* pueden transmitirse al hombre a través de los alimentos por varias vías:

En origen: en las explotaciones ganaderas por una inadecuada falta de higiene:

A través del contacto directo con animales o canales infectadas con *E.coli*.

Indirectamente a través de los alimentos de origen animal y del agua contaminados (contaminando a su vez a cultivos de vegetales). La presencia de *E.coli* en los alimentos de origen animal es debida a contaminación de origen fecal.

En proceso por falta de higiene e inadecuada manipulación de los alimentos:

- Contaminación cruzada en los mataderos y en las fases posteriores de transformación de los alimentos, y en la preparación y cocinado de los alimentos en el hogar.
- Personas: Los manipuladores de alimentos pueden ser portadoras de *E.coli*, de forma que al manipular los alimentos, sin tener en cuenta unas buenas prácticas de higiene, contaminan los alimentos.
- Agua: El agua de riego puede estar contaminada con estiércol (que contiene *E.coli* procedente de las heces de los animales), transmitiéndose a las frutas y verduras frescas regadas con dicho agua.

También es muy importante la transmisión secundaria de persona a persona, sobre todo en el ámbito familiar, escolar y de centros de atención de personas mayores (Elika, 2013).

1.2.1.1. La toxiinfección alimentaria por *E. coli*

La infección que provoca *E.coli* es una zoonosis (enfermedades transmitidas de animales a humanos) de origen alimentaria, es decir que se transmite a los humanos a través del consumo de los productos alimenticios contaminados con *E.coli*.

La mayor parte de las *E. coli* son inocuas, pero las cepas productoras de toxina Shiga o verotoxigénicas pueden provocar cuadros gastrointestinales graves. En los adultos sanos, los síntomas suelen ser diarrea grave, a menudo sanguinolenta, acompañada de cólicos abdominales, sin fiebre o con fiebre moderada, que suelen aparecer dos o tres días después del consumo del alimento contaminado, y los afectados se recuperan de la infección en el plazo de una semana (elika, 2013).

1.2.2. *Salmonella spp.*

El género *Salmonella* se halla encuadrado dentro de las gamma-Proteobacterias, en el orden Enterobacteriales, pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Su morfología es similar a las demás enterobacterias, es decir, bacilos cortos gram-negativos no esporulados. Se trata de bacterias anaerobias facultativas, oxidasa negativa (Kauffman, 1972). Los miembros del género crecen en un amplio abanico de temperaturas (7 - 48° C), a un pH entre 4 y 7, y con actividad de agua por debajo de 0,93, y lo hacen de forma rápida en medios de cultivo en atmósferas tanto aeróbicas como anaeróbicas (Vadillo y col., 2002). La NOM-114-SA1- 1994 indica que medios de aislamiento donde crece esta bacteria son: agar verde brillante, el agar con sulfito bismuto y el agar xilosa lisina desoxicolato (SSA, 1994).

Cuando las bacterias *Salmonella* pasan de los animales hospedadores a los alimentos derivados (carne, huevos, leche) es capaz de multiplicarse a una velocidad muy elevada, ya que puede duplicar su número cada 15 ó 20 minutos si la temperatura es elevada (superior a 20° C), y más significativamente, si la temperatura ambiente supera los 30°C, ya que su temperatura óptima de crecimiento es de 30-37°C (elika, 2013).

Se han descrito más de 2.500 serotipos de *Salmonella* que muestran una gran adaptación para el crecimiento en el hombre y los animales. Los serotipos más importantes desde el punto de vista de la Seguridad Alimentaria son Enteritidis y Typhimurium. En Europa, el serotipo Enteritidis se ha convertido en el predominante, principalmente asociado al consumo de huevos o carne de pollo contaminados. *S. Typhimurium* es el segundo serotipo más común después de *S. Enteritidis* en muchos países, siendo las principales fuentes de infección el ganado vacuno y porcino, aunque también se aísla en aves, y ganado ovino y caprino (elika, 2013).

1.2.2.1. Salmonelosis

La Salmonelosis es una enfermedad zoonótica infecciosa, transmitida a través de una gran variedad de alimentos y muy asociada a carnes y subproductos de aves de corral, incluidos los huevos. Rara vez es mortal, excepto en niños muy pequeños, ancianos e inmunocomprometidos- aunque la morbilidad y los costos derivados pueden ser altos.

La **salmonelosis** generalmente se autolimita en personas sanas con sistema inmune intacto. La mortalidad es menor al 1 %, aunque en el caso de *Salmonella* Enteritidis esta tasa es un poco mayor. Los **síntomas** son: náuseas, vómitos, dolores abdominales, diarrea, fiebre, dolor de cabeza; comienzan entre 6 y 72 horas después de la exposición y duran de 4 a 7 días, dependiendo de factores del huésped, dosis ingerida y características de la cepa. La enfermedad puede presentar las

siguientes *complicaciones*: deshidratación que puede llevar a la muerte en los niños, los ancianos y los inmunocomprometidos si no son tratados con rapidez, septicemia o abscesos localizados en órganos internos y/o articulaciones.

también artritis reactiva (como respuesta autoinmune) que se puede presentar 3 a 4 semanas después del comienzo de los síntomas agudos (RENAPRA, 2015).

1.2.3. *Listeria Monocytogenes*

Las bacterias pertenecientes al género *Listeria* son bacilos gram-positivos cortos, regulares, no esporulados ni ramificados, que suelen observarse en disposición individual o formando cadenas cortas. En cultivos viejos pueden aparecer formando filamentos de 6-20 mm de longitud. Presentan de 1 a 5 flagelos peritricos que le confieren movilidad a 28°C. Las colonias son pequeñas (de 1 a 2 mm tras uno o dos días de incubación) y lisas. La temperatura óptima de crecimiento de *L. monocytogenes* es de 30–37° C, pero puede sobrevivir entre 0 y 45°C. *L. monocytogenes* puede multiplicarse a temperaturas de refrigerador, es resistente a los desinfectantes y se adhiere a varias superficies. *Listeria* spp. son anaerobias facultativas, catalasas positivas y oxidasas negativas. Las reacciones de Voges-Proskauer y rojo de metilo son positivas. Hidrolizan la esculina en pocas horas, pero no la urea, no producen indol ni SH₂. Producen ácido de la D-glucosa y de otros azúcares (Meloni, 2014).

El género *Listeria* está constituido por seis especies, *Listeria innocua*, *Listeria weishimeri*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria grayi*, *Listeria murrayi*. Únicamente dos especies de este

género son patógenas: *L. monocytogenes* asociada con infección en humanos y animales y *Listeria ivanovii* asociada únicamente con infección en animales (Seeliger y Jones, 1986).

1.2.4. *Staphylococcus Aureus*

El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula y son anaerobias facultativas (Crossley y col., 2009). La mayoría de los estafilococos producen catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre); característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativa. *S. aureus* crece bien en medios de cultivos no selectivos, como el agar sangre, agar chocolate, Baird-Parker, agar cerebro corazón infusión agar (BHI, por sus siglas en inglés) y medios líquidos para hemocultivo donde se recupera fácilmente (Compernelle y col., 2007).

Staphylococcus aureus es una bacteria muy resistente en el medio ambiente y ampliamente distribuida en la naturaleza que puede encontrarse en el aire, agua, residuos, maquinaria y superficies de la industria alimentaria, pero su principal reservorio son los animales y humanos, encontrándose en la piel, cabello, fosas nasales y garganta.

En consecuencia, pueden transmitirse a una amplia gama de alimentos, principalmente alimentos derivados de animales (leche, carne y huevos y los productos derivados) y alimentos consumidos en crudo (frutas, verduras, etc) (elika, 2013).

Muchas de las 32 especies y subespecies del género *Staphylococcus* pueden encontrarse en los alimentos por contaminación medioambiental, humana y animal.

No obstante, las enterotoxinas estafilocócicas son producidas principalmente por *Staphylococcus aureus*, pero también por *S. intermedius*, *S. hyicus* y *S. delphini*, y actualmente se han identificados 16 tipos de dichas toxinas (elika, 2013).

Límites legales

Tabla 5. Límites máximos permisibles de *Staphylococcus aureus* en productos y subproductos de la leche.

Alimento	Límite microbiológico máximo permitido	Fase en la que se aplica el criterio
Quesos, leche en polvo y suero en polvo, tal como se contempla en los criterios para los estafilococos coagulasa positivos	No detectado en 25 gr	Productos comercializados durante su vida útil

1.2.4.1. Toxiinfección alimentaria producida por *Staphylococcus aureus*

Las enterotoxinas estafilocócicas son causa frecuente de un número elevado de brotes de toxiinfección alimentaria. Los síntomas característicos de la intoxicación estafilocócica son náuseas, vómitos, dolores estomacales y abdominales y ocurren rápidamente (1-6h) tras la ingesta del alimento contaminado.

Grupos de riesgo: la deshidratación ligada a los síntomas gastrointestinales hace que sea de especial importancia en personas con el sistema inmunitario débil (bebés y niños menores de 5, personas mayores de 60 años, y enfermos de cáncer, diabéticos, portadores del VIH, pacientes tratados con corticosteroides y otros grupos de riesgo) donde puede desencadenar problemas más graves: des-hidratación, dolor de cabeza, calambres musculares, alteración de la presión sanguínea y coronaria (elika, 2013).

1.3. ADN

1.3.1. Definición, estructura y función.

El ADN es el constituyente de los genes y por ello el portador de la información genética. Con la replicación del ADN en el proceso celular los caracteres genéticos pasan a las células descendientes que reproducen cadenas de ADN con una estructura complementaria de las originales, lo que permite la obtención de dobles cadenas de ADN en las células hijas, idénticas a las parentales de la célula original (Illana, 2014) (Illana).

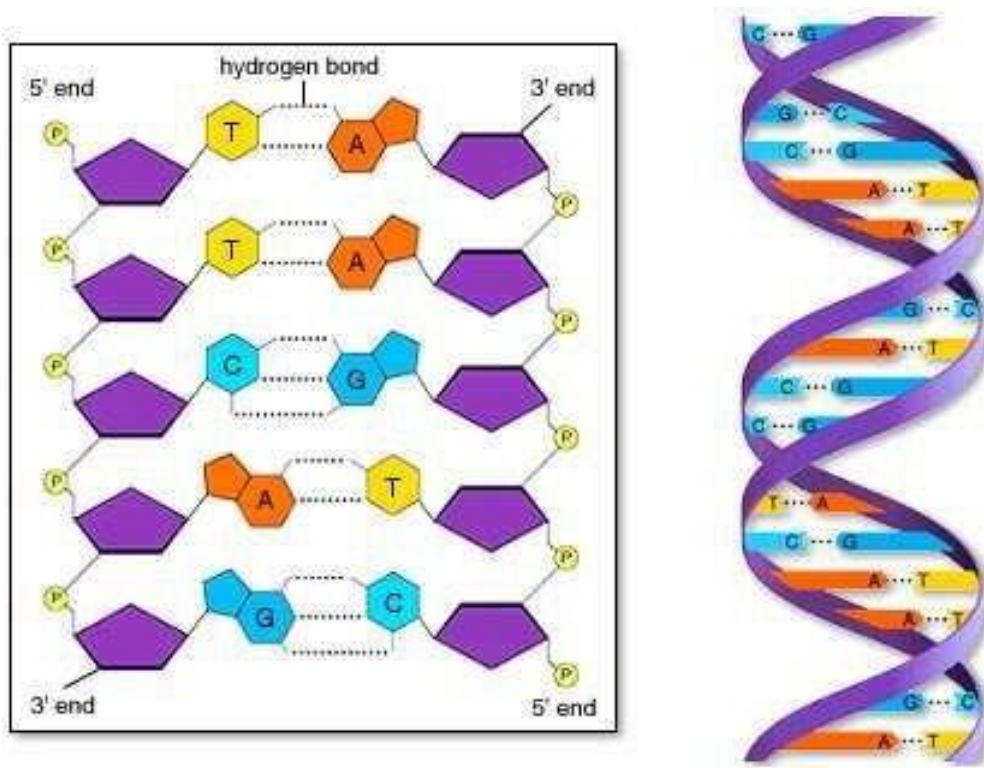
El DNA es una doble hélice, entrelazada y sumamente larga que almacena información genética. Sus componentes se ordenan con una relación química específica, lo que determina la estructura tridimensional del DNA del cual derivan consecuencias funcionales. En la doble



hélice, las bases enfrentadas se aparean y permanecen unidas por puentes de hidrogeno. Las bases apareadas deben ser siempre combinaciones de una purina con una pirimidina. No solamente las purinas no pueden aparearse con purinas, ni las pirimidinas con pirimidinas, sino que, a causa de las estructuras particulares de las bases, la adenina solo se aparea con la timina, formando dos puentes de hidrogeno ($A=T$) y la guanina solamente con la citosina, formando tres puentes de hidrogeno ($G=C$). Las bases apareadas son complementarias, y además cumplen con la denominada “Ley de Chargaff”, que dice que la cantidad de adenina (A) es igual que la de timina (T) y que la de guanina (G) es igual que la de citosina (C): $A=T$ y $G=C$, pero el número de $A+T$ y el de $G+C$ no son iguales entre sí (Brandan, 2011).

Figura 2.

Estructura del ADN. Modelo de doble hélice del ADN.



Las dos cadenas corren en direcciones opuestas, es decir, la dirección desde el extremo 5'al 3' de cada cadena es opuesta y se dice que las cadenas son antiparalelas. Aunque los nucleótidos dispuestos a lo largo de una cadena de la doble hélice pueden presentarse encualquier orden, su secuencia determina el orden de los nucleótidos en la otra cadena. Esto es necesariamente así, porque las bases son complementarias (G con C y A con T).

La función principal de la secuencia de bases a lo largo de la hebra de DNA es almacenar y transmitir durante generaciones la “memoria genética” para codificar la síntesis de todas las proteínas (proteoma) del cuerpo humano (Brandan, 2011).

1.3.2. Replicación del ADN

Es el proceso por el cual se copia cada cadena del DNA para dar origen a una nueva cadenade DNA complementaria. Esto ocurre en cada división celular y asegura que la información genética sea transmitida a ambas células hijas. La síntesis de DNA involucra la acción altamente coordinada de muchas proteínas que se encuentran en un complejo denominado replisoma. Durante la replicación cada cadena de DNA sirve como molde para la formaciónde una nueva cadena. Esto se conoce como replicación semi conservadora. También existe replicación durante la recombinación y la reparación del DNA dañado (Brandan, 2011).

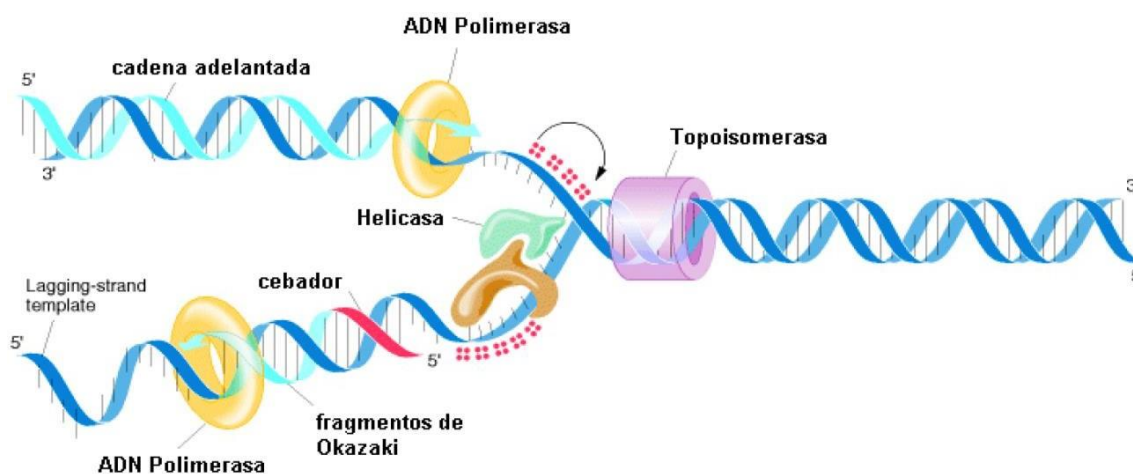
La replicación del DNA comienza en una secuencia de nucleótidos particular en el cromosoma: el origen de la replicación. Ocurre bidireccionalmente por medio de dos horquillas de replicación que se mueven en direcciones opuestas. Las enzimas helicadas desenrollan la doble hélice en cada horquilla de replicación y proteínas de unión a cadena



simple estabilizan las cadenas separadas. Otras enzimas, las topoisomerasas, relajan el súper enrollamiento de la hélice, ya que cortan las cadenas por delante de las horquillas de replicación y luego las vuelven a unir (Brandan, 2011).

Figura 3

Proceso de replicación del ADN a nivel celular.



Nota: Horquilla de replicación del ADN con algunas de las proteínas más importantes que participan en el proceso. La molécula original de ADN sirve de molde para que la ADN polimerasa genere una nueva copia de un fragmento de ADN.

En el proceso de replicación del DNA se pierden nucleótidos en los extremos de las moléculas de DNA lineales. En algunas células eucarióticas, esta pérdida es compensada por la actividad de la enzima telomerasa. En el curso de la síntesis de DNA, la DNA polimerasa corrige los errores, retrocediendo cuando es necesario para eliminar nucleótidos que no estén correctamente apareados con la cadena molde. Otros errores en el DNA ocurren en forma independiente del proceso de replicación y son usualmente reparados por distintos mecanismos. Los nucleótidos, antes de ser incorporados a las cadenas crecientes de DNA, se encuentran en

forma de trifosfatos. La energía requerida para impulsar la replicación proviene de la eliminación de dos fosfatos "supernumerarios" y la degradación del enlace $P \sim P$ (Brandan, 2011).

1.4. Métodos moleculares para la detección de microorganismos patógenos

En la actualidad, las técnicas moleculares para la identificación de agentes microbiológicos están teniendo un auge muy importante debido a: (i) la alta especificidad que presentan (pueden detectar sólo la molécula o microorganismo de interés); (ii) su sensibilidad (son capaces de detectar la presencia de un solo microorganismo); y (iii) su rapidez (se puede identificar un microorganismo en menos de 24 horas). Además, el uso de técnicas moleculares permite estudiar las poblaciones microbianas sin hacer aislamientos, por tanto, se evitan los sesgos que pueden surgir con el método basado en el cultivo de microorganismos (Babalola, 2003).

Existe una amplia variedad de técnicas moleculares que se han propuesto para la detección de microorganismos de interés en diferentes áreas, que van desde la detección de la microbiota en suelo, hasta la caracterización e identificación molecular de levaduras en bebidas fermentadas. Sin embargo, nos vamos a centrar únicamente en los métodos moleculares basados en la detección de los ácidos nucleicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR del inglés: polymerase chain reaction).

1.4.1. Técnicas de PCR

Los métodos tradicionales para la detección de patógenos en alimentos basados en el cultivo, han sido los más utilizados desde que Robert Koch y posteriormente sus discípulos, comenzaron a utilizar medios de cultivos sólidos para el aislamiento y purificación de microorganismos. El desarrollo de la PCR a finales de los años 80, supuso una revolución para la detección, identificación y tipificación de microorganismos. Su potencial aplicación para la detección de patógenos se puso de manifiesto a principios de los 90, con el desarrollo de los primeros cebadores específicos para la de detección de *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli* y *Shigella*. Dichos cebadores se utilizan para la detección de los patógenos en muestras inoculadas como, por ejemplo: *Salmonella* en aves de corral o *E.coli* en aguas y quesos, y *L.monocytogenes* en muestras de alimentos de contaminación natural. Posteriormente el desarrollo de las nuevas tecnologías de PCR a tiempo real ha potenciado el interés en la aplicación de la PCR en alimentos ya que el sistema de detección de los amplicones permite la automatización del proceso, además de aumentar el nivel de detección e incluso facilitar la cuantificación de patógenos.

Los principales avances en los ensayos de detección de patógenos en alimentos, basados en ácidos nucleicos, se produjeron a partir de 1980. (Wallace y col., 2000). Los primeros métodos de identificación molecular fueron la hibridación ADN-ADN, el análisis de secuencias del ADNr 16S, la hibridación con una sonda específica y el análisis RFLP o ribotipificación. En contraste con las características fisiológicas y bioquímicas, la identificación molecular se basa en la composición constitutiva de los ácidos nucleicos más que en los productos de su expresión. Estos métodos moleculares se utilizan a menudo en asociación con la identificación microbiológica convencional. Existen diversas técnicas moleculares útiles para la detección de patógenos por alimentos.

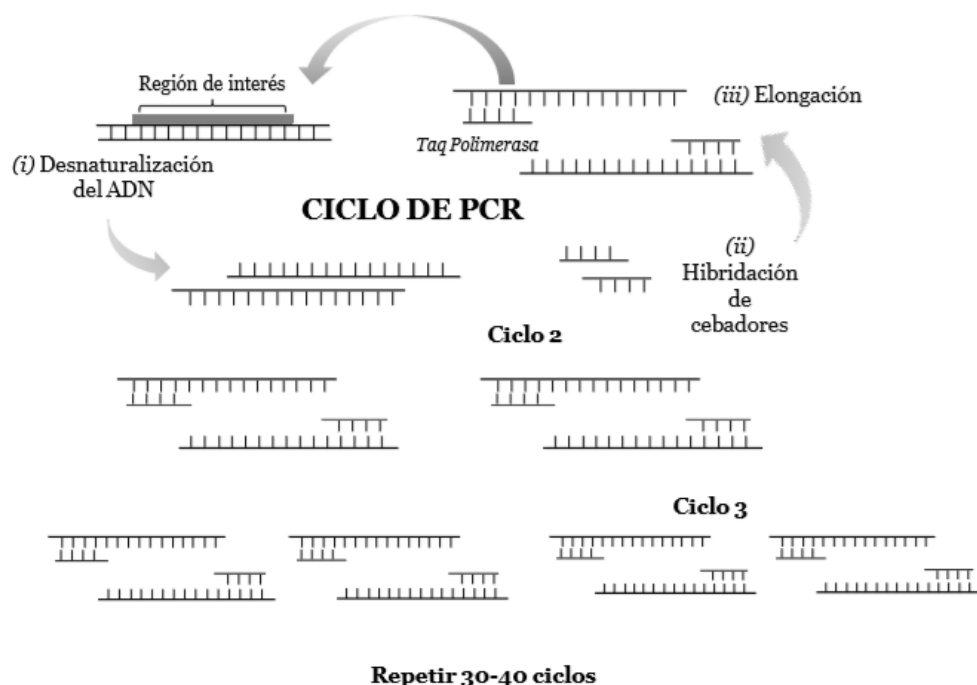
1.4.2. Historia de la PCR

La PCR surgió en 1971 cuando Gobind Khorana describe la técnica al explicar la replicación de un fragmento de ADN usando dos iniciadores. Pero fue en 1983 cuando Kary Mullis y sus compañeros de la compañía californiana Cetus Corporation la llevaron a cabo por primera vez mientras trabajaban en la fabricación de oligonucleótidos y en el uso de iniciadores para la secuenciación de ADN. Mullis y colaboradores usaron dos iniciadores que se alineaban con cada una de las hebras del ADN, adicionaron ADN polimerasa I de *Escherichia coli* y nucleótidos trifosfatados. Como resultado obtuvieron la replicación exponencial del fragmento de ADN flanqueado por los iniciadores. En un principio, para llevar a cabo el ciclo de PCR, se calentaba la mezcla en baño María, pero cuando llegaba a más de 90°C para desnaturalizar la doble hélice, la ADN polimerasa de *E. coli* se inactivaba. Por este motivo, cada que se calentaba a estas temperaturas se tenía que adicionar nueva enzima a la mezcla. El proceso original era poco eficiente, utilizaba grandes cantidades de ADN polimerasa y necesitaba de supervisión durante todo el proceso (Serrato, 2008).



Figura 4

Ciclo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).



El elemento que mejoro la técnica fue el descubrimiento del ADN polimerasas termoestables y termoactivas (que no pierden su actividad con temperaturas altas). En 1976 se aisló la primera polimerasa termoestable conocida como Taq polimerasa, a partir de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive en ambientes acuáticos con temperaturas cercana a los 100 °C. Esta nueva enzima permitió la simplificación y automatización de la PCR, sin necesidad de adicionar polimerasa en cada uno de los ciclos (Serrato, 2008).

La Taq polimerasa es la enzima más utilizada en la PCR, pero presenta la desventaja de que no tiene actividad “correctora” (actividad nucleasa 3' → 5'), por lo que existe la probabilidad de introducir errores durante el copiado del ADN. Afortunadamente, se han encontrado ADN polimerasas termoestables, termoactivas y de alta fidelidad (con actividad “correctora”)

provenientes de bacterias del dominio Archaea, como la ADN polimerasa Pfu de *Pyrococcus furiosus* (Serrato, 2008).

En la actualidad, para llevar a cabo la PCR, únicamente se necesita mezclar en micro tubos el ADN molde, la ADN polimerasa; los desoxirribonucleótidos adenina (dATP), guanina (dGTP), citosina (dCTP) y timina (dTTP); una solución amortiguadora; un cofactor de la polimerasa (regularmente se usa magnesio) y los iniciadores (Anexo 1). La reacción se efectúa en equipos conocidos como termocicladores que se programan para que produzcan los ciclos de temperatura a los que se realiza la amplificación (Serrato, 2008). (Serrato, 2008)

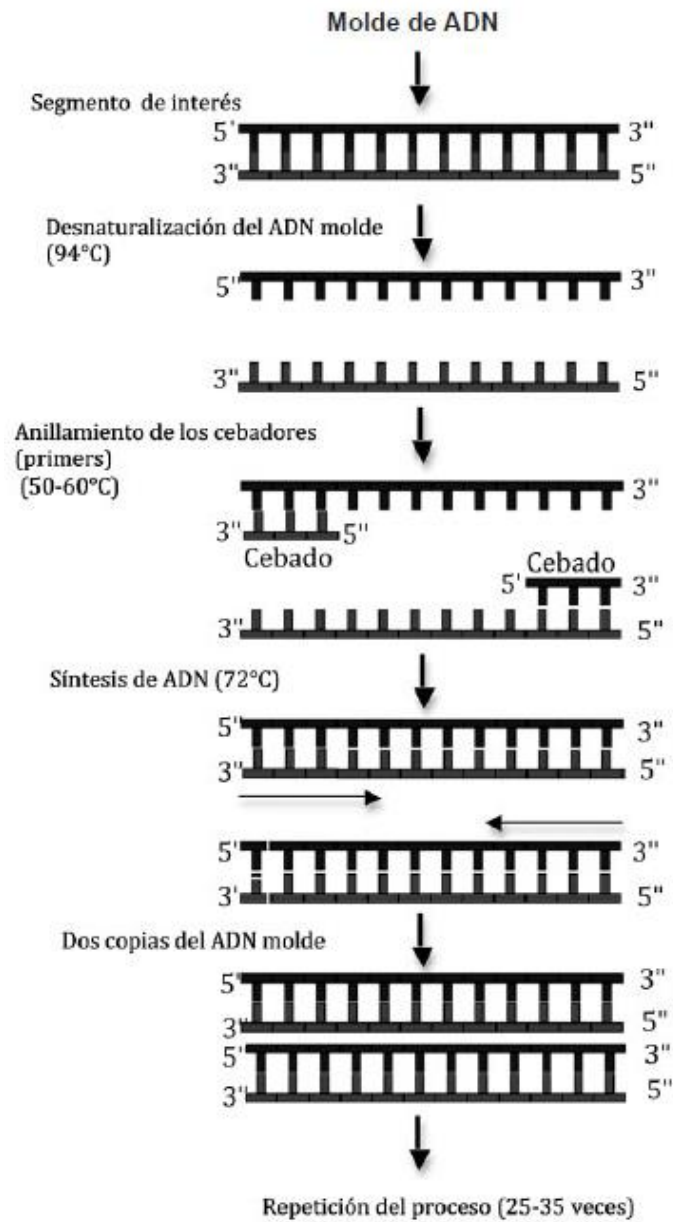
1.4.3. Definición

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es la técnica de diagnóstico molecular cuya sencillez, rapidez y sensibilidad supera con creces a las técnicas empleadas hasta su descubrimiento. Es un método enzimático que nos permite amplificar un fragmento específico de DNA. Para ello se utilizan primers cuya secuencia es complementaria a los extremos del fragmento que pretendemos amplificar y que por lo tanto confiere especificidad (Palomino Camargo y Gonzales Muñoz, 2014).

Por lo general, el objetivo de la PCR es producir suficiente ADN de la región blanco para que pueda analizarse o usarse de alguna otra manera. Por ejemplo, el ADN amplificado por PCR se puede secuenciar, visualizar por electroforesis en gel o clonar en un plásmido para otros experimentos. (Greif, 2013).

Figura 5

Etapas del PCR



La técnica de PCR se basa en el principio de complementariedad de bases del ADN y en la participación de la enzima polimerasa que permite la extensión del fragmento a amplificar, agregando nucleótidos en secuencia complementaria al ADN molde por medio de un proceso cíclico que comprende tres pasos: desnaturalización, hibridación y extensión.

1.4.4. Taq Polimerasa

Al igual que la replicación de ADN en un organismo, la PCR requiere de una enzima ADN polimerasa que produzca nuevas cadenas de ADN mediante el uso de las cadenas existentes como molde. La ADN polimerasa que normalmente se utiliza en la PCR se llama Taq polimerasa, por la bacteria tolerante al calor de la que se aisló (*Thermus aquaticus*). *T. aquaticus* vive en aguas termales y fuentes hidrotermales. Su ADNpolimerasa es muy termoestable y su mayor actividad se presenta cerca de los 70°C (temperatura a la que la ADN polimerasa de ser humano o de *E. coli* no funcionaría). La Taq polimerasa es ideal para la PCR gracias a esta estabilidad térmica. Como veremos, laPCR utiliza altas temperaturas repetidamente para desnaturalizar el molde de ADN o separar sus cadenas (Greif, 2013).

1.4.5. Primers para PCR

Al igual que otras ADN polimerasas, la *Taq* polimerasa solo puede hacer ADN si hay un cebador, una corta secuencia de nucleótidos que proporciona un punto de partida para la síntesis de ADN. En una reacción de PCR, la región de ADN que será copiada, o amplificada, se determina por los cebadores que él o la investigadora elija (Greif, 2013).



Los cebadores para PCR son pedazos cortos de ADN de cadena sencilla, generalmente de unos 20 nucleótidos de longitud. En cada reacción de PCR se utilizan dos cebadores que están diseñados para flanquear la región blanca (la región que debe ser copiada). Es decir, les agregan secuencias que harán que se unan a cadenas opuestas del molde de ADN solo en los extremos de la región a copiar. Los cebadores se unen al molde mediante complementariedad de bases (Greif, 2013).

1.4.6. Pasos de la PCR

Los ingredientes clave para una reacción de PCR son *Taq* polimerasa, cebadores, ADN molde y nucleótidos (los bloques básicos del ADN). Los ingredientes se colocan en un tubo, junto con los cofactores que necesite la enzima, y se someten a ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento que permiten la síntesis del ADN (Serrato, 2008).

Los pasos básicos son:

- **Desnaturalización** (96°C): la reacción se calienta bastante para separar, o desnaturalizar, las cadenas de ADN. Esto proporciona los moldes de cadena sencilla para el siguiente paso.
- **Templado** (55 – 65°C): la reacción se enfría para que los cebadores puedan unirse a sus secuencias complementarias en el molde de ADN de cadena sencilla.
- **Extensión** (72°C): la temperatura de la reacción se eleva para que la *Taq* polimerasa extienda los cebadores y sintetice así nuevas cadenas de ADN.

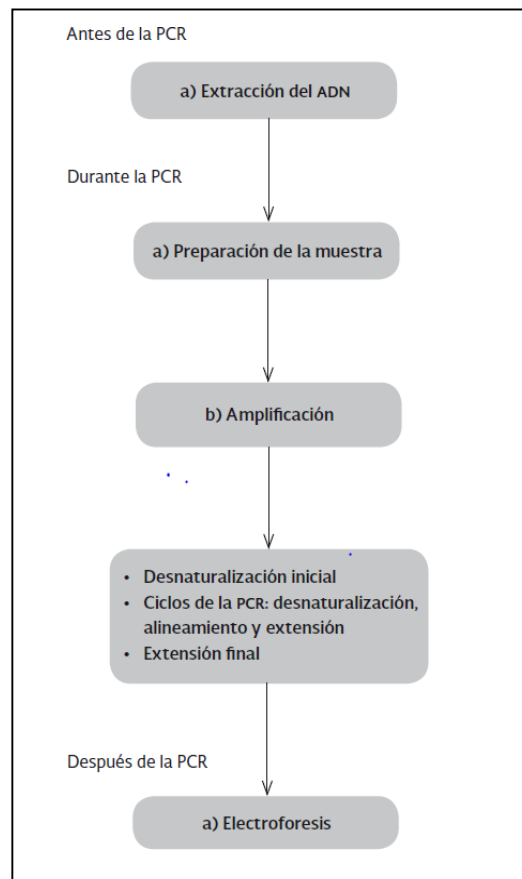
Este ciclo se repite 25 – 35 veces en una reacción de PCR típica, que generalmente tarda 2 - 4 horas, según la longitud de la región de ADN que se copia. Si la reacción es eficiente (funciona bien), puede producir miles de millones de copias a partir de una o unas cuantas copias de la región blanco (Serrato, 2008).



Eso es porque no solo se usa el ADN original como molde en cada ciclo. En realidad, el nuevo ADN que se produce en una ronda puede servir como molde en la siguiente ronda de síntesis de ADN. Hay muchas copias de los cebadores y muchas moléculas de *Taq* polimerasa flotando en la reacción, por lo que el número de moléculas de ADN casi puede duplicarse en cada ciclo. La siguiente imagen muestra este patrón de crecimiento exponencial (Serrato, 2008).

Figura 6

Etapas de la técnica PCR



1.4.7. PCR convencional

El proceso de detección de un microorganismo patógeno por amplificación genética se desarrolla de manera habitual en tres etapas (Figura 4). La primera etapa consiste en la extracción y purificación del ADN del microorganismo de la muestra, seguido de la amplificación de un segmento seleccionado del genoma del microorganismo mediante PCR. Finalmente, en la tercera etapa se lleva a cabo la detección de los fragmentos amplificados en la PCR (amplicones) por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de Etidio. Una vez teñido, al exponer el gel a la luz ultravioleta, los electrones del bromuro de Etidio se estimulan produciendo fluorescencia, pudiéndose así visualizar los fragmentos de la secuencia de ADN que hemos amplificado. En general todo este proceso suele durar aproximadamente 24 h (Tagu y Moussard, 2006).

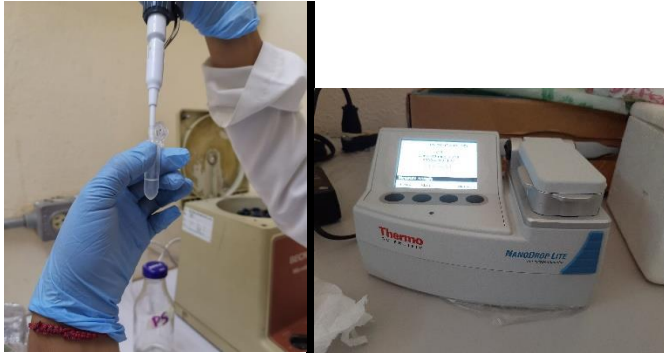
Una de las ventajas de la PCR convencional es su alta especificidad y sensibilidad para detectar microorganismos, siendo una herramienta útil para la detección de varios ACBs tales como: bacterias, levaduras y hongos. Sin embargo, no permite llevar a cabo un análisis cuantitativo. Por ello, se han diseñado técnicas basadas en la PCR complementados con métodos microbiológicos como: recuento en placa en medios selectivos, para la detección y cuantificación de dos cepas de A.



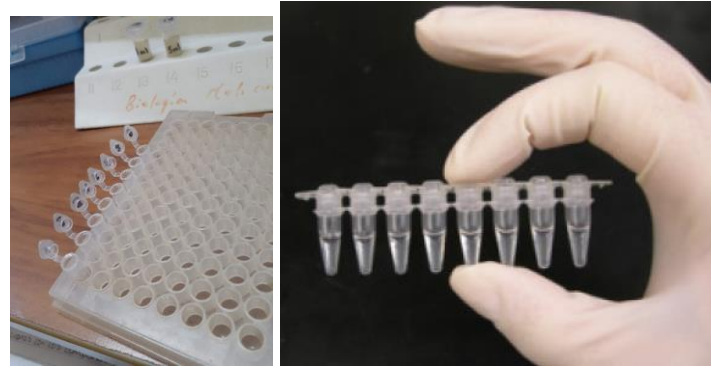
Figura 7

Etapas de la PCR convencional dentro del laboratorio.

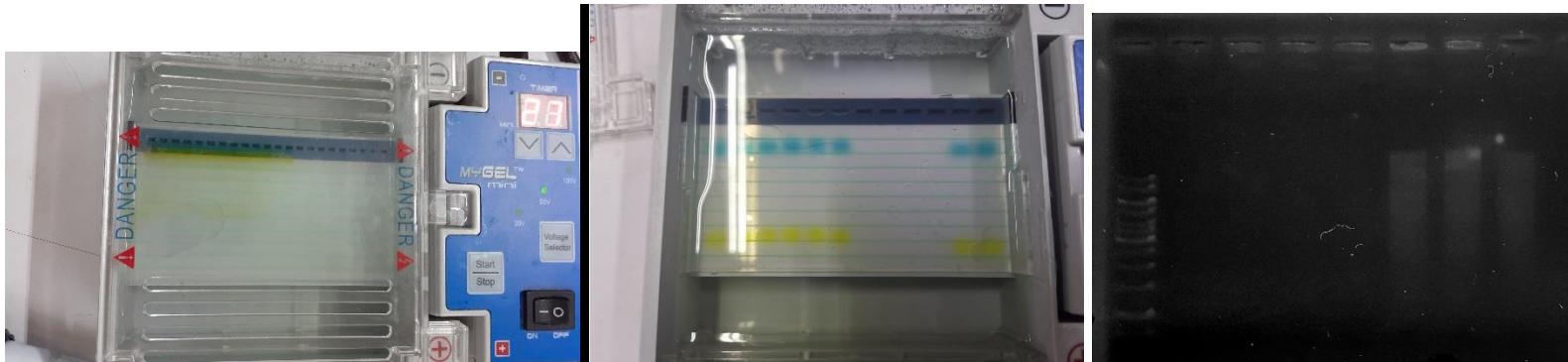
Etapa 1. Extracción y cuantificación de ADN



Etapa 2. Amplificación mediante PCR



Etapa 3. Electroforesis en gel de agarosa y visualización de productos de amplificación.



Fuente: propia del autor



1.4.9. Aplicaciones y limitaciones de la PCR

Mediante el uso de la PCR, una secuencia de ADN se puede amplificar millones o miles de millones de veces y producirá suficientes copias de ADN para que se analicen mediante otras técnicas. Por ejemplo, el ADN se puede visualizar por electroforesis en gel, enviara secuenciar o digerir con enzimas de restricción y clonar en un plásmido.

La PCR se utiliza en muchos laboratorios de investigación, y también tiene aplicaciones prácticas en medicina forense, pruebas genéticas y diagnósticas. Por ejemplo, la PCR se utiliza para amplificar genes asociados con trastornos genéticos a partir del ADN de los pacientes (o de ADN fetal, en el caso de pruebas prenatales). La PCR también puede utilizarse para detectar el ADN de una bacteria o un virus en el cuerpo de un paciente: si el patógeno está presente, es posible amplificar regiones de su ADN de una muestra de sangre o tejido (Academy, 2016).

1.5. Electroforesis

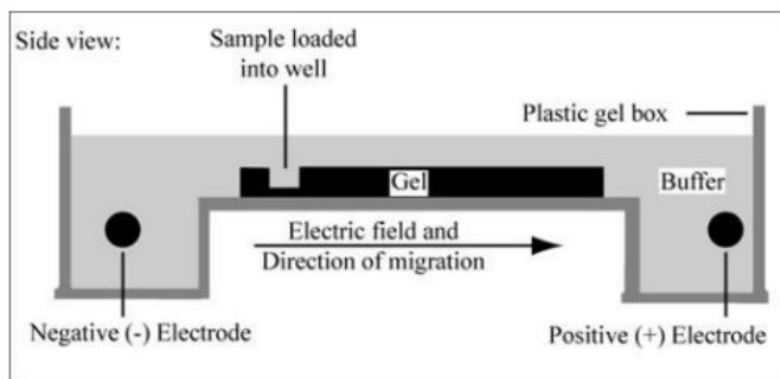
1.5.1. Definición

La electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida es una de las metodologías más utilizadas en el laboratorio en todo lo relacionado con el trabajo con ácidos nucleicos. Mediante la electroforesis podemos separar fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño, visualizarlos mediante una sencilla tinción, y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, teniendo una estimación de su concentración y grado de pureza. Podemos además extraer del gel los fragmentos de ADN que sean de interés, para posteriormente utilizarlos en diferentes aplicaciones (Fierro, 2014).



La electroforesis de ADN fue, y sigue siendo, una herramienta de importancia primordial en el desarrollo de las técnicas del ADN recombinante o ingeniería genética. La idea de utilizarla técnica de electroforesis a través de una matriz para analizar muestras de ADN corresponde a Vin Thorne, un bioquímico del Instituto de Virología de Glasgow, quien a mediados de los años 60 del pasado siglo estaba interesado en caracterizar las distintas formas de ADN que se obtenían de partículas purificadas de polyomavirus. Su razonamiento era que una combinación de fuerzas eléctricas y de fricción permitiría el desplazamiento y separación en función del tamaño o topología de diferentes moléculas de ADN. Este es exactamente el principio en que se basa la electroforesis de ácidos nucleicos. Sometidos a un campo eléctrico, la carga neta negativa del ADN y el ARN hará que estos se muevan en dirección al ánodo. Si se fuerza a los ácidos nucleicos a moverse a través de un gel formado por una malla tridimensional de un polímero como la agarosa, la fricción hará que las moléculas de mayor tamaño migren con más lentitud, mientras las de menor tamaño avanzan más en el gel, permitiendo que las diferentes moléculas se separen en función de su tamaño. Del mismo modo, moléculas de ADN o ARN con topologías o estructuras tridimensionales diferentes también se comportarán de forma diferente ante la fricción con la malla del polímero, permitiendo su separación (Fierro, 2014).

Figura 8. Sistema de electroforesis de ADN en geles de agarosa.



En el caso de los geles de agarosa, se le añade bromuro de etidio, sustancia que se intercala entre las bases del DNA y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta. Tras la electroforesis, se visualiza el gel con una lámpara de luz UV, y se verán las bandas correspondientes a las muestras de DNA aplicado y los marcadores de peso molecular. (Fierro).

1.5.2. Componentes de la electroforesis en gel de Agarosa

1.5.2.1. Agarosa

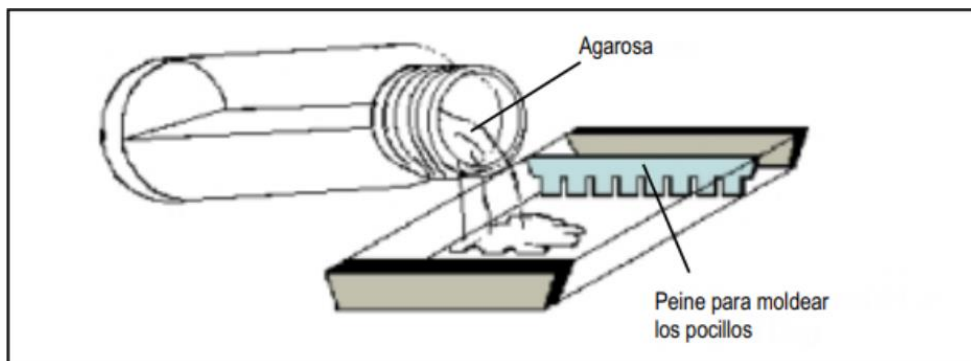
(Soma)La agarosa, coloide natural que se extrae de las algas, es un polisacárido lineal (con un peso molecular medio de ~12 000 Da) formado por la repetición de la unidad básica, la agarobiosa, que comprende unidades alternadas de galactosa y 3,6- anhidrogalactosa.

Los geles de agarosa permiten una electroforesis rápida, pero con una resolución limitada por cuanto las bandas que se forman en los geles tienen tendencia a ser difusas y a esparcirse. Ello obedece al tamaño de los poros y no puede controlarse. Los geles de agarosa se obtienen por suspensión de agarosa seca en polvo en un tampón acuoso, tras lo cual se hace hervir la mezcla hasta que la agarosa se funde y se convierte en una solución transparente. A continuación, se vierte esta solución en un molde para gel y se deja enfriar a temperatura ambiente hasta que se forma un gel rígido. Al endurecerse, la agarosa forma una matriz cuya densidad viene determinada por su concentración (Soma, 2017).



Figura 9

Preparación de la cámara de electroforesis para ADN en geles de agarosa.

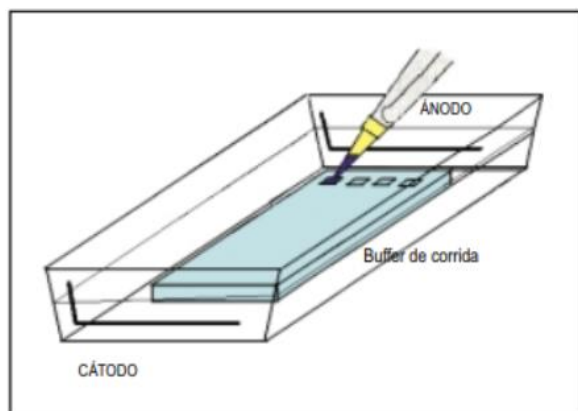


1.5.3. Uso de la electroforesis

Habitualmente, los resultados de una reacción de PCR se visualizan (se hacen visibles) al usar electroforesis en gel. La electroforesis en gel es una técnica en la que una corriente eléctrica impulsa fragmentos de ADN a través de una matriz de gel y los fragmentos de ADN se separan según su tamaño. Típicamente se incluye un estándar, o marcador de peso molecular, para que pueda determinarse el tamaño de los fragmentos en la muestra de PCR (Greif, 2013).

Figura 10.

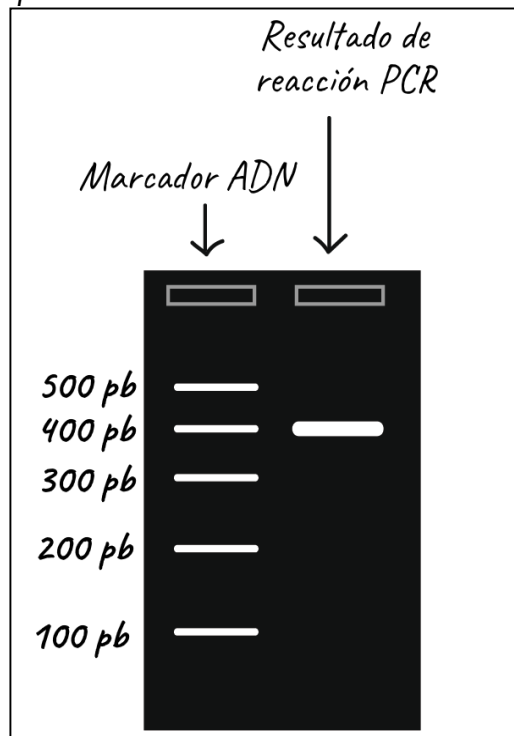
Detalle de la muestra de ADN ingresando en el pocillo de la cámara de electroforesis.



Los fragmentos de ADN de la misma longitud forman una "banda" en el gel que se puede identificar a simple vista si el gel se tiñe con un pigmento que se una al ADN. Por ejemplo, una reacción de PCR que produce un fragmento de 400 pares de bases (pb) se vería así en un gel:

Figura 11

Resultado gráfico de una electroforesis



Una banda de ADN contiene muchas, muchas copias de la región blanco de ADN, no solouna o unas cuantas copias. Dado que el ADN es microscópico, deben existir muchas copiasde este para poder verlo a simple vista. Esto es una parte importante de por qué la PCR esuna herramienta importante: produce suficientes copias de una secuencia de ADN para poder ver o manipular esa región de ADN (Greif, 2013).



Capítulo 2

DESARROLLO EXPERIMENTAL



OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Recolección de muestras de leche

La fase de campo del proyecto fue realizada en Valles centrales de Oaxaca. El distrito escogido fue el Distrito de Etla, debido a que la mayoría de los municipios que la constituyen, son los principales proveedores y distribuidores de leches en la capital. Se tomaron muestras de leche cruda de forma aleatoria, en las localidades de Santiago Cacaotepec Etla, Reyes Etla, Santo Domingo Barrio Bajo Etla (utilización de la reacción en cadena..... En la carpeta tesis)

El proyecto en su fase experimental se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología de Alimentos del Instituto Tecnológico de Oaxaca.

Se trabajó con leche de vacas Holstein, criadas bajo un sistema de producción con manejo orgánico de pequeñas familias productoras de leche del municipio de Etla, ubicada al norte de la capital Oaxaqueña. Las familias cuentan con aproximadamente 10 vacas Holstein lecheras; la dieta del ganado bovino consta de rastrojo y zacate de maíz. La ordeña es de tipo manual, se podría decir que es la manera tradicional de ordeña en los Valles Centrales de Oaxaca, la ordeña se realiza dos veces al día; la primera a las 6 a.m. y el otro a las 4 p.m.

La mayor parte de la producción se vende a pequeños comerciantes para la elaboración artesanal de lácteos, como lo son el quesillo y queso fresco. La leche recién obtenida es depositada en vasijas, que posteriormente serán recolectada por los comerciantes para su posterior procesado.



Característica del muestreo

Se adquirieron muestras de leche fresca del día en mercados tradicionales de Etlá, recabando la información acerca del origen y manejo del producto hasta su arribo al mercado. Se obtuvieron aproximadamente 200 ml de leche en bolsas nuevas, estériles, herméticas, y etiquetadas; también se adquirieron muestras de leches procesadas de supermercado de tipo Tetra pak y de galón. Todas las muestras se conservaron en refrigeración en hieleras a una temperatura de 4-8°C hasta que fueron remitidas al Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Instituto Tecnológico de Oaxaca para su análisis microbiológicas por método tradicional y también por el método rápido basado en la identificación de los ácidos nucleicos de los microorganismos por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa.



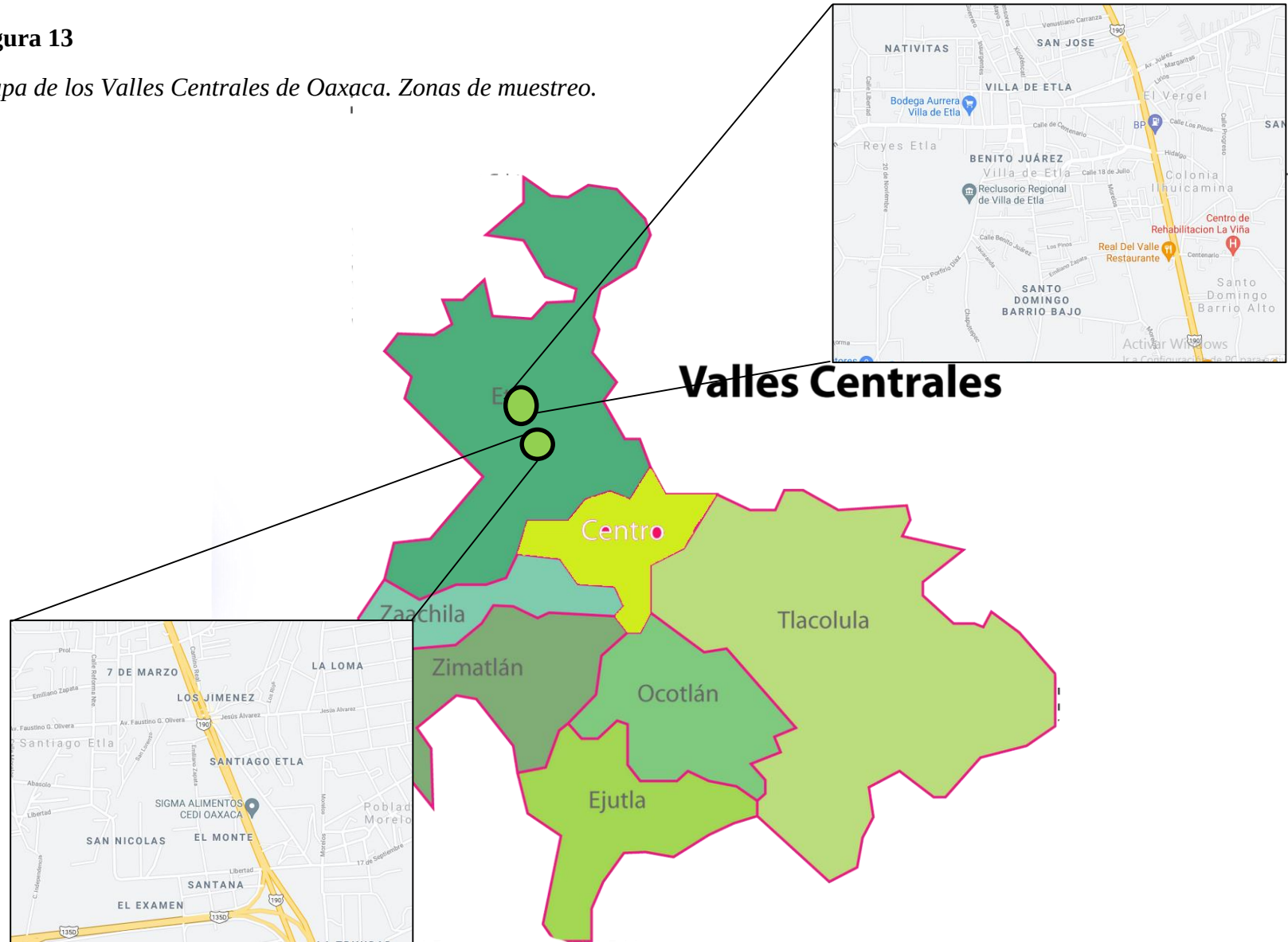
Figura 12

Mapa del Estado de Oaxaca. Distrito d



Figura 13

Mapa de los Valles Centrales de Oaxaca. Zonas de muestreo.



2.1. Detección o cuantificación de microorganismos por métodos tradicionales (NOM-210-SSA1-2014).

Se describen a continuación los procedimientos para la detección y cuantificación de microorganismos presentes en la leche utilizando los métodos tradicionales basados en su aislamiento y cultivo en sustratos específicos que contienen nutrimentos y condiciones especiales para su propagación. Los reactivos, materiales, equipos y condiciones de trabajo fueron los descritos en la norma oficial NOM-210-SSA1-2014.

2.1.1. Aislamiento de *Salmonella* spp

El pre-enriquecimiento inicial se realizó homogeneizando 20 ml de la muestra de leche en 180ml de caldo lauril sulfato (caldo lauril triptosa TSB) estéril, seguida de incubación a 35°C durante 24h. Para realizar el enriquecimiento selectivo se colocó 0.1 ml del cultivo anterior de leche fresca y 1ml de cultivo anterior de leche procesada en tubos de cultivo con 10 ml de caldo tetrationato adicionado de 0.2 ml de lugol y 0.1 ml de solución acuosa verde brillante. Los tubos se incubaron a 35°C durante 24h. el aislamiento de *Salmonella* se llevó a cabo sembrando por estriado sobre cajas de Petri de agar sulfito bismuto, los cuales fueron incubadas a 35°C durante 24h. las cajas se incubaron 24h adicionales en caso de ausencia de colonias. La presencia de colonias de color café, gris o negro indicaron la probable presencia de *Salmonella*.

La confirmación bioquímica de la presencia de *Salmonella* spp, se realizó tomando una pequeña cantidad de una colonia típica con ayuda de un asa resta estéril y sembrando por punción hasta el fondo y por estriado en la superficie de tubos de cultivo con 10 ml de agar



triple azúcar hierro solidificado de manera inclinada. Los tubos se incubaron a 35°C por un periodo de 24h, no ajustando así las tapas de cada tubo para favorecer el crecimiento de aerobios. Las colonias típicas de *Salmonella* produjeron un color rojo en la superficie del medio y amarillo en el fondo; consiguientemente se observó producción de gas, también se observó que en los tubos que resultaron positivos se originó un precipitado negro (la gran mayoría de especies, cerca del 90%, producen ácido sulfhídrico, lo que produce una coloración negra en el medio).

2.1.2. Cuantificación de *Escherichia coli*

La prueba presuntiva de la presencia de *E. coli* se realizó colocando 1 ml de muestra de leche procesada y 0.1 ml de leche fresca en tubos de cultivo conteniendo 10 ml de caldo lauril triptosa estéril. Los tubos se incubaron a 35°C durante un periodo de 24-48h. La formación de gas indicó un resultado positivo en los tubos de prueba presuntiva.

La prueba confirmativa se realizó tomando una asada de cada tubo positivo de la prueba presuntiva y sembrando en dos tubos por muestra con 10 ml de caldo EC estéril e incubando 1 tubo de cada muestra a 35°C y otros a 45°C durante 24h. el resultado permitió cuantificar la contaminación de las leches por coliformes totales y fecales, respectivamente.

2.1.3. Cuantificación de *Staphylococcus aureus*

Se sembraron 0.1 ml de muestra de leche fresca y 1 ml de muestra de leche procesada en cajas Petri con medio de cultivo Baird Parker estéril, este medio se preparó a partir de base de medio



Baird Parker comercial adicionada de emulsión de yema de huevo y telurito de potasio. Con ayuda de triángulos de vidrio esterilizados a la flama se extendió el inóculo por toda la superficie del medio, posterior a esto se llevaron a incubación por 48h a 35°C, las muestras se sembraron por duplicado. Se contaron las colonias positivas, y se sabe que son positivas si tienen un diámetro de aproximadamente 2mm, circulares, convexas, negras, brillantes y con halo claro; luego del conteo se multiplicó por el factor de dilución correspondiente para el reporte final de resultados.

2.1.4. Cuenta de Bacterias Mesófilas Aeróbicas

Se realizó homogeneizando 20 ml de la muestra de leche en 180ml de caldo lauril, teniendo así una disolución de 1:10, de la mezcla anterior se tomaron para leche fresca 0.1 ml y 1 ml de leche procesada y se sembraron en cajas Petri que contenían Agar para Cuenta Estándar (ACS) que se dejaron incubando en una estufa a 35°C por 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió al conteo de microorganismos crecientes en el agar.

2.1.5. Cuenta de Organismos Coliformes Totales y Fecales.

CONTEO EN PLACA

Se homogeneizó 20 ml de la muestra de leche en 180ml de caldo lauril sulfato, se tomó 0.1 ml de mezcla para leche fresca y para leche procesada se tomaron 1 ml, correspondientes a sus mezclas, se sembraron en cajas Petri de Agar Cromogénico para Coliformes (ACC), incubando a 35°C por 48 horas.

TECNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP)

Para esta técnica se colocaron tubos largos Caldo lauril para cada muestra, se adicionaron 1 ml de muestra de leche procesada y 0.1 ml de leche fresca directamente los tubos. Se



incubaron 48 horas a 35°C. terminando el tiempo de incubación se analizó cada tubo y observando si hay o no formación de gases. En caso positivo a la formación de gases se indica que la prueba presuntiva es positiva.

De los tubos presuntivos se resiembran 1 ml en cada EC, por triplicado y se incubaron a 35°C para Coliformes Totales y 45°C para coliformes Fecales por 48 horas.

Se reportaron como positivos los tubos que presentaron turbidez y producción de gases, después de la incubación. De acuerdo a la NOM-210-SSA1-2014 se conoce el NMP consultando la tabla 4 apartado H.8.4.4 de la norma.

2.2. Métodos moleculares

2.2.1. Extracción de ADN

2.2.1.1. A partir de cultivos puros

Para obtener ADN se partió del crecimiento en placa, se tomó una cantidad de agar con colonia positiva de microorganismos con ayuda de palillos estériles y se depositaron directamente en tubos Eppendorf, para posteriormente continuar con el protocolo para PCR estándar.

2.2.1.2. A partir de muestras de alimentos

En vasos de precipitado esterilizados se depositaron 10 ml de cada muestra, en este caso la muestra que se trabajó fue leche fresca y leche procesada. Se añadieron 800 µl de EDTA 0.5 M y se incubaron a 40°C durante 5 min. Luego se distribuyeron en tubos Eppendorf, aproximadamente 1.5 ml, tres tubos por cada muestra. Los tubos fueron centrifugados a 4700



xg durante 15 min a temperatura ambiente en una centrifuga de rotor para obtener una pastilla de las bacterias inoculadas.

La capa de grasa se eliminó por aspiración y se eliminó el sobrenadante dejando aproximadamente 50 µl. La pastilla se resuspendió en 450 µl de buffer de lisis (SDS 0.1%, NaCl 30 mM, MgCl₂ 2 mM) por pipeteo y fue transferido a un tubo de microcentrífuga que contenía ADNasa I (2 µl de 500 U/ml en Tris 10 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 2 mM, pH 7.5), y se incubaron durante 5 minutos. Se centrifugaron a 15,000 xg durante 5 min en rotor inclinado.

El sobrenadante se eliminó por aspiración y la pastilla se resuspendió en 100 µl de PS con EDTA 1 mM por pipeteo. Se agregaron 5 µl de una solución de tripsina (2 mg/ml en buffer de fosfatos) a las muestras y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente con mezclado periódico. Se añadieron 400 µl de PS + T y los tubos se centrifugaron durante 2 min a 15000 xg. El sobrenadante fue eliminado por aspiración. Finalmente se diluyeron las pastillas de cada tubo en un poco volumen de agua inyectable (50 µl a 100 µl).

2.2.2. Cuantificación de ácidos nucleicos

2.2.2.1. Espectrofotometría

Para estimar la concentración y la pureza del ADN extraído, se utilizó un espectrofotómetro (Thermo Scientific™ NanoDrop Lite). No se realizaron disoluciones de las muestras ya que el sistema de retención de muestras patentado del NanoDrop Lite permite el pipeteo directo de muestras sobre la superficie de medición óptica. Tras la medición, se limpia la muestra de la superficie de medición con un paño de laboratorio sin pelusas. Se midió la concentración



de ácido nucleico a 260 nm y la pureza de la muestra que viene dada por el cociente de las absorbancias a 260 y 280 nm, siendo óptima cuando dichos valores son mayores o iguales a 1.8 (de preferencia en un intervalo de 1.8 a 2). Las desviaciones de este valor son indicativas de las impurezas proteínicas. Así mismo, una elevada absorbancia a 230 nm puede indicar la presencia de impurezas ya que esta longitud de onda está cerca del máximo de absorbancia de las uniones peptídicas y también puede indicar la contaminación con Tris-HCl, EDTA u otras sales presentes en los tampones utilizados para la extracción.

2.2.3. Primers y sondas

2.2.3.1. Selección de Primers y sondas

La tabla siguiente se muestra los Primers y sondas correspondientes a las cuatro cepas reportadas por (Chiang, y otros, 2012). Los Primers fueron analizados en el programa Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) para establecer sus temperaturas de alineamiento y especificidad.

Tabla 6. Primers utilizados para evaluar las poblaciones bacterianas.

Fragmento de DNA (Nº GeneBank)	Primers	Secuencia de oligonucleótidos	Producto de PCR
Staphylococcus Aureus BA000018	SAU3/SAU4	F5'ACAAATAATAAAGGTGGC3' R5'TATCGCCAGTTTGTACTT3' Sonda5'ACAATTGTAGGGGAGACAGATTT TTTTTTTTTTTTTTTTT3'	406 pb
Escherichia coli O157:H7 AE005174	HAF1/HAR1	F5'AATAAACAGGTACGGCT3' R5'TATCACCTCATCAACCAAATC3' Sonda5'TTTTTTTTTTTTTTTTAATTGAAT CCATTCGTCTACTT3'	316 pb
Salmonella spp. AM933172	Sspp1S/Sspp1 A	F5'TTGC GTT GCGTCTGTCC3' R5'GCTTATCGTCTGCGGCTC3' Sonda5'TTTTTTTTTTTTTTTTAGGCG ATAGTACGGCCATTT3'	237 pb



htpG-like <i>L. monocytogenes</i>	Lm1/Lm2	F5'GAAGAAATTAATAGTTGGAC3' R5'GAAATAGTCTTGGAAATGCG3' Sonda 5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAAATAGTCTT GGAAATGCG3'	120 pb
--------------------------------------	---------	--	--------

Fuente: (Chiang, y otros, 2012)

2.2.4. Estandarización de la PCR

Se realizaron ensayos de PCR para evaluar la calidad del ADN extraído de los cultivos bacterianos. Se diseñaron gradientes de concentración de Primers de bacterias de 1 µl C/U a 10 µl C/U y concentraciones de MgCl₂ de 5 µl, 8 µl y 10 µl.

La tabla 3 muestra las concentraciones finales de los reactivos para la amplificación de muestras de ADN de leche, las cuales fueron programadas en un termociclador (TECHNE Flexigene FFG02FSD Benchtop Thermal Cycler PCR Lab) utilizando los primers sintetizados y el ADN de cada microorganismo.

Tabla 7. Componentes de la reacción de PCR para la detección de microorganismos en leches.

COMPONENTE	50 µl/RXN	CONCENTRACIÓN FINAL 110 µl/RXN
Amortiguador enzimático de reacción 10X	5 µl	10 µl
Desoxinucleótido	5 µl	10 µl
MgCl ₂ 20X	2.5 µl	5 µl



Primer de bacterias		
F→ , R←	1 µl C/U	10 µl C/U
ADN	1 µl	2 µl
H ₂ O	34.25 µl	52.5 µl
Amplificasa (Polimerasa)	0.25 µl	0.5 µl

Las condiciones del ciclado se muestran en la Tabla 4. El ciclado se realizó de acuerdo al programa ALE PCR, un ciclado programado.

Tabla 8. Programa ALE PCR de ciclado de PCR.

PASOS DEL CICLO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	98	10	1
Desnaturalización	98	1	30
Alineamiento	63.5	15	30
Extensión	72	15	30
Extensión final	72	60	1

2.2.5. PCR estándar

Se realizaron ensayos de PCR para evaluar la calidad de ADN extraído de las bacterias control. Los reactivos utilizados fueron del kit de diagnóstico molecular por PCR Amplificasa® (Taq ADN polimerasa).

Las reacciones de PCR convencional se llevaron a cabo en tubos de PCR en 100 µl de una solución que contenía: 10 µl de Amortiguador de reacción PCR 10X (KCl 500 mM Tris-HCl



pH 8.3 10 mM, gelatina 10 mg/ml), 5 µl de MgCl₂ 30 mM (20X), 10 µl de Desoxirribonucleótido trifosfato (dNTPs), 10 µl de cada iniciador (primers), 2 µl de la solución de ADN, 52.5 ml de agua inyectable y 0.5 µl de Taq polimerasa. Se mezclaron los componentes de la reacción dando unos golpecitos con el dedo e invirtiendo el tubo varias veces. Se colocaron las muestras en el termociclador programado con las condiciones de amplificación establecidas previamente, por lo general se utilizan los siguientes pasos:

- Desnaturalización inicial: habitualmente la PCR utiliza un ciclo de desnaturalización (separación de la doble hélice porque los puentes de hidrogeno se rompen), la temperatura y el tiempo se determinan de acuerdo a las características del ADN y de la ADN polimerasa utilizada.
- Ciclos de la PCR: se realizan ciclos sucesivos de desnaturalización, alineamiento y extensión, generalmente estas etapas se repiten entre 25 y 35 veces.
- Desnaturalización: en esta etapa es muy importante que el ADN molde se desnaturalice completamente. Para lograrlo de manera adecuada se recomiendan temperaturas de 94°C durante 30 segundos a 1 minuto. Si el ADN tiene alto contenido de guaninas y citosinas, se recomienda aumentar el tiempo o la temperatura. La actividad de la enzima decrece muy rápido a partir de los 95 °C, por lo que a estas temperaturas o superiores es aconsejable disminuir el tiempo de incubación.
- Alineamiento: Al disminuir la temperatura de incubación los iniciadores se unen al ADN molde en las zonas 3' complementarias. Ambos iniciadores se unen de manera



específica al ADN flanqueando el fragmento que se quiere amplificar. En este caso, la temperatura y el tiempo van a depender de 3 factores relacionados con los iniciadores: la concentración, el número de bases y el porcentaje de guaninas-citosinas. En la práctica, la temperatura de alineamiento oscila entre 45 y 65 °C durante un tiempo entre 30 segundos y 1 minuto. Un aumento de temperatura o del tiempo favorece la especificidad porque disminuye las uniones incorrectas de los iniciadores con la hebra molde.

- **Extensión:** Esta etapa, también conocida como elongación, amplificación o polimerización, consiste en la síntesis de la nueva cadena de ADN, a partir del extremo 3' del iniciador por acción del ADN polimerasa, empleando como sustrato los cuatro dNTPs. En la mayoría de las reacciones, la etapa de extensión se realiza a 72 °C porque es la temperatura a la cual la Taq polimerasa (enzima más utilizada) alcanza su mayor actividad. El tiempo de extensión depende de la longitud del fragmento a amplificar, la Taq polimerasa añade de 500 a 1000 nucleótidos por minuto.
- **Extensión final.** Generalmente, al terminar los ciclos, se realiza una última extensión de aproximadamente 5 minutos a 72 °C para permitir que la polimerasa termine de sintetizar todos los fragmentos que pueden haber quedado incompletos.

2.2.5. Análisis electroforético

Esta técnica fue empleada para analizar resultados de reacciones de alineamiento, integridad de ADN y productos de PCR. Las concentraciones de los geles fueron del 0.5 a 2%, de acuerdo



al producto esperado. Se utilizó buffer de corrida TAE 1X (40 Mm Tris, 20 mM ácido acético, 1Mm EDTA, pH 8) y buffer de carga. Como marcador de peso molecular se utilizó 4 µl de una homogenizado (3 µl de 6X TriTrack DNA Thermo Scientific, 3 µl Water, nucleose-free Thermo Scientific, 12 µl de agua inyectable). Las muestras se corrieron a 100 V por 30 min para muestras de extracción ADN y a 50 V por 1 hora para muestras de PCR. Los geles obtenidos fueron sumergidos en una solución de Bromuro de Etidio (BrEt) (200 ml de agua destilada y 10 µl de BrEt) durante 15 min aproximadamente y posterior a esto fueron analizadas visualmente con ayuda de un transluminador con longitud de onda de 302 nm.





Capítulo 3

RESULTADOS Y DISCUSIONES



En las imágenes que a continuación se presentan, se pueden observar la ordeña de la vaca de una familia granjera de Santiago Cacaotepec, sin previo lavado o desinfección de las ubres, claramente se observa la mala salubridad de la ordeña y del habitat del animal.

Figura 14

Recolección de muestra y condiciones del lugar de muestreo.



a)



b)



c)



d)



e)

Nota: lugar de muestreo, condiciones y manejo de la muestra. La mayoría de las casas con vacas lecheras viven en estas condiciones de higiene. Lugar de muestreo: Santiago Etlá. Fuente: propia del autor.

MÉTODO TRADICIONAL PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS EN LECHE FRESCA Y PROCESADA.

Cuenta de Bacterias Mesófilas

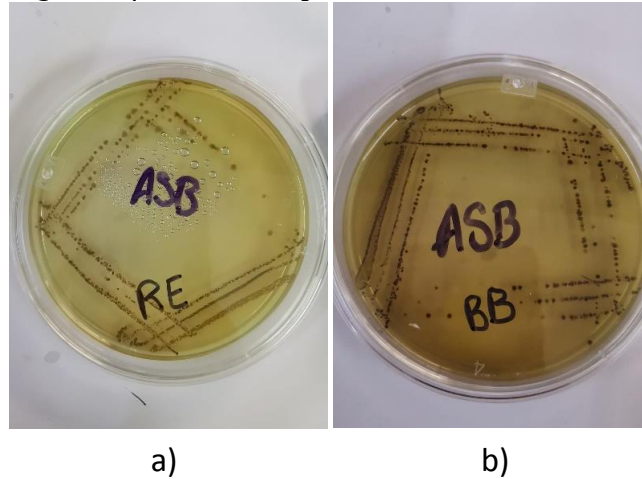
Se presenta a continuación los resultados en la cuenta de bacterias mesófilas aerobias en placa de las muestras de leche fresca y procesada. Los valores normativos son los indicados en la NOM-243-SSA1-2014.

En la tabla ____ se muestra el recuento de presuntos microorganismos patógenos presentes en la leche fresca y procesada de valles Centrales de Oaxaca

Tabla 9. *Resultados del método tradicional para la detección de microorganismos en muestras de leches.*

Figura 15

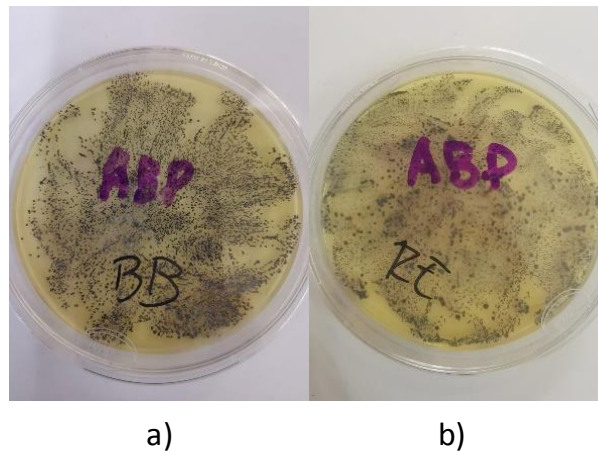
Prueba presuntiva en Agar Sulfato Bismuto para detección de Salmonella spp.



Nota: prueba presuntiva positiva para detección de *salmonella*, a) muestra de leche fresca de Reyes Etlá, b) leche fresca de Barrio Bajo Etlá. fuente propia del autor.

Figura 16

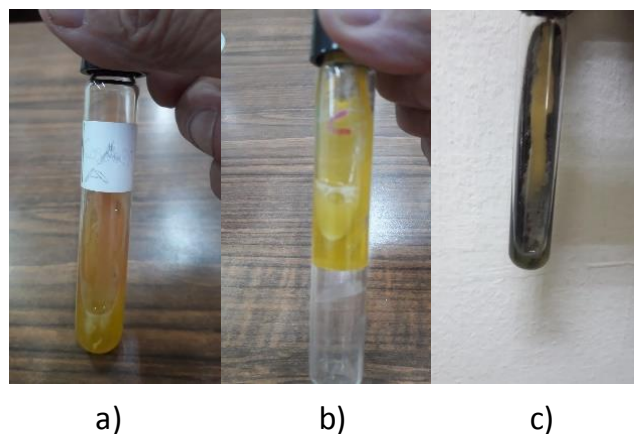
Colonias positivas de Staphylococcus aureus en Agar Baird Parker (BP) en leche fresca.



Nota: a) leche fresca de Barrio Bajo Etlá, b) leche fresca de Reyes Etlá.

Figura 17

Determinación de Salmonella spp en Agar Triple azúcar Hierro (TSI) de leche fresca y procesada.



Nota: a) tubo negativo muestra leche procesada LALA, b) tubo negativo leche procesada CUADRITOS, c) tubo positivo leche fresca.

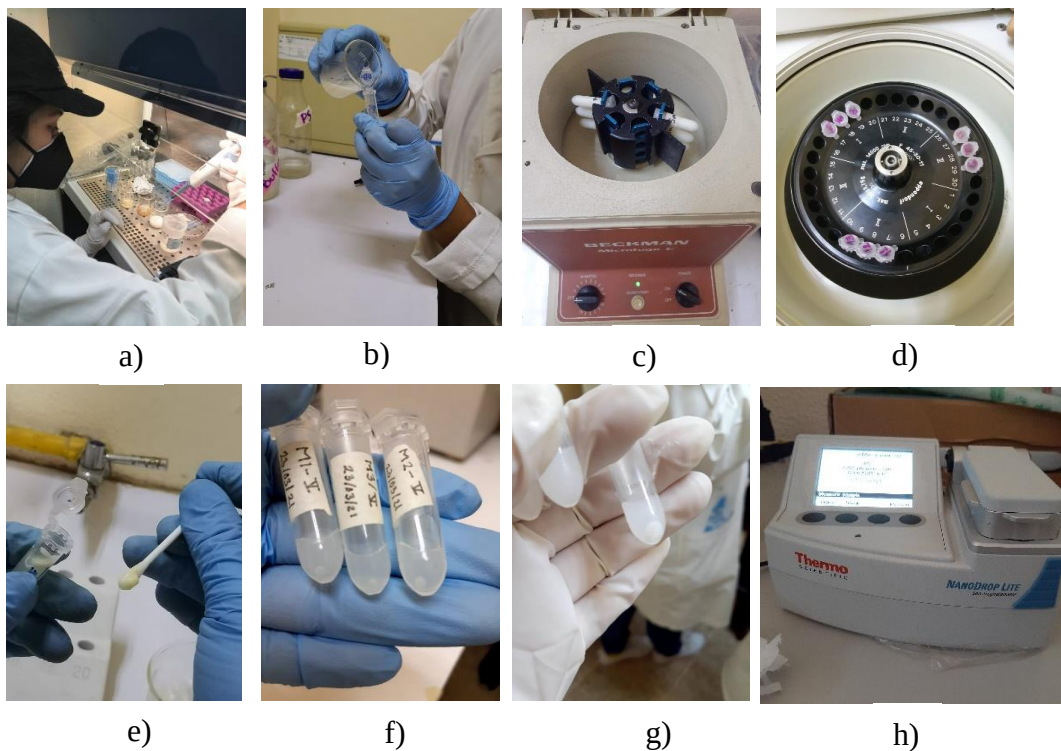
MÉTODO MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN LECHE FRESCA Y PROCESADA

Se presentan los resultados obtenidos en la extracción y cuantificación de ADN, así como la aplicación de electroforesis para la evaluación de la integridad y pureza de los productos obtenidos de PCR.

La figura 18 ilustra algunos de los pasos del proceso de Extracción de ADN, a) se inicia preparando la muestra, se toman 10 ml de leche y se le añade el coctel de reactivos, b) se transfiere la muestra preparada a tubos Eppendorf por triplicado, c) y d) ilustran como se meten a la centrifuga para separar la grasa, e) se extrae el anillo de grasa formada con ayuda de isopos esteriles, f) y g) pellets obtenidos ya al termino de todo el proceso de extracción, las pastillas contienen ADN, h) espectrofotómetro utilizado para estimar la concentración y la pureza del ADN obtenido.

Figura 18

Proceso de Extracción de ADN en leche fresca y procesada

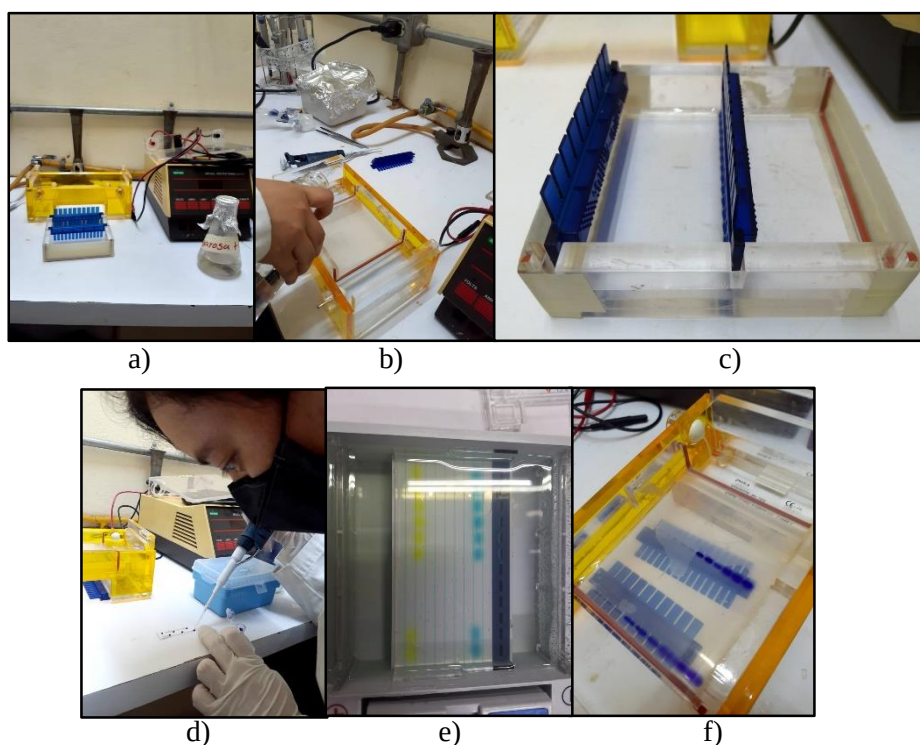


Nota: a) preparación de la muestra, b) transferencia de la muestra preparada a tubos Eppendorf, c) y d) centrifugado de la muestra, e) eliminación de la capa de grasa, f) y g) obtención de pellets extraídos y disueltos en agua inyectable, h) espectrofotómetro. Fuente propia del autor.

A continuacion, en la figura 19 se muestran una serie de imágenes que señalan algunos de los pasos que se siguieron en la técnica de electroforesis, mediante la cual, se puede observar la integridad o degradación de ADN obtenida de las muestras, ayudados por la visualización de bandas sobre el gel y revelado en un transluminador de UV.

Figura 19

Pasos realizados para electroforesis



Nota: a) equipo y reactivos para electroforesis, b) preparación de gel de agarosa al 1%, c) gel con peines en espera de solidificación, d) mixeado de muestra de ADN, e) y f) corrida del gel en la caja de electroforesis. Fuente propia del autor.

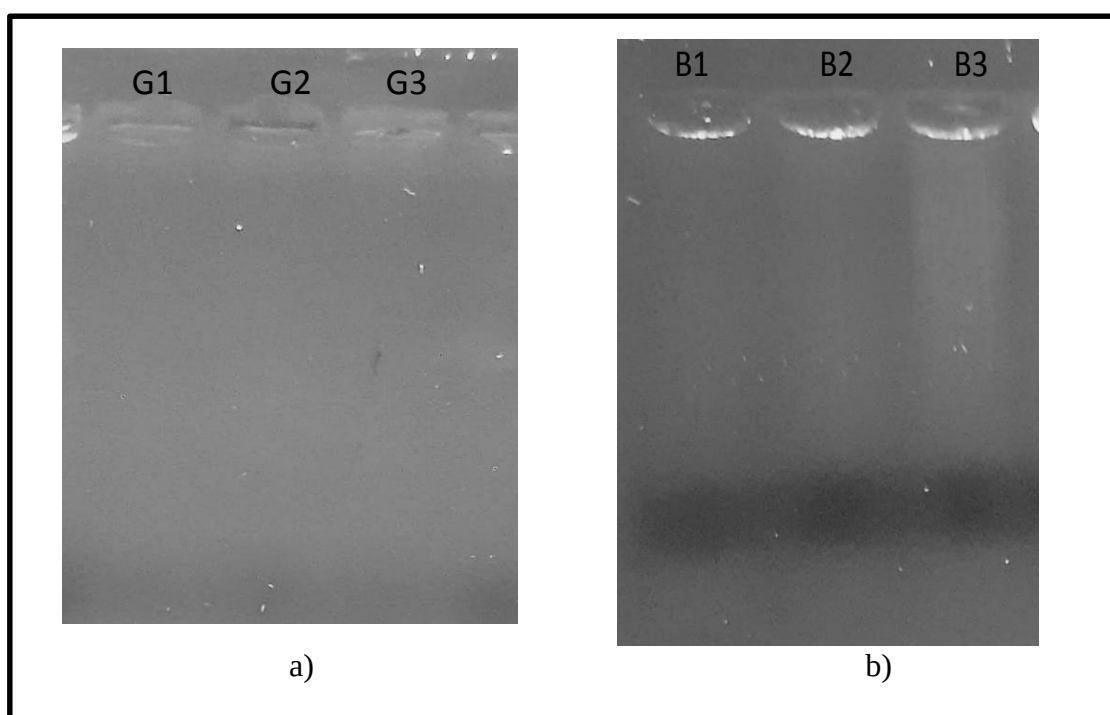
Dicha técnica de electroforesis involucra un gel de agarosa la cual fue preparada al 1% con TAE 1X, calentado y dejado a enfriamiento con peines puestos para formación de pozos. El gel de agarosa se sumergió en la cámara de electroforesis con solución TAE 1X cubriendo el gel, se preparó la muestra de ADN utilizando buffer de carga conteniendo glicerol y colorante que sirvió como frente de corrida, se mixearon bien las muestras y se sembraron en las

hendiduras de los pocillos del gel, luego se corrió el gel a 100V por 20 min. Terminado el tiempo de corrida, se dejó en reposo el gel en solución de BrEt para su observación en el transluminador UV.

La siguiente serie de figuras muestran los geles de agarosa al 1% realizados para conocer la integridad de ADN extraído de las muestras de leche analizadas en el transluminador.

Figura 20

Análisis electroforético en gel de agarosa al 1% de leche fresca (bronca) y leche procesada.



Nota: a) análisis electroforético en gel de agarosa al 1% de productos de Extracción de ADN de leche entera procesada marca CUADRITOS, b) análisis electroforético en gel de agarosa al 1% de productos de Extracción de ADN de leche fresca Santiago Etlá. Fuente propia del autor.

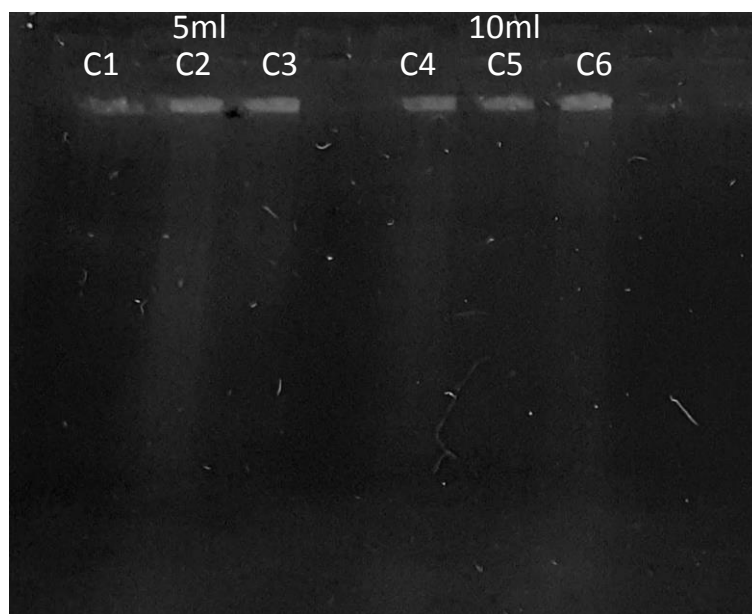
La figura 20 muestra dos imágenes que corresponden al análisis electroforético al 1% realizados a productos de extracción de leche, en la imagen a) no se llega a observar presencia existente de ADN en los pozos (G1,G2 Y G3), el resultado era esperado ya que la muestra corresponde a una leche comercial tipo Entera marca Cuadritos, que en comparación a la

imagen b), presenta evidente concentración de ADN en los pozos (B1, B2 Y B3), la muestra es leche fresca (bronca). Las muestras se realizaron por triplicado.

La figura 21 muestra el resultado del análisis electroforético de una misma muestra, la cual corresponde a la leche fresca de Etlá con clave C, se hizo una variación de volumen de 5 ml y 10 ml de leche al inicio de la Extracción de ADN, dando como resultado que en la C3 (muestra con 5ml de leche inicial) se obtuvo un pellet de mayor tamaño a comparación de las demás de esta extracción. Se observa claramente concentración de ADN en cada uno de los pozos con muestra.

Figura 21

Análisis electroforético de productos de Extracción de ADN de leche fresca



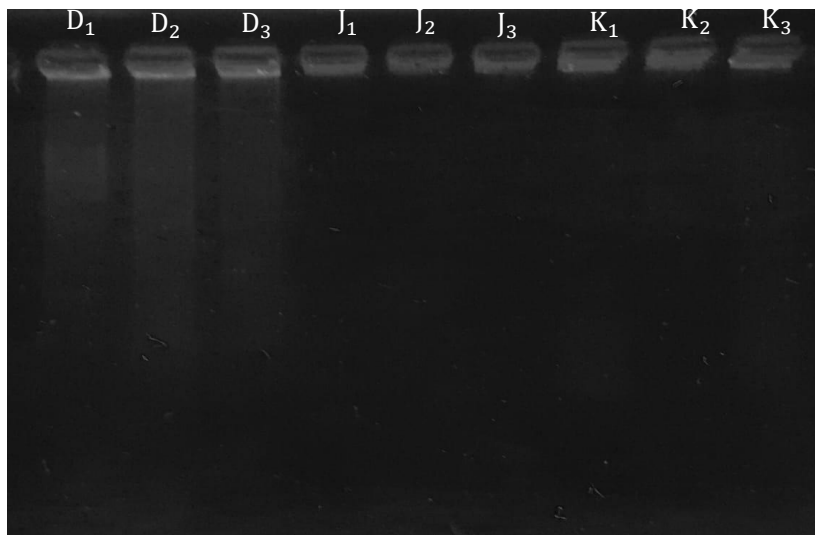
Nota: los productos C corresponden a la misma muestra, se hicieron variaciones de 5ml (C1-C3) Y 10ml (C4-C6) de leche respectivamente al inicio de la Extracción. Fuente propia del autor.

La figura 22 muestra como también hay notorias presencias y ausencias de bandas de ADN que se extrajeron de leches, las muestras D corresponden al producto de la Extracción de ADN de leche fresca procedente de Santiago Cacaotepec, las muestras J y K pertenecen a leche

comercial marca LALA, una de presentación entera orgánica en galón y la otra entera en tetrapak. Esta figura expone que no hay ninguna banda de ADN en los productos de leche comercial, por lo que hay mínima o nula presencia de microorganismos patógenos o no dentro de las leches analizadas.

Figura 22

Análisis electroforético de productos de Extracción de ADN de leche fresca y procesada.

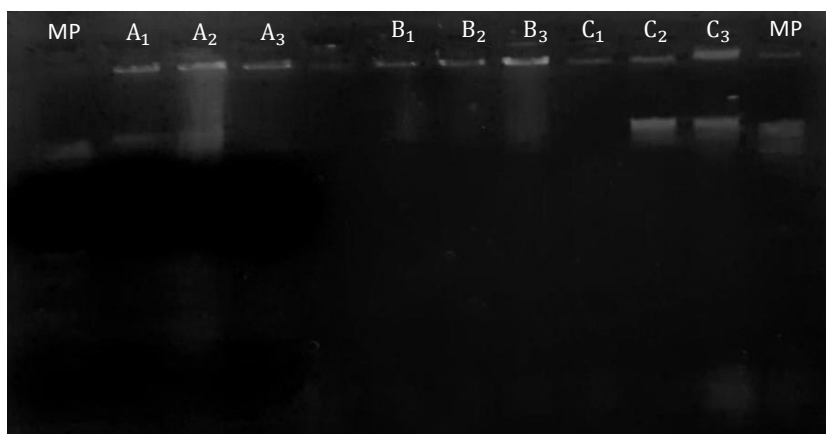


Nota: D₁, D₂ y D₃: Leche fresca de Santiago Cacaotepec Etlá; J₁, J₂ y J₃: leche LALA orgánica (botella); K₁, K₂ y K₃: LALA fresca entera (Tetrapak) Fuente propia del autor.

En la figura 23 podemos divisar

Figura 23

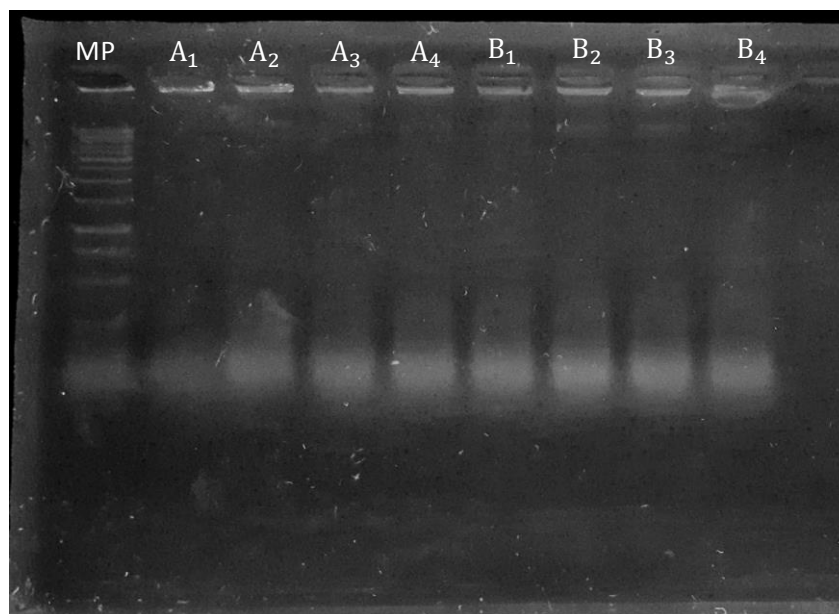
Análisis Electroforético de productos de PCR de leche para la identificación de microorganismos.



Nota: MP) Marcador de peso molecular; A₁, A₂ y A₃: leche 5 ml; B₁, B₂ y B₃ leche 10 ml; ; C₁: *E. coli*, C₂: *Salmonella spp.* y C₃: *S. aureus*.
Fuente propia del autor

Figura 24

Análisis electroforético en gel de agarosa al 1% de productos de PCR de muestra de leche fresca para la identificación de microorganismos.



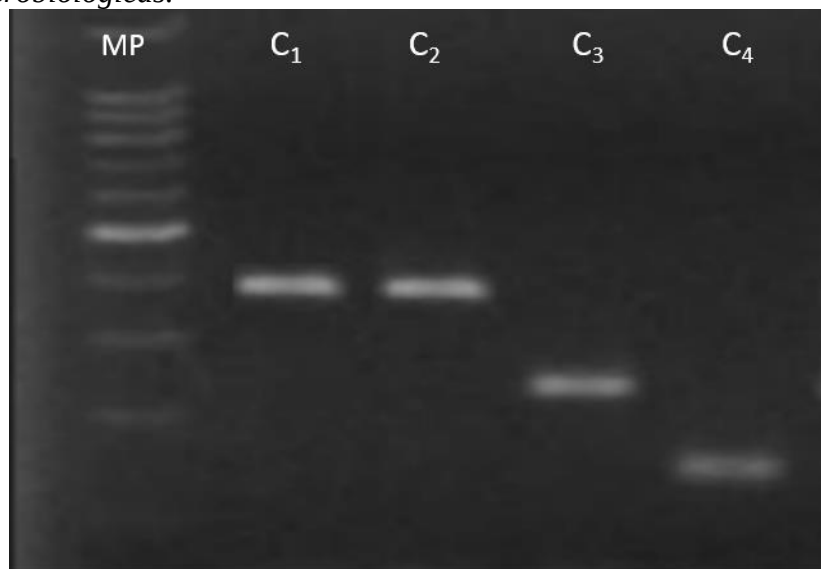
Nota: MP) Marcador de peso molecular; los carriles con A corresponden a leche 5 ml, A₁: *E. coli*, A₂: *Salmonella spp.*, A₃: *S. aureus* y A₄: *L. monocytogenes*; los carriles denotados con la letra B corresponden a leche 10 ml, B₁: *E. coli*, B₂: *Salmonella spp.*, B₃: *S. aureus* y B₄: *L. monocytogenes*. Fuente propia del autor.

Se realizó también la técnica de PCR para la amplificación de ADN de colonias bacterianas que se visualizó en gel de agarosa al 1%, las cepas de ADN fueron tomados de los resultados obtenidos de los análisis microbiológicos de las muestras analizadas, es decir de colonias positivas de cultivos en cajas Petri.

La figura 22 expone la visualización en gel de agarosa realizado a los productos de PCR para la identificación de los cuatro diferentes microorganismos patógenos de interés del proyecto de leches frescas y procesadas, se pueden observar las bandas de ADN definidas e integra de cada microorganismo, también se puede ver el peso que tiene cada una de estas bandas con respecto a cada microorganismo en basándose en un marcador de peso molecular de 100 pb.

Figura 25

Análisis electroforético de productos de PCR para la identificación de microorganismos en muestras microbiológicas.



Nota: . MP) Marcador de peso molecular 100 pb NEB, C₁: E. coli, C₂: L. monocytógenes, C₃ S. aureus y C₄: Salmonella spp

Los resultados de algunas muestras que se cuantificaron por espectrofotometría para estimar la concentración y pureza del ADN que se pudieron extraer de las muestras de leche fresca y

leche procesada, se pueden consultar en la tabla siguiente. Los valores más favorables son los indicados en amarillo ya que nos aproximan más al valor esperado de 1.8-2 en relación 260/280. Se necesita dominar más la técnica de extracción de ADN, para obtener así un ADN más puro y que arrojen valores más positivos y cercanos al esperado.

Tabla 10. Concentrado de cuantificación de muestras de leche procesada y leche fresca

MUESTRA	CLAVE	A 260 nm	A 260/280	ng/μl	LUGAR DE PROCEDENCIA
LECHE FRESCA	D	1.71	1.16	44.5	SANTIAGO CACAOTEPEC
LECHE FRESCA	D	1.791	1.39	54.65	SANTIAGO CACAOTEPEC
LECHE FRESCA	D	0.722	1.27	36.1	SANTIAGO CACAOTEPEC
LECHE COMERCIAL CUADRITOS	G	0.9	1.3	46.7	CHEDRAHUI
LECHE COMERCIAL CUADRITOS	G	1.2	1.1	51.2	CHEDRAHUI
LECHE COMERCIAL CUADRITOS	G	1.2	1.1	30.8	CHEDRAHUI
LALA ORGANICA GALÓN	J	0.814	1.11	40.7	CHEDRAHUI
LALA ORGANICA GALÓN	J	1.023	1.13	51.1	CHEDRAHUI
LALA ORGANICA GALÓN	J	0.733	1.07	36.7	CHEDRAHUI
LALA ENTERA TETRAPAK	K	1.27	1.14	63.5	CHEDRAHUI
LALA ENTERA TETRAPAK	K	0.549	1.09	57.8	CHEDRAHUI
LALA ENTERA TETRAPAK	K	1.22	1.37	61	CHEDRAHUI



Figura 26.

Espectrofotómetro utilizado para estimar la concentración y pureza del ADN.





Capítulo 3

CONCLUSIONES



Se evaluó mediante dos métodos; método tradicional marcada por la NOM-210-SSA1-2114 y método de Biología Molecular (PCR), la calidad microbiológica y sanitaria de leche cruda y leche procesada. Los resultados obtenidos mediante métodos cuantitativos nos indican que fueron detectables las tres bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp.) que son los de interés para este estudio, dichos resultados se concentraron en las tablas que se pudieron analizar en apartados anteriores.

En el conocimiento de este estudio se integra la determinación de la calidad de leche cruda y procesada que es consumido por pobladores Oaxaqueños. En general y de acuerdo con los límites establecidos por la normatividad mexicana, la calidad microbiológica de la leche cruda fue deficiente, mientras que por parte de la leche procesada los resultados son aceptables en su mayoría. En general la leche cruda presenta mala calidad microbiológica; siendo esto mayormente la consecuencia de malas prácticas de higiene durante su ordeño. Por otro lado, siendo de nuestro conocimiento que la leche procesada de presentación en supermercados ha sido sometida a pasteurización para poder ser envasado, comercializado y apto para consumo humano, esperábamos los resultados arrojados por los análisis microbiológicos, que indican una buena calidad de leche sin presencia importante de organismos patógenos.

Se realizó a la par los dos diferentes métodos de detección de patógenos de interés para este estudio (PCR y método convencional) para comparar la similitud existente entre los resultados que cada método arrojó. Teniendo como resultado que se obtuvieron presencias significativas de microorganismos patógenos en ambas técnicas. Se lograron observar concentraciones importantes de ADN en la cuantificación, los cuales se utilizaron para PCR y confirmando la presencia de patógenos en leche mediante uso de gel de agarosa al 1% revelado por electroforesis.



Es importante señalar que la electroforesis en asociación con otras técnicas tales como PCR, e hibridación, brinda una gran ayuda en el campo de la salud. Gracias a esta técnica es posible visualizar las bandas de ARN o ADN de patógenos, detectar cambios o mutaciones a nivel genético, visualizar una nueva proteína, entre otros.

Dada la sensibilidad y rapidez para la obtención de resultados mediante técnica PCR, es factibles proponer su aplicación como prueba preliminar con carácter oficial y no solo como prueba confirmatoria, como hasta el momento se ha utilizado, seleccionando solamente aquellas muestras que resulten positivas para continuar su análisis por método bacteriológico convencional, todo esto podría repercutir en la optimización de tiempo y recursos para la obtención de resultados y toma de decisiones.

Por último, se debe acotar que los esfuerzos para extracción de ADN y estandarización del PCR es un requisito indispensable para lograr la aplicación práctica y rutinaria de estas técnicas en la detección e identificación de microorganismos patógenos transmitidos por alimentos.





Capítulo 4

REFERENCIAS



- Agudelo Gómez, D. A. (2005). *Composición nutricional de la leche de ganado vacuno*. Lasallista de Investigación.
- Aguilera-Becerra, A., Urbano-Cáceres, E., & Jaimes-Bernal, C. (2014). Pathogenic bacteria in raw milk: A public health and food safety problem. . *Ciencia y Agricultura* , 11, 83-93.
- Alais, C. (2018). *Ciencia de la leche: principios de la técnica lechera*. Reverté. Obtenido de <https://elibro.net/es/ereader/itoaxaca/111364?page=15>
- Anderson, K., Whitlock, J., & Harwood, V. (2005). Persistence and Differential Survival of Fecal Indicator Bacteria in Subtropical Waters and Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(6), 3041-3048.
- Babalola, O. (2003). Molecular techniques: An overview of methods for the detection of bacteria. *African Journal of Biotechnology* , 710-713.
- Brandan, N. (2011). *Conceptos de genética*. Argentina: Universidad Nacional de Nordeste.
- CANILEC. (Marzo de 2019). *Estadísticas del Sector Lácteo 2010-2018*. Obtenido de <https://www.canilec.org.mx/estadisticas%20lacteos%202019.pdf>
- Castillo Bustos, J. A., & Chavez Ariza , J. P. (2008). *Implementacion de la documentacion de las buenas prácticas de manufactura y establecieminto de los manuales de procedimiento de las pruebas fisicoquimicas en la planta de enfriamiento*. Bogotá, Colombia: Facultad de Ciencias. Pontifica Universidad Javeriana.
- Chan, O. W. (2002). Molecular Techniques: An overview. *Biotechnology*.
- Chiang, Y.-C., Tsen, H.-Y., Chen , H.-Y., Chang, Y., Lin, C.-K., Chen, C.-Y., & Pai, W.-Y. (2012). Multiplex PCR and a chromogenic DNA macroarray for the detection of *Listeria monocytogens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp. and *Pseudomonas fluoresce*. *Journal of Microbiological Methods*, 113.
- Crossley, K., Otha, T., Uchiyama, I., & Baba, T. (2009). *Staphylococci in human disease* (2da ed.). Wiley-Blackwell.



- DOUE. (28 de 04 de 2020). Reglamento CE 2073/2005, DE LA COMISIÓN de 15 de noviembre de 2005 relativo los criterios microbiologicos aplicables a los productos alimenticios y sus posteriores modificaciones.
- FDA. (2018). *Raw Milk Misconceptions and the Danger of Raw Milk Consumption*. Food & Beverages .
- Fierro, F. (s.f.). *Electroforesis de ADN*. México: UAM.
- Fricker , M., MesselhäuBer, U., Busch, U., Scherer, S., & Ehling-Schulz, M. (March de 2007). Diagnostic Real-Time PCR Assays for the Detection of Emetic *Bacillus cereus* Strains in Foods and Recent Food-Borne Outbreaks. *Applied and Environmental Microbiology*, 7(6), 1892-1898. doi:10.1128/AEM.02219-06
- Fung, F., Wang, H., & Menon, S. (2018). *Food safety in 21st century*. Biomed. J.
- Fung, F., Wang, H.-S., & Menon, S. (2018). Food safety in the 21st century . *Biomedical Journal* , 88-95.
- Gigli, I. (2015). *LA BUENA LECHE: Aspectos biológicos y su industrialización* . Ituzaingó, provincia de Buenos Aires : Maipue.
- Greif, G. (s.f.). *PCR: Reacción en cadena de la polimerasa*. Montevideo: Unidad de Biología molecular. Instituto Pasteur Montevideo.
- Illana, J. (s.f.). *Biología molecular y estructura del ADN*. España: Real Sociedad Española de Química.
- INEGI. (2019). *Encuesta Nacional de ingresos y gastos de los hogares 2016, tabulados 2017*. Recuperado el 3 de Enero de 2020, de https://www.inegi.org.mx/contenidos/programas/enigh/nc/2018/doc/enigh2018_ns_presentacion_resultados.pdf
- Jiménez Corona, M. E. (2018). *Enfermedades* . San Luis Potosí: Secretaría de Salud : secretaria de Salud .
- Law, J. W.-F., Ab Mutalib, N.-S., Chan, K.-G., & Lee, L.-H. (2015). Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in microbiology*, 5, 770. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00770>
- Lerche, M. (1969). *Inspección veterinaria de la leche*. Zaragoza, España: Acribia.



- Meloni, D. (2014). Focusing on the main morphological and physiological characteristics of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Journal of Veterinary Science and Reserch*, 1-2.
- Michalsky, M., Leconte, N., Briard-Bion, V., Fauquant, J., Maubois, J., & Goudédranceche, H. (2006). Microfiltration of raw whole milk to select fractions with different fat globule fat size distributions: Process optimzation and analysis. *Journal Dairy Science*, 3778-3790.
- Molineri, A., Signorini, M., Cuatrín, A., Canavesio, V., Neder, V., & Russi, N. (2012). Association between milking practices and psychrotrophic bacterial counts in bulk tank milk. *Revista Argentina de Microbiología*, 44(3), 187-194.
- Mourad, G., Bettache, G., & Samir, M. (December de 2014). Composition and nutritional value of raw milk. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, 2(10), 115-122.
- Palomino Camargo, C., & Gonzales Muñoz, Y. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Experimental y Salud Pública*, 3(31).
- Philpot, W., & Nickerson, S. (2000). *Ganando la lucha contra la mastitis*. USA: Westfalia Surge Inc.
- SADER. (Diciembre de 2018). *Panorama de la leche en México*. México: Boletín informativo SIAP-SADER. Obtenido de <http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Panorama%20de%20Leche%20octubre-diciembre%202018.pdf>
- Sánchez, S., Martínez, R., Alonso, J., & Rey, J. (2010). Aspectos clínicos y patogénicos de las infecciones por *Escherichia* O157:H7 y otros *E. coli* verotoxigénicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 370-374.
- Serrato, D. (2008). *PCR: reacción en cadena*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- SIAP. (2020). *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera*. Obtenido de http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecResumen.jsp
- Soma, M. (s.f.). *Electroforesis en gel de agarosa*. Italia: European Commission.



- SSA. (1994). *Bienes y servivios. leche Pasteurizada de vaca. Especificaciones sanitarias*. México: Diario Oficial de la Federación.
- SSA. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y Servicios. En *Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba* (págs. 1-128). Diario Oficial de la Federación.
- Stilwell, W. (2003). Origin and seasonal variation of bacterial contamination of milk.
- Tagu, D. M. (2006). *Fundamentos de las técnicas de biología molecular*. España: ACRIBIA.
- Torres, K., Sierra, S., Potour, R., Carrascal, A., & Mercado, M. (2005). Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente. *Revista MVZ Córdoba*, 10(1).
- UNAD. (2016). *DEFINICIÓN, COMPOSICIÓN, ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LA LECHE*. México: Escuela de Ciencias, Tecnología e Ingeniería.
- Vadillo, S., Piriz, S., & Mateos, E. (2002). *Manual de Microbiología Veterinaria*. Madrid: McGraw-Hill.
- Walstra, P., Wouters, J., & Geurts, T. (2005). *Dairy Science and Technology* (2nd ed.). CRC Press Taylor & Francis Group. doi:<https://doi.org/10.1201/9781420028010>
- Wattiaux, M. A. (s.f.). Composición de la leche y valor nutricional. (U. d. Wisconsin-Madison, Ed.) *Instituto Babcock para la Investigación y Desarrollo Internacional de la Industria Lechera*, 73.
- Yáñez, E., Máttar, S., & Durango, A. (diciembre de 2008). Determinación de *Salmonella* ssp. por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba. 12(4).
- Zhao, X., Lin, C., Wang, J., & Oh, D. H. (2014). Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(3), 297-312. doi:<https://www.jmb.or.kr/journal/view.html?doi=10.4014/jmb.1310.10013>



