



EDUCACIÓN

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO®

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA

DIVISION DE ESTUDIOS PROFECIONALES

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA DIVISIÒN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y
BIOQUÍMICA

TESIS PROFESIONAL

**DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN PRODUCTOS
LÁCTEOS OAXAQUEÑOS MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA

MOISES UZIEL GARCIA GARCIA

ASESOR

DR. LUIS JAVIER TOLEDO FLORES

COMISIÒN REVISORA

Dra. MARIA DE JESÙS RAMIREZ ALTAMIRANO

DR. CARLOS FRANCISCO VARAPIZUELA SÀNCHEZ

M.C. AYMARA JUDITH DÌAZ BARRITA

Oaxaca de Juárez, Oaxaca

Febrero del 2024

INDICE

AGRADECIMIENTOS	5
RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
JUSTIFICACION	11
CAPITULO 1. MARCO TEORICO	12
1.1 LECHE	12
1.1.1 LECHE EN POLVO	12
1.1.2 EL QUESO.....	13
1.1.3 LA CREMA	13
1.1.4 PORCENTAJE DE GRASA	14
1.1.5 LA MANTECA	14
1.1.6 DULCE DE LECHE	15
1.1.7 LOS TIPOS DE DULCE DE LECHE.	15
1.1.8 EL YOGUR.....	16
1.1.9 EL HELADO	16
1.1.10 NORMATIVIDAD DE PRODUCTOS LACTEOS	17
1.2 MICROORGANISMOS MESOFÍLICOS AEROBIOS.....	25
1.2.1 ESCHERICHIA COLI	27
1.2.2 LISTERIA MONOCYTOGENES	28
1.2.3. SALMONELLA SPP	28
2. TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS EN ALIMENTOS	29
2.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEICO	30
2.1.1 Métodos de extracción.....	31
2.1.2 Métodos de purificación.....	32
2.1.3 Extracción/precipitación	32
2.1.4 Cromatografía.....	33
2.1.5 Centrifugación.....	33

2.1.6 Separación por afinidad	34
3. MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN CON CTAB.....	34
3.1. PRINCIPIOS DEL MÉTODO DEL CTAB: LISIS, EXTRACCIÓN Y PRECIPITACIÓN	34
3.2 CUANTIFICACIÓN DEL ADN MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA.....	38
3.2.1 Principios de la cuantificación de ADN por espectrofotometría.....	39
4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	40
4.1 ELECCIÓN DE LA CUBETA.....	40
4.2 PREPARACIÓN.....	41
4.3 MEDICIÓN EN UNA MUESTRA DESCONOCIDA.....	41
5. REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA	42
6. IDENTIFICACIÓN DE POLINUCLEOTIDOS POR ELECTROFORESIS.....	44
CAPITULO 2. METODOLOGIA	47
2.1 MATERIALES Y MÉTODOS	47
2.1.1 Microorganismos de referencia	47
2.1.2 Obtención de las muestras.....	47
2.1.3 Extracción de ADN directa de productos lácteos.....	47
2.1.4 Análisis microbiológico de alimentos	48
2.1.5 Extracción de ADN de cultivos bacterianos con kit Thermo scientific	52
2.1.6 Cuantificación de pureza e integridad.....	52
2.1.7 Electroforesis en gel de agarosa	52
CAPITULO 3 RESULTADOS	54
CONCLUSIONES.....	58
BIBLIOGRAFÍA.....	60

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. INHIBIDORES DE LA PCR. (V. & ECHEVERRIA, 2014).....	31
TABLA 2. VALORES DE LA ABSORBANCIA DE ADN DE TIMO DE TERNERA MUY PURIFICADO, EN TAMPÓN TNE 1X.....	42
TABLA 3 COMPONENTES DE REACCIÓN DE PCR.....	51

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

ILUSTRACIÓN 1. REPRESENTACIÓN SIMPLIFICADA DE LAS MEMBRANAS CELULARES (V. & ECHEVERRIA, 2014)	35
ILUSTRACIÓN 2. SOLUBILIZACIÓN DE LOS LÍPIDOS. (V. & ECHEVERRIA, 2014)	36
ILUSTRACIÓN 3. ROTURA DE LA MEMBRANA CELULAR Y EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO. (V. & ECHEVERRIA, 2014)	37
ILUSTRACIÓN 4. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA TRANSMISIÓN DE LA LUZ. (CHAN, 2002).....	39
ILUSTRACIÓN 5. REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA	43
ILUSTRACIÓN 6. IDENTIFICACIÓN DE POLINUCLEOTIDOS POR ELECTROFORESIS	44

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar les agradezco mis padres Eva Micaela Garcia y Alejandro Garcia guetierrez que siempre me ha brindado su apoyo incondicional para poder cumplir todas mis objetivos personales y académicos, ellos que con su cariño me han impulsado siempre a perseguir mis metas y nunca abandonarlas ante las adversidades, también agradezco muy profundamente mi asesor doctor Luis Javier Toledo Flores por su dedicación y paciencia, sin sus palabras y correcciones precisas no me hubiese podido lograr llegar a esta instancia tan anhelada, gracias por su guía y sus consejos que me quedare para siempre en la memoria y en mi futuro profesional.

Gracias acá docente quienes con su apoyo y sus enseñanzas constituyen a la base de mi vida profesional, agradezco tambien a dios que por guiarme a lo largo de mi vida con su apoyo y formtaleza en aquellos momentos de dificultad y debilidad.

Agradezco tambien a mi novia que siempre a estado conmigo apoyandome emocionalmente en todo y dandome buenos consejos como pareja y alientadome a no darme por vencido.

Desarrollo de esta tesis no lo puedo catalogar como algo fácil, pero lo que sí puedo hacer, es afirmar que durante todo este tiempo puede disfrutar cada momento, cada investigacion, proceso, y proyectos que se realizaron dentro de esta, lo disfruté mucho, y no fue porque simplemente me dispuse a que si fuera, fue porque mis padres siempre estuvieron ahí alentandome todos los dias para salir delante.

RESUMEN

Más del 90% de los casos confirmados y muertes por enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) han sido atribuidos a bacterias. La presencia de *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes* en carnes, lácteos y huevos las convierten en microorganismos responsables de gran parte de estas ETAs. El objetivo de la investigación fue detectar la presencia de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp*, *Escherichia. Coli* y *Staphylococcus aureus* mediante técnicas moleculares en leche fresca y queso. Se aplicaron tres métodos para la detección de estos microorganismos: método microbiológico convencional de acuerdo a las NOMs, kit comercial (RapidCheck®, Romer Labs) y método molecular mediante PCR. Se analizaron muestras de leche y queso adquiridas en el municipio de Reyes Etlá Oaxaca. La cuenta de organismos mesófilos aerobios dio valores de hasta 41,000 UFC/g en las muestras de la leche y queso. El método de kit comercial para *Salmonella spp* mostró resultados negativos para todas las muestras, y en *Listeria monocytogenes* un positivo que arrojaba la quesería los tres reyes. El método molecular de extracción de ADN directo mediante métodos enzimáticos presentó valores de pureza y calidad dentro del rango esperado. La presencia de los microorganismos de interés se realizó mediante PCR, cuyo análisis en geles de agarosa mostró resultados positivos para los productos lácteos. El método de extracción directa ofreció la ventaja de evitar cultivos primarios y obtener resultados altamente confiables en un periodo de 4 horas. La implementación de este método redujo el tiempo de análisis de 5 días por el método microbiológico y 2 días mediante el uso del Kit comercial, a 4 horas por el método molecular.

INTRODUCCIÓN

La inocuidad de los alimentos es la ausencia, o niveles seguros y aceptables, de peligro en los alimentos que pueden dañar la salud de los consumidores. Los peligros transmitidos por los alimentos pueden ser de naturaleza microbiológica, química o física. Se sabe que alrededor de 40 diferentes patógenos de origen alimentario causan enfermedades humanas. Más del 90% de los casos confirmados y las muertes causadas por dichos patógenos han sido atribuidos a bacterias. Entre las bacterias más comunes se encuentran *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella* spp., *Bacillus cereus* y *Campylobacter jejuni*. No obstante, aproximadamente el 98% de los microorganismos encontrados en los productos alimenticios no son patógenos. Por esta razón, se requiere desarrollar pruebas de diagnóstico que puedan detectar específicamente los microorganismos de interés. Tradicionalmente, la identificación de microorganismos en laboratorio se ha llevado a cabo de manera rutinaria mediante el aislamiento del microorganismo problema y la observación de sus características fenotípicas expresadas, como su morfología, comportamiento bioquímico y metabolismo. Sin embargo, esta metodología presenta varias limitaciones, por ejemplo, el tiempo para obtener resultados o la dificultad que presentan algunos microorganismos para ser cultivados, como es el caso de los microorganismos extremófilos o las bacterias denominadas viables no cultivables.

La constante actualización de los métodos moleculares y de análisis génico conlleva la necesidad de desarrollar métodos de extracción de ADN que sean simples, eficientes y de bajo costo. La identificación de microorganismos a través de técnicas moleculares es actualmente la más utilizada gracias a su precisión. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica de diagnóstico molecular sumamente valorada por su rapidez de resultados, alta sensibilidad y especificidad; sin embargo, el desempeño de la PCR depende fundamentalmente de la calidad de la muestra a analizar, es decir del ADN, el cual, debe ser de alta calidad y pureza. Por esta razón,

son necesarias técnicas especializadas y estandarizadas para su extracción.

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 nutricional es particularmente alto debido al equilibrio de los nutrientes que lo componen (Mourand, Bettache, & Samir, 2014). La leche es una materia prima agroindustrial utilizada para una gran variedad de productos alimentarios que incluyen la leche pasteurizada, ultra pasteurizada, yogur, quesos, crema, leche en polvo, y mantequilla.

Por otra parte, el queso desde las antiguas civilizaciones, el queso se ha almacenado para las épocas de escasez y ha sido considerado un alimento con numerosos beneficios, como su facilidad de transporte, buena conservación y su alto contenido en grasa, proteínas, calcio y fósforo.

México produjo en 2019 cerca de 12.5 millones de toneladas de leche, de las cuales, alrededor del 99% es leche de ganado bovino y el restante de ganado caprino (SIAP, 2019). 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). El objetivo de esta investigación es determinar mediante técnicas moleculares la detección de microorganismos de interés alimentario para reducir el tiempo de análisis.

OBJETIVO GENERAL

Detectar mediante métodos cualitativos y cuantitativos el riesgo sanitario presente en leche bronca y queso fresco que se consumen en Reyes Etla Oaxaca , aplicando técnicas de biología molecular.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detectar la presencia de *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Listeria sp* y *Staphylococcus aureus* en muestras de leche bronca y queso fresco en la región de los Reyes Etla Oaxaca.
2. Cuantificar los niveles de contaminación por *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Listeria sp* y *Staphylococcus aureus* en muestras de leche bronca y queso fresca en la región de los Reyes Etla Oaxaca.

JUSTIFICACION

La Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010 contiene las disposiciones sanitarias con relación a la leche fresca y procesada en México y establece que, la leche pasteurizada, apta para el consumo humano, debe estar exenta de la presencia de *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y otros microorganismos. Con esto es más rápido y con mayor eficiencia detectar estos microorganismos dañinos para la salud.

CAPITULO 1. MARCO TEORICO

1.1 Leche

En las últimas décadas, la innovación industrial y los avances científicos han permitido lograr desarrollos muy significativos en la industria lechera, convirtiendo a los productos lácteos en un bien de fácil acceso para gran parte de población. A pesar de que en la dieta alimentaria de los adultos la leche puede sustituirse por alimentos de contenido proteico y vitamínico equivalente, es poco probable que un alimento contenga todos los nutrientes presentes en un simple vaso de leche. Hoy los productos lácteos ocupan un lugar privilegiado entre los consumos alimentarios naturales de las grandes ciudades, donde la agitada vida cotidiana obliga a una creciente ingesta de alimentos industrialmente procesado (Olga halushchenko y Erika kaltenbrunner, 2001)

Se estima que la producción mundial de la leche es de 4500 millones de hectolitros anuales en Argentina. El consumo per cápita, por consiguiente, es del orden de 50 l/hab por año, muy bajo si se compara con las 250 de Finlandia, 200 de Nueva Zelanda y 185 de Suiza. En general casi todos los países desarrollados oscilan entre 100 y 150 l/hab por año, que es lo aconsejado por las medidas como mínimo indispensable para una dieta racional. Es que la leche provee al organismo de vitaminas D que durante la infancia, fija fósforo y calcio, también presentes en ella en huevos y dientes. Por cierto que otros alimentos también constituyen al crecimiento pero una ración in suficiente de leche origina raquitismo, con esqueleto débil y mal conformado, así como deficientes dentaduras.

1.1.1 Leche en polvo

Se entiende por la misma el producto lácteo obtenido por deshidratación de leche pasteurizada, que se presenta como un polvo uniforme sin grumos, de color blanco amarillento. Deberá contener todos los componentes naturales de la leche normal,

pudiendo variar su tenor graso según el tipo de leche en polvo de que se trate (entera, parcialmente descremada o descremada), no pudiendo contener sustancias conservantes ni antioxidantes. (Olga halushchenko y Erika kaltenbrunner, 2001)

1.1.2 El queso

El queso es un importante derivado de la leche, de muy alto valor nutritivo, muy rico en proteínas y calcio, pero sobre todo de exquisito sabor.

La producción mundial de quesos hechos con leche de vaca, es de 10 millones de toneladas anuales y una cantidad equivalente corresponde a quesos de leche ovina y caprina, muy difundida en algunos países. Los EEUU, encabezan la nómina de productores, con el 20% del total, cubriendo las necesidades del mercado interno. En ocasiones han quedado saldos exportables, pero no hay continuidad en ventas al exterior.

1.1.3 La crema

La crema o nata de leche es el resultado de concentrar la materia grasa de la leche cruda y se obtiene, ya sea por separación espontánea o por la centrifugación de la leche. En la crema el glóbulo graso se mantiene en buen estado; esto permite que, luego de su procesamiento y envasado, el producto puede ser batido.

Está constituida por los mismos componentes de la leche, que figuran con diferentes porcentajes:

- menos agua: aproximadamente 50%;
- más grasas, que llegan al 35%,
- y el resto distribuido entre caseína, lactosa y otras sustancias.

La separación natural de la crema es lenta e incompleta: parte de las grasas permanece dispersada en la leche. La industria efectúa un descremado mecánico, rápido y eficiente, sobre la base de la centrifugación. La leche penetra en un recipiente cilíndrico, con tabiques interiores en ángulo. Cuando gira a 1.000 r.p.m. se acelera la separación de crema en leche situada entre los tabiques. Las grasas de

menor densidad, se dirigen hacia el eje central mientras que el líquido residual se mueve en sentido contrario, hacia la periferia. Ambos productos salen por orificios apropiados, sin mezclarse.

La crema se altera con facilidad: se acidifica.

1.1.4 Porcentaje de grasa

Se clasifican las cremas en tres categorías de acuerdo con su contenido de grasa:

Crema común con un mínimo de 34% de grasa

Crema doble con más del 50% de grasa

Crema delgada, o diluida con menos del 34%

Acidez: El máximo de acidez es 30° DORNIC.

La calidad se establece mediante un sistema de puntaje. Cuatro propiedades califican independientemente, asignando a cada una de ellas un máximo parcial.

1.1.5 La manteca

A partir de la crema, se obtiene la manteca, uno de los productos lácteos más conocidos. Al conjugar dos componentes (el agua y la grasa -nutrientes energéticos por excelencia-) mediante un fuerte batido, se obtiene una mezcla homogénea, que debe permanecer como tal para obtener la consistencia adecuada. La manteca tradicional está compuesta por un 75% de componentes semiduros, y un 25% de componentes semiblandos, que le dan la consistencia habitual. Una buena manteca tiene la característica de tener una consistencia sólida y homogénea, sabor y aroma característicos, color amarillento (de distinta intensidad, según diversos factores). La manteca, o mantequilla, se fabrica con crema de leche, de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- Dilución de la crema con agua y ajuste de la acidez en 30° DORNIC.
- Agregado de cultivos seleccionados de bacilos y estreptococos lácticos con la finalidad de transformar la lactosa en ácido láctico:

CH₃-CHOH-COOH, y butírico: **CH₃-CH₂-CH₂-COOH**.

Este proceso, que dura de 12 a 15 horas, se denomina maduración; mejora las propiedades, como el sabor, el olor aromático y la consistencia.

- **Batido** de 30 a 60 minutos para que los glóbulos de grasa se agrupen, separándose el líquido residual: el suero.
- Lavado con agua y **amasado** para conseguir pasta semisólida y homogénea.
- La manteca obtenida se moldea en "panes" de 100 a 1.000 gramos, y se envuelve con papel impermeable. Los rótulos indican, además de los datos habituales, la fecha de envasado.

Con 100 litros de leche se fabrican alrededor de 3 kilogramos de manteca.

1.1.6 Dulce de leche

Entre los hábitos alimentarios de los argentinos, es innegable que el dulce de leche ocupa un lugar de privilegio. Aquellos que van de viaje tienen dos preocupaciones excluyentes: que no falte ni yerba ni el dulce de leche.

Se entiende por dulce de leche al producto obtenido por la concentración de la leche adicionada de sacarosa, por evaporación o evaporación y vacío y aromatizado o no, con el agregado de materias orgánicas autorizadas. Se elabora con leche de vaca, entera o parcialmente descremada, leche en polvo, crema de leche o con combinación de varios o algunos de estos productos.

El dulce de leche contiene 28% como mínimo y 30% como máximo de agua, un mínimo de 24% de sólidos de la leche, un mínimo de 7,5% de materia grasa de leche, y no más del 2% de cenizas. (Olga halushchenko y Erika kaltenbrunner, 2001)

1.1.7 Los tipos de dulce de leche.

El dulce de leche ha dado lugar a varias combinaciones, que dieron origen a diversos tipos:

- **Dulce de leche tradicional:** es el producto obtenido por concentración mediante el calor, a presión normal, o a presión reducida con el agregado de azúcar blanco.

- **Dulce de leche para repostería:** tiene la misma composición que el dulce de leche tradicional con el agregado, durante el proceso de elaboración, de sustancias espesantes naturales de origen vegetal que permiten alcanzar la consistencia deseada.
- **Dulce de leche mixto:** se diferencia por el agregado de algunas sustancias en un porcentaje de su composición. Entre ellas podemos encontrar chocolate, maní o almendras.
- **Dulce de leche "diet":** a diferencia del tradicional es elaborado con leche parcialmente descremada, y para endulzarlos se utilizan hidratos de carbono con menos calorías que el azúcar común.

1.1.8 El yogur

El yogur es una leche coagulada obtenida por fermentación láctica a partir de la leche enriquecida con otros sólidos lácteos como, por ejemplo, leche en polvo de distinto tenor graso, el agregado de los edulcorantes nutritivos (azúcar) o no calóricos.

Además de un alto valor nutricional, el yogur contiene fermentos naturales seleccionados, que contribuyen al equilibrio de la flora intestinal y a su mejor funcionamiento.

Los fermentos naturales del yogur permiten al organismo aprovechar mejor los nutrientes que contienen los alimentos (proteínas, vitaminas, minerales). Facilitan también la eliminación de los que el cuerpo no necesita, puesto que contribuyen a regular el tránsito intestinal. (Olga halushchenko y Erika kaltenbrunner, 2001)

1.1.9 El helado

El helado es una golosina congelada muy popular elaborada con grasa, azúcar y sólidos de la leche (estabilizadores, gomas y alginatos, al igual que los emulsionantes). Una parte del helado elaborado con productos lácteos aporta calcio y vitamina B2.

Se fabrican varios tipos de helado. El helado francés se enriquece con yemas de huevo; los *parfaits* y las *mousses* son preparados de helado que no se han batido durante el proceso de congelación; el *biscuit tortoni* está espolvoreado con almendras molidas, y el *spumoni* es un helado similar a una *mousse* al que se han añadido frutas y nueces. El helado suave, hecho con los mismos ingredientes que el helado normal, se vende tal como sale de la cuba congeladora, antes de que endurezca. (Olga halushchenko y Erika kaltenbrunner, 2001)

1.1.10 NORMATIVIDAD DE PRODUCTOS LACTEOS

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-183-SCFI-2012, "PRODUCTO LACTEO Y PRODUCTO LACTEO COMBINADO-DENOMINACIONES, ESPECIFICACIONES FISICOQUIMICAS, INFORMACION COMERCIAL Y METODOS DE PRUEBA".

CHRISTIAN TUREGANO ROLDAN, Director General de Normas y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Seguridad al Usuario, Información Comercial y Prácticas de Comercio, con fundamento en los artículos 34 fracciones XIII y XXXI de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 39 fracción V, 40 fracción XII, 46, 47 fracción IV de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización y 19 fracciones I, XIV y XV del Reglamento Interior de esta Secretaría, y considerando que es responsabilidad del Gobierno Federal procurar las medidas que sean necesarias para garantizar que los productos que se comercialicen en territorio nacional contengan los requisitos necesarios con el fin de garantizar los aspectos de seguridad e información comercial para lograr una efectiva protección del consumidor; que con fecha 30 de junio de 2011, el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Seguridad al Usuario, Información Comercial y Prácticas de Comercio, aprobó la publicación del Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-183-SCFI-2011, "Producto lácteo y producto lácteo combinado—Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba", la cual se realizó en el Diario Oficial de la Federación el 29 de noviembre de 2011, con objeto de que los interesados presentaran sus comentarios;

Que durante el plazo de 60 días naturales contados a partir de la fecha de publicación de dicho proyecto de norma oficial mexicana, la Manifestación de Impacto Regulatorio a que se refiere el artículo 45 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización estuvo a disposición del público en general para su consulta; y que dentro del mismo plazo, los interesados presentaron comentarios, conforme a la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, sobre el contenido del citado proyecto de norma oficial mexicana, por lo que se realizaron las modificaciones conducentes al proyecto de norma oficial mexicana. (Christian Turégano Roldán, 2011; Christian Turégano Roldán, 2011)

Que con fecha 13 de marzo de 2012, el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Seguridad al Usuario, Información Comercial y Prácticas de Comercio, aprobó por mayoría la norma oficial mexicana NOM-183-SCFI-2012, Producto lácteo y producto lácteo combinado-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba; que la Ley Federal sobre Metrología y Normalización establece que las normas oficiales mexicanas se constituyen como el instrumento idóneo para la protección de los intereses del consumidor, expide la siguiente:

Norma Oficial Mexicana NOM-183-SCFI-2012, Producto lácteo y producto lácteo combinado-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba, México, D.F., a 15 de marzo de 2012.- El Director General de Normas y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Seguridad al Usuario, Información Comercial y Prácticas de Comercio, Christian Turégano Roldán, Rúbrica. (Christian Turégano Roldán, 2011)

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-183-SCFI-2012, "PRODUCTO LACTEO Y PRODUCTO LACTEO COMBINADO-DENOMINACIONES, ESPECIFICACIONES FISICOQUIMICAS, INFORMACION COMERCIAL Y METODOS DE PRUEBA (Christian Turégano Roldán, 2011)

Aditivo

Cualquier sustancia permitida que, sin tener propiedades nutritivas, se incluya en la formulación de los productos y que actúe como estabilizante, conservador o modificador de sus características organolépticas, para favorecer ya sea su estabilidad, conservación, apariencia o aceptabilidad. (Christian Turégano Roldán, 2011)

Agua para uso y consumo humano

Aquella que no contiene contaminantes objetables ya sean químicos o agentes infecciosos y que no causa efectos nocivos al ser humano. (Christian Turégano Roldán, 2011)

Alimento

Cualquier sustancia o producto, sólido, semisólido o líquido, natural o transformado, que proporciona al organismo elementos para su nutrición. (Christian Turégano Roldán, 2011)

Almacenamiento

Acción de guardar, reunir en una bodega, local, silo o sitio específico, el producto lácteo y el producto lácteo combinado, para su conservación, custodia, suministro, futuro procesamiento o venta. (Christian Turégano Roldán, 2011)

Azúcares

Todos los monosacáridos y disacáridos presentes en un alimento o bebida no alcohólica. (Christian Turégano Roldán, 2011)

Caseína

Las caseínas son por definición un conjunto de polipéptidos sintetizados en la glándula mamaria de la vaca, forman la fracción más importante de la leche,

pertenecen al grupo de las gluco-fosfoproteínas y precipitan a pH de 4.6 a 20 °C. (Christian Turégano Roldán, 2011)

Colorante

Sustancia natural o sintética que imparte color a los alimentos, tales como tartracina, eritrosina, betacaroteno y extractos de origen vegetal. (Christian Turégano Roldán, 2011)

Concentración

Proceso por el que se disminuye la cantidad de agua del producto lácteo o el producto lácteo combinado, manteniendo una cierta cantidad de humedad por el proceso de evaporación, ósmosis inversa, ultrafiltración, adición de sólidos lácteos u otros procesos. (Christian Turégano Roldán, 2011)

Consumidor

Persona física o moral que adquiere o disfruta como destinatario final productos alimenticios y bebidas no alcohólicas preenvasados. (Christian Turégano Roldán, 2011)

Contenido

Cantidad de producto preenvasado que por su naturaleza puede cuantificarse para su comercialización, por cuenta numérica de unidades de producto. (Christian Turégano Roldán, 2011)

Contenido neto

Cantidad de producto lácteo o producto lácteo combinado preenvasada que permanece después de que se han hecho todas las deducciones de tara cuando sea el caso. (Christian Turégano Roldán, 2011)

Denominación

Nombre asignado al producto lácteo y al producto lácteo combinado, a partir del proceso al que son sometidos y a sus especificaciones fisicoquímicas (ver definición de proceso).

Deshidratación

Método de conservación del producto lácteo y del producto lácteo combinado, que consiste en reducir su contenido de agua hasta un límite máximo de 4%. (Christian Turégano Roldán, 2011)

Edulcorante

Sustancia que produce la sensación de dulzura, de origen natural (Ejemplos: sacarosa, fructosa, glucosa, miel, melazas) o sintéticos (Ejemplo: sacarina, aspartamo (aspartame), acesulfamo K (acesulfame K). (Christian Turégano Roldán, 2011)

Embalaje

Material que envuelve, contiene y protege al producto lácteo o al producto lácteo combinado, preenvasados, para efectos de su almacenamiento y transporte. (Christian Turégano Roldán, 2011)

Envasado aséptico

Al proceso que reúne las condiciones de esterilidad comercial para evitar la presencia de microorganismos en el producto durante el envasado.

Envase

Cualquier recipiente o envoltura en el cual está contenido el producto lácteo o el producto lácteo combinado, preenvasado para su venta al consumidor. (Christian Turégano Roldán, 2011)

Etiqueta

Cualquier rótulo, marbete, inscripción, imagen u otra materia descriptiva o gráfica, escrita, impresa, estarcida, marcada, grabada en alto o bajo relieve, adherida o sobrepuesta al envase del producto lácteo o del producto lácteo combinado, preenvasado o, cuando no sea posible por las características del producto de que se trate, al embalaje. (Christian Turégano Roldán, 2011)

Evaporación

Proceso térmico por el cual se elimina gradualmente agua del producto lácteo o del producto lácteo combinado en forma de vapor, obteniendo un producto concentrado. Dicho proceso puede ir acompañado de la aplicación de vacío. (Christian Turégano Roldán, 2011)

Fecha de caducidad

Fecha límite en que se considera que las características sanitarias y de calidad que debe reunir para su consumo un producto preenvasado, almacenado en las condiciones sugeridas por el responsable del producto, se reducen o eliminan de tal manera que después de esta fecha no debe comercializarse ni consumirse. (Christian Turégano Roldán, 2011)

Fecha de consumo preferente

Fecha en que, bajo determinadas condiciones de almacenamiento, expira el periodo durante el cual el producto preenvasado es comercializable y mantiene las cualidades específicas que se le atribuyen tácita o explícitamente, pero después de la cual el producto preenvasado puede ser consumido. (Christian Turégano Roldán, 2011)

Filtración

Proceso por el cual se separan del producto lácteo o producto lácteo combinado, las partículas microscópicas ajenas o no al producto. (Christian Turégano Roldán, 2011)

Grasa butírica

Es la grasa que se obtiene de la leche, la cual se caracteriza por contener ácidos grasos saturados, incluyendo el ácido butírico. (Christian Turégano Roldán, 2011)

Grasa vegetal

Es el producto obtenido de la extracción de los aceites comestibles de las plantas permitidas para consumo humano, que haya sido sometido a extracción y, en su caso, refinación, lavado, deodorizado, blanqueo, hibernación o desencerado, winterización, entre otros procesos.

Homogeneización

Se refiere al método para estabilizar la emulsión, al provocar una ruptura de los glóbulos grandes de grasa, para formar un mayor número de ellos de menor tamaño. (Christian Turégano Roldán, 2011)

Ingrediente

Cualquier sustancia o producto, incluidos los aditivos, que se emplee en la fabricación, elaboración, preparación o tratamiento de un alimento o bebida no alcohólica y esté presente en el producto final, transformado o no. (Christian Turégano Roldán, 2011)

Lactosa

Azúcar propio de la leche. (Christian Turégano Roldán, 2011)

Lote

La cantidad de un producto elaborado en un mismo ciclo, integrado por unidades homogéneas e identificado con un código específico. (Christian Turégano Roldán, 2011)

Métodos de prueba

Procedimientos analíticos utilizados en el laboratorio para comprobar que un producto satisface las especificaciones que establece la norma. (Christian Turégano Roldán, 2011)

Microfiltración

Es el procedimiento mediante el cual se concentran las moléculas suspendidas y se lleva a cabo por una membrana de 0,05 micrones a 10 micrones de porosidad, de tal forma que sólo quedan retenidas las moléculas suspendidas, lo cual se logra con presiones de 10 kPa a 50 kPa (0,1 kgf/cm² a 5 kgf/cm²). (Christian Turégano Roldán, 2011)

Muestra

Total, de unidades de producto provenientes de un lote y que representan las características y condiciones del mismo. (Christian Turégano Roldán, 2011)

Nutrimento

Cualquier sustancia incluyendo a las proteínas, aminoácidos, grasas o lípidos, carbohidratos o hidratos de carbono, agua, vitaminas y nutrimentos inorgánicos (minerales) consumida normalmente como componente de un alimento o bebida no alcohólica que:

a) Proporciona energía; o

- b) Es necesaria para el crecimiento, el desarrollo y el mantenimiento de la vida; o
- c) Cuya carencia haga que se produzcan cambios químicos o fisiológicos característicos. (Christian Turégano Roldán, 2011)

Osmosis inversa

Sistema de concentración de líquidos, que consiste en hacer pasar a través de una membrana semipermeable (0,1 a 1,0 nanómetros de porosidad) aplicando una presión hidráulica para contrarrestar la presión osmótica del líquido. (Christian Turégano Roldán, 2011)

Pasteurización

Al tratamiento térmico al que se somete la leche, consistente en una relación de temperatura y tiempo que garantice la destrucción de microorganismos patógenos y la inactivación de algunas enzimas. (Christian Turégano Roldán, 2011)

Proceso

Conjunto de actividades relativas a la obtención, elaboración, fabricación, preparación, conservación, mezclado, acondicionamiento, envasado, manipulación, transporte, distribución, almacenamiento y expendio o suministro al público del producto lácteo o el producto lácteo combinado. (Christian Turégano Roldán, 2011)

1.2 MICROORGANISMOS MESOFÍLICOS 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:

1. 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.
2. Las células microbianas que han sufrido graves lesiones son incapaces de multiplicarse.
3. 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 puedan 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

Escherichia coli (*E. coli*) es una bacteria que se encuentra normalmente en el intestino del ser humano y de los animales de sangre caliente. La mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas. Sin embargo algunas de ellas, como *E. coli* productora de toxina Shiga, pueden causar graves enfermedades a través de los alimentos. La bacteria se transmite al hombre principalmente por el consumo de alimentos contaminados, como productos de carne picada cruda o poco cocida, leche cruda, y hortalizas y semillas germinadas crudas contaminadas. (D'Aoust, 2007)

E. coli productora de toxina Shiga produce toxinas conocidas como toxinas Shiga por su semejanza con las toxinas producidas por *Shigella dysenteriae*. *E. coli* productora de toxina Shiga puede crecer a temperaturas que oscilan entre 7 °C y 50 °C, con una temperatura óptima de 37 °C. Algunas pueden proliferar en alimentos ácidos, hasta a un pH de 4,4, y en alimentos con una actividad de agua (a_w) mínima de 0,95.

E. coli productora de toxina Shiga se destruye cociendo los alimentos hasta que todas las partes alcancen una temperatura de 70 °C o más. *E. coli* O157: H7 es el serotipo de *E. coli* productora de toxina Shiga más importante por su impacto en la salud pública, pero hay también otros serotipos frecuentemente implicados en brotes y casos esporádicos. (D'Aoust, 2007)

1.2.2 LISTERIA MONOCYTOGENES

L. monocytogenes es un bacilo grampositivo, anaerobio facultativo, de crecimiento intracelular, no esporulado, catalasa positivo y oxidasa negativa, que crece fácilmente en agar sangre, produciendo hemólisis incompleta. La bacteria posee de uno a seis flagelos y exhibe una característica motilidad rotatoria “de movimientos tambaleantes” a 25°C. El crecimiento óptimo ocurre entre los 30-37°C, pero crece mejor que otras bacterias a temperaturas bajas (entre 4 y 10°C) y es resistente a los ambientes con pH bajo y alto contenido en sal. Estas características diferenciales con respecto a otros gérmenes, la convierten en un patógeno importante en la industria alimentaria. (D'Aoust, 2007)

En la tinción de gram, *Listeria* puede confundirse con un estreptococo, un enterococo o un difterioide, hecho que debe ser tenido en cuenta a la hora de interpretar los resultados en la práctica clínica. En el laboratorio, crece fácilmente en medios de cultivo habituales de líquidos estériles, como sangre o líquido cefalorraquídeo (LCR), pero no se aísla en el coprocultivo, ya que los medios usados de rutina inhiben su crecimiento.

Recientemente, han sido identificadas 17 especies del género *Listeria* spp.. Solo *L. monocytogenes* es patógena en humanos, aunque se han comunicado casos anecdóticos de infección por otras especies en individuos inmunodeprimidos. Existen, al menos, 13 serotipos basados en los antígenos O celular y H flagelar, aunque los subtipos productores de enfermedad son: 4b, 1/2a y 1/2 b. Técnicas de electroforesis en campo pulsado (PFGE) o *ribotyping* pueden ser empleadas para detectar brotes con fines epidemiológicos. (Burtin, 2005)

1.2.3. SALMONELLA SPP

La *Salmonella* es una bacteria que frecuentemente da origen a enfermedades causadas por los alimentos, también conocidas como “intoxicaciones alimentarias”. Los CDC estiman que cada año en los Estados Unidos la *Salmonella** da origen a 1 millón de casos de enfermedades causadas por los alimentos. En los últimos años,

los *brotos de salmonelosis** han sido vinculados a la contaminación de pepinos, pollo, huevos, pistachos, atún crudo, germinados y muchos otros alimentos. (D'Aoust, 2007)

La *Salmonella* se puede encontrar en muchos alimentos, entre ellos la carne de res, la carne de pollo, los huevos, las frutas, la carne de cerdo, los germinados, las verduras, e incluso los alimentos procesados, como las mantequillas de frutos secos, los pasteles de carne congelados, los trocitos de pollo empanizado y los platos de pollo relleno. En los últimos años, los brotes de enfermedades producidas por *Salmonella** han sido vinculados a la contaminación de pepinos, pollo, huevos, pistachos, atún crudo, germinados y muchos otros alimentos. Usted puede enfermarse cuando come alimentos que están contaminados con *Salmonella*. Los alimentos contaminados generalmente tienen un aspecto y un olor normal, por eso es importante saber cómo prevenir la infección de *Salmonella*. (D'Aoust, 2007)

2. TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS EN ALIMENTOS

Los principales avances en los ensayos de detección de patógenos en alimentos, basados en ácidos nucleicos, se produjeron a partir de 1980. 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. (V. & Echeverria, 2014)

El descubrimiento de la PCR, la clonación, la secuenciación y la tecnología de detección por fluorescencia, así como la accesibilidad a una gran cantidad de información en la web ayudó al desarrollo de nuevas herramientas moleculares, cuyo uso ha aumentado enormemente la habilidad para detectar y cuantificar bacterias

patógenas en agua y alimentos, entre estas, muchas bacterias emergentes, como por ejemplo; *Escherichia coli* O157, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter* spp., las cuales han representado una seria amenaza para la salud pública mundial. La segunda generación de métodos moleculares para la detección e identificación de géneros y especies son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la PCR múltiple, la secuenciación de genes específicos, el análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado, entre otros . (V. & Echeverria, 2014)

Recientemente, se ha dado un paso hacia las plataformas moleculares más sofisticadas para la identificación de microorganismos patógenos, incluyendo sistemas de amplificación *in vitro* en tiempo real, biosensores y microarreglos, los cuales han sido desarrollados o se están desarrollando para su uso como métodos rápidos en la detección de patógenos en alimentos. Algunos de los actuales métodos de detección molecular pueden ser empleados, además, en laboratorios o establecimientos clínicos, en sitios de observación, tales como la granja o el campo, en forma de kit todo en uno. (V. & Echeverria, 2014)

2.1. Extracción y purificación del ácido desoxirribonucleico

La extracción y purificación de ácidos nucleicos constituye la primera etapa de la mayoría de los estudios de biología molecular y de todas las técnicas de recombinación de ADN. En este caso, los métodos de extracción permiten obtener ácidos nucleicos purificados a partir de diversas fuentes para después realizar análisis específicos de modificaciones genéticas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La calidad y la pureza de los ácidos nucleicos son dos de los elementos más importantes en ese tipo de análisis. Si se desea obtener ácidos nucleicos muy purificados, que no contengan contaminantes inhibidores, es preciso aplicar métodos de extracción adecuados. Los contaminantes capaces de inhibir el análisis PCR se enumeran en la tabla 5. Con objeto de evitar los falsos negativos debidos a la presencia de inhibidores de la PCR en la muestra, se recomienda vivamente efectuar un experimento de control de la inhibición de la PCR, que suele

hacerse mediante PCR específica de vegetales (eucariotas o cloroplastos) o de la especie.

Inhibidor	Concentración de inhibición
Dodecilsulfato sódico	> 0,005 %
Fenol	> 0,2 %
Etanol	> 1 %
Isopropanol	> 1 %
Acetato de sodio	> 5 mM
Cloruro de sodio	> 25 mM
EDTA	> 0,5 mM
Hemoglobina	> 1 GM/ml
Heparina	> 0,15 UI/ml
Urea	> 20 mM
Mezcla de reacción	> 15 %

Tabla 1. Inhibidores de la PCR. (V. & Echeverria, 2014)

Los métodos de extracción permiten obtener ácidos nucleicos purificados a partir de diversas fuentes para después realizar, por ejemplo, análisis específicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

- Determinar la presencia de genes marcadores en Organismos Genéticamente Modificados (GMO).
- Determinar la presencia de mutaciones asociadas a enfermedades genéticas
- Detectar la presencia de ADN o ARN perteneciente a microorganismos o virus.

2.1.1 Métodos de extracción

Para extraer los ácidos nucleicos del material biológico es preciso provocar una lisis celular, inactivar las nucleasas celulares y separar los ácidos nucleicos de los restos de células. El procedimiento de lisis idóneo suele consistir en un equilibrio de

técnicas y ha de ser suficientemente fuerte para romper el material inicial complejo (un tejido, por ejemplo), pero suficientemente suave para preservar el ácido nucleico diana. Entre los procedimientos usuales de lisis figuran los siguientes:

- Rotura mecánica (tritución, lisis hipotónica, etc.)
- Tratamiento químico (detergentes, agentes caotrópicos, reducción con tioles, etc.)
- Digestión enzimática (Proteinasa K, etc.).

Es posible romper la membrana celular e inactivar las nucleasas intracelulares al mismo tiempo. Por ejemplo, una misma solución puede contener detergentes que solubilizan las membranas celulares y sales caotrópicas fuertes que inactiven las enzimas intracelulares. Tras la lisis celular y la inactivación de las nucleasas, los restos de células se eliminan fácilmente por filtración o precipitación. (V. & Echeverría, 2014)

2.1.2 Métodos de purificación

Los métodos empleados para purificar los ácidos nucleicos de extractos celulares suelen ser combinaciones de dos o más técnicas de las siguientes:

- Extracción/precipitación
- Cromatografía
- Centrifugación
- Separación por afinidad.

2.1.3 Extracción/precipitación

A menudo se efectúa una extracción con disolventes para eliminar los contaminantes de los ácidos nucleicos. Por ejemplo, suele emplearse una combinación de fenol y cloroformo con objeto de eliminar las proteínas. Para concentrar los ácidos nucleicos suele realizarse una precipitación con isopropanol o etanol. Si la cantidad de ácido nucleico diana es escasa, puede añadirse a la mezcla un portador inerte (como el glucógeno) para favorecer la precipitación. También puede realizarse una

precipitación selectiva con concentraciones salinas elevadas (precipitación salina) o una precipitación de las proteínas mediante cambios del pH. (Chan, 2002)

2.1.4 Cromatografía

Pueden emplearse diversas técnicas cromatográficas de separación: permeación sobre gel, intercambio iónico, adsorción selectiva o unión por afinidad. La permeación sobre gel aprovecha las propiedades de las partículas porosas del gel para tamizar moléculas. Se emplea una matriz con poros de tamaño definido, que dejan pasar las moléculas más pequeñas por difusión, pero no las más grandes, que quedan eluidas en el volumen vacío. Así pues, las moléculas quedan eluidas por orden de tamaño decreciente. La cromatografía de intercambio iónico es otra técnica, que se basa en la interacción electrostática de la molécula diana con un grupo funcional de la matriz en columna. Los ácidos nucleicos (polianiones lineales con fuerte carga negativa) pueden eluirse de las columnas de intercambio iónico con simples Tampones salinos. En la cromatografía de adsorción, los ácidos nucleicos se fijan selectivamente en sílice o vidrio, en presencia de determinadas sales (por ejemplo, sales caotrópicas), mientras que otras moléculas biológicas no se fijan. A continuación, los ácidos nucleicos pueden eluirse con agua o un tampón hiposalino y se obtiene una muestra que puede emplearse directamente en las aplicaciones posteriores. (Chan, 2002)

2.1.5 Centrifugación

La centrifugación selectiva constituye un método de purificación eficaz. Así, por ejemplo, la ultracentrifugación en gradientes autogenerados de CsCl con fuerzas g elevadas se lleva empleando mucho tiempo para purificar plásmidos. La centrifugación suele asociarse a otros métodos, como la cromatografía de columna centrifugada, en cuyo caso se combina la permeación sobre gel y la centrifugación para separar el ADN o ARN de contaminantes más pequeños (sales, nucleótidos, etc.), intercambiar tampones o seleccionar según el tamaño. Algunos procedimientos

combinan la adsorción selectiva en matriz cromatográfica (véase el apartado anterior «Cromatografía») y la elución por centrifugación para purificar de forma selectiva un tipo de ácido nucleico. (Chan, 2002)

2.1.6 Separación por afinidad

En los últimos años, cada vez son más los métodos de purificación que combinan la inmovilización por afinidad de ácidos nucleicos y la separación magnética. Por ejemplo, los ARNm poli A + pueden unirse a partículas magnéticas revestidas de estreptavidina mediante oligo dT marcados con biotina, y el complejo de partículas puede eliminarse de la solución (y de los contaminantes libres) con un imán. Esta técnica en fase sólida simplifica la purificación de los ácidos nucleicos, pues permite sustituir las etapas de centrifugación, extracción orgánica y separación de fases por una operación de separación magnética, única y rápida. (V. & Echeverría, 2014)

3. MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN CON CTAB

El protocolo del método del bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) fue elaborado por Murray y Thompson en 1980 y publicado posteriormente, en 1987, por Wagner y sus colaboradores. El método es adecuado para extraer y purificar ADN de vegetales y alimentos derivados de vegetales y está especialmente indicado para eliminar los polisacáridos y los compuestos polifenólicos, que, de otro modo, alterarían la pureza del ADN y, por tanto, su calidad. Este procedimiento se ha aplicado con frecuencia en genética molecular de los vegetales y ha sido probado en ensayos de validación para detectar OGM). Se han elaborado algunas variantes adicionales para adaptar el método a una amplia gama de matrices de alimentos transformados o sin transformar. (V. & Echeverría, 2014)

3.1. Principios del método del CTAB: lisis, extracción y precipitación

Las células vegetales pueden lisarse con el detergente iónico bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB), que forma un complejo insoluble con los ácidos nucleicos en medio hiposalino. De ese modo, los polisacáridos, los compuestos fenólicos y los demás contaminantes permanecen en el sobrenadante y pueden eliminarse por lavado. El complejo de ADN se solubiliza aumentando la concentración salina y se precipita con etanol o isopropanol. En esta sección se describirán los principios de las tres etapas principales: la lisis de la membrana celular, la extracción del ADN genómico y su precipitación. (V. & Echeverria, 2014)

Lisis de la membrana celular: Tal como se ha mencionado anteriormente, la primera etapa de la extracción del ADN es la rotura de la membrana celular y nuclear, para lo cual la muestra homogeneizada se trata primero con el tampón de extracción, que contiene EDTA, Tris-HCl y CTAB. Todas las membranas biológicas presentan la misma estructura general, integrada por moléculas de lípidos y de proteínas, unidas por interacciones no covalentes.

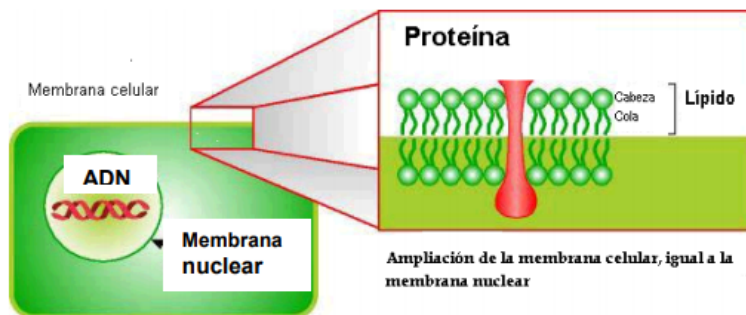


Ilustración 1. Representación simplificada de las membranas celulares (V. & Echeverria, 2014)

Tal como muestra la ilustración 1, las moléculas lipídicas están ordenadas en una doble capa continua, en la que las moléculas proteínicas están «disueltas». Las moléculas lipídicas están formadas por extremos hidrófilos, denominados «cabezas», y extremos hidrófobos, denominados «colas». En este método, el detergente (CTAB) contenido en el tampón de extracción provoca la lisis de la membrana. Dado que la composición de los lípidos y del detergente es similar, el componente de CTAB del

tampón de extracción captura los lípidos que integran la membrana celular y nuclear. La ilustración 2 muestra el mecanismo de solubilización de los lípidos con un detergente.

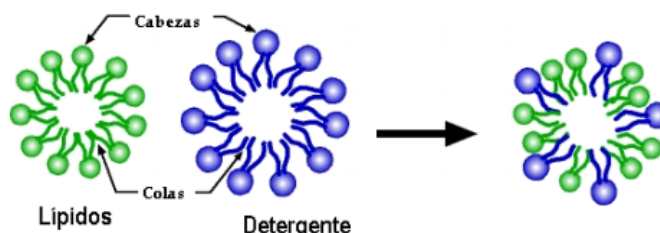


Ilustración 2. Solubilización de los lípidos. (V. & Echeverria, 2014)

La ilustración 3 muestra cómo se libera el ADN genómico cuando el detergente captura los lípidos y las proteínas al entrar en contacto la membrana celular y el tampón de extracción con CTAB. Con una concentración salina (NaCl) determinada, el detergente forma un complejo insoluble con los ácidos nucleicos. El EDTA es un componente quelante, que se une al magnesio, entre otros metales. El magnesio es un cofactor de la desoxirribonucleasa. Al unir el magnesio al EDTA, la actividad de la desoxirribonucleasa presente disminuye. El Tris-HCl confiere a la solución la capacidad de amortiguar el pH (un pH inferior o superior daña el ADN). Es importante señalar que, como los ácidos nucleicos se degradan fácilmente en esta fase de la purificación, debe reducirse al mínimo el tiempo transcurrido entre la homogeneización de la muestra y la adición de la solución tampón con CTAB. Una vez que se han roto las membranas de la célula y de los orgánulos (como los que se encuentran alrededor de las mitocondrias y los cloroplastos), se purifica el ADN.

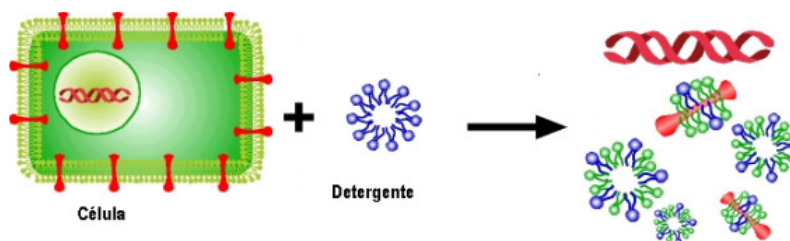


Ilustración 3. Rotura de la membrana celular y extracción del ADN genómico. (V. & Echeverría, 2014)

Extracción: En esta etapa, se separan los complejos formados por los ácidos nucleicos y el CTAB de los polisacáridos, los compuestos fenólicos, las proteínas y los demás lisados celulares disueltos en la solución acuosa. Es especialmente importante eliminar los polisacáridos y los compuestos fenólicos, pues pueden inhibir numerosas reacciones enzimáticas. En concentraciones hiposalinas ($\text{NaCl} < 0,5 \text{ M}$), los contaminantes de los complejos de ácidos nucleicos no precipitan y pueden eliminarse extrayendo la solución acuosa con cloroformo. El cloroformo desnaturaliza las proteínas y facilita la separación de las fases acuosa y orgánica. La fase acuosa suele constituir la fase superior. No obstante, si dicha fase es densa debido a la concentración salina ($> 0,5 \text{ M}$), formará la fase inferior. Además, si el pH de la solución acuosa no se ha equilibrado debidamente ($\text{pH } 7,8 - 8,0$), los ácidos nucleicos tenderán a repartirse en la fase orgánica. Si es preciso, la extracción con cloroformo se realizará dos o tres veces, con objeto de eliminar por completo las impurezas de la capa acuosa. Para perfeccionar la extracción de los ácidos nucleicos, puede retroextraerse la fase orgánica con una solución acuosa, que se añade a continuación al extracto anterior. Una vez purificados los complejos de ácidos nucleicos, puede procederse a la precipitación, última etapa del procedimiento. (Burtin, 2005)

Precipitación: En esta última etapa se separan los ácidos nucleicos del detergente, para lo cual la solución acuosa se trata primero con una solución de precipitación compuesta por una mezcla de CTAB y NaCl en concentración elevada ($\text{NaCl} > 0,8$

M). Una alta concentración salina es necesaria para que se forme un precipitado de ácidos nucleicos. Puede ser preferible emplear acetato de sodio en lugar de NaCl por su capacidad tampón. En estas condiciones, el detergente, que es más soluble en alcohol que en agua, puede eliminarse por lavado, mientras que los ácidos nucleicos precipitan. El posterior tratamiento con etanol al 70 % permite una mayor purificación o elución de los ácidos nucleicos de la sal residual. (Burtin, 2005)

3.2 Cuantificación del ADN mediante espectrofotometría

El ADN, el ARN, los oligonucleótidos e incluso los mononucleótidos pueden cuantificarse directamente en soluciones acuosas, en forma diluida o sin diluir, midiendo la absorbancia A (o densidad óptica, DO) de luz ultravioleta (también puede hacerse en el intervalo visible). Si la muestra es pura, es decir, no contiene cantidades significativas de contaminantes como proteínas, fenol o agarosa, la medición espectrofotométrica de la irradiación ultravioleta absorbida por las bases es sencilla y exacta. En este método, los tampones acuosos con escasa concentración iónica (por ejemplo, tampón TE) resultan idóneos. La concentración de ácidos nucleicos suele determinarse midiendo a 260 nm y comparando con un blanco. La interferencia de contaminantes puede determinarse calculando un «cociente». Dado que las proteínas absorben a 280 nm, se emplea el cociente A_{260}/A_{280} para calcular la pureza de los ácidos nucleicos. Los cocientes respectivos del ADN y el ARN puros son aproximadamente de 1,8 y 2,0. Una absorción a 230 nm significa que la muestra está contaminada con hidratos de carbono, péptidos, fenoles, compuestos aromáticos u otras sustancias. El cociente A_{260}/A_{230} de las muestras puras es de 2,2 aproximadamente. Cuando la cantidad disponible de ácidos nucleicos es escasa, puede emplearse el método de la placa de agarosa con bromuro de etidio. Permite calcular la cantidad de ácidos nucleicos a partir de la intensidad de la fluorescencia emitida por el bromuro de etidio irradiado con luz UV, comparándola con unos patrones de concentración. (Burtin, 2005)

3.2.1 Principios de la cuantificación de ADN por espectrofotometría

El espectrofotómetro se funda en la transmisión de la luz a través de una solución para determinar la concentración de un soluto presente en la misma. El aparato funciona conforme a un principio sencillo: se irradia una muestra con una radiación luminosa de longitud de onda conocida y se mide la energía luminosa transmitida con una célula fotoeléctrica situada detrás de la muestra. Tal como muestra la figura 4, el espectrofotómetro de haz único consta de una fuente luminosa, un prisma, un recipiente con la muestra y una célula fotoeléctrica. Los distintos elementos están conectados a los sistemas eléctricos o mecánicos adecuados para controlar la intensidad luminosa y la longitud de onda y para convertir en variaciones de tensión la energía recibida en la célula fotoeléctrica. Las variaciones de tensión se miden en un contador o se registran en un ordenador para su posterior análisis. (Burtin, 2005)

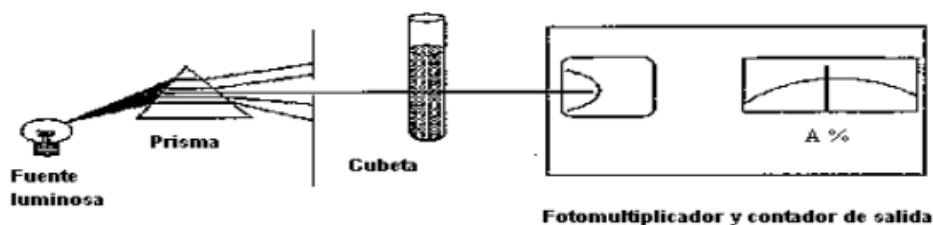


Ilustración 4. Representación esquemática de la transmisión de la luz. (Chan, 2002)

Cada molécula absorbe la energía radiante a una longitud de onda específica, a partir de la cual es posible extrapolar la concentración de un soluto en una solución. Con arreglo a la ley de Lambert-Beer, existe una relación lineal entre la absorbancia A (también denominada densidad óptica, DO) y la concentración de la macromolécula, conforme a la ecuación siguiente:

$$A = DO = \epsilon lc$$

donde ϵ es el coeficiente de extinción molar, c es la concentración y l es el paso de luz de la cubeta. Las proteínas y los ácidos nucleicos absorben la luz en el intervalo

ultravioleta, a longitudes de onda comprendidas entre los 210 y los 300 nm. Tal como se ha señalado anteriormente, la absorbancia máxima de las soluciones de ADN y ARN corresponde a 260 nm y la de las soluciones de proteínas, a 280 nm. Dado que las soluciones de ADN y ARN absorben parcialmente la luz a 280 nm y las que contienen proteínas hacen lo propio a 260 nm, el cociente de los valores obtenidos a 260 nm y a 280 nm (A_{260}/A_{280}) proporciona una estimación del grado de pureza de los ácidos nucleicos. Los cocientes A_{260}/A_{280} respectivos del ADN y el ARN puros son aproximadamente de 1,8 y 2,0. Con un paso de luz de 10 mm y una longitud de onda de 260 nm, una absorbancia $A = 1$ corresponde aproximadamente a 50 $\mu\text{g/ml}$ de ADN bicatenario, 37 $\mu\text{g/ml}$ de ADN monocatenario, 40 $\mu\text{g/ml}$ de ARN o 30 $\mu\text{g/ml}$ de oligonucleótidos. Si la muestra también contiene proteínas, el cociente A_{260}/A_{280} será considerablemente inferior a dichos valores y no podrá determinarse con exactitud la cantidad de ácidos nucleicos. Debe precisarse que la espectrofotometría no permite identificar de forma fiable impurezas de ARN presentes en las soluciones de ADN. Puede emplearse la absorbancia a 325 nm para poner de manifiesto la presencia de restos en la solución o la suciedad de la cubeta. (Chan, 2002)

4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

4.1 Elección de la cubeta.

La cantidad de solución de ácidos nucleicos necesaria para medir la absorbancia A depende de la capacidad de la cubeta. Debe elegirse una cubeta apropiada atendiendo al intervalo de concentración de la muestra, el factor de dilución y el volumen de la muestra. En la mayor parte de los procedimientos empleados para detectar OGM, el volumen de ADN genómico disponible varía entre 50 y 100 μl . Para la cuantificación espectroscópica de pequeños volúmenes de ácidos nucleicos se emplean diversos tipos de cubetas de microvolumen, cuya capacidad oscila entre 5 y 70 μl .

4.2 Preparación.

Para calibrar el espectrofotómetro es importante:

- Establecer el paso de luz correcto
- Establecer el factor correcto (ADN bicatenario, ADN monocatenario o ARN)
- Medir la solución en blanco (establecer la referencia), que será agua o solución tampón ($A_{260} = 0$)
- Cerciorarse de que la referencia establecida se renueva periódicamente; • medir una cantidad conocida de ácidos nucleicos puros para comprobar la fiabilidad de la referencia establecida.

4.3 Medición en una muestra desconocida.

Para medir la concentración, se utilizan cantidades determinadas de solución de ADN en función de la capacidad de la cubeta empleada (por ejemplo, 5 μ l de ADN diluidos en 195 μ l de agua si la capacidad de la cubeta es inferior a 0,2 ml). Después de calibrar el espectrofotómetro y de añadir la solución de ácidos nucleicos, se tapa la cubeta, se mezcla la solución y se mide la absorbancia. Con objeto de reducir los errores de pipeteado, debe efectuarse la medición al menos dos veces y siempre con 5 μ l de solución de ADN, como mínimo. Se desaconsejan los valores de A_{260} inferiores a 0,02 o comprendidos entre 1 y 1,5 (según el instrumental empleado) por el elevado margen de error que entrañan. La concentración c de un ácido nucleico determinado presente en una solución se calcula conforme a las ecuaciones siguientes:

- ADN monocatenario: $c(\text{pmol}/\mu\text{l}) = A_{260}/0.027$
- ADN bicatenario: $c(\text{pmol}/\mu\text{l}) = A_{260}/0.020$
- ARN monocatenario: $c(\text{pmol}/\mu\text{l}) = A_{260}/0.025$
- Oligonucleótido: $c(\text{pmol}/\mu\text{l}) = A_{260}100/1.5N_A + 0.71N_C + 1.20N_G + 0.84N_T$ donde A_{260} es la absorbancia medida a 260 nm.

El cuadro 2 recoge un ejemplo de los valores de la absorbancia de ADN de timo de ternera muy purificado, en suspensión en un tampón TNE 1x, considerando que el ADN de referencia es ADN bicatenario, con una $A_{260} = 1$ a 50 $\mu\text{g/ml}$, en una cubeta cuyo paso de luz es de 10 mm. La concentración nominal de ADN era de 25 $\mu\text{g/ml}$.

Longitud de onda	Absorbancia	A_{260}/A_{280}	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)
325	0,01	-	-
280	0,28	-	-
260	0,56	2,0	28
230	0,30	-	-

Tabla 2. Valores de la absorbancia de ADN de timo de ternera muy purificado, en tampón TNE 1x.

5. REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de laboratorio utilizada para amplificar secuencias de ADN. El método utiliza secuencias cortas de ADN llamados cebadores para seleccionar la parte del genoma a amplificar. La temperatura de la muestra se sube y se baja repetidamente para ayudar a la enzima de replicación del ADN a duplicar la secuencia del ADN que está siendo copiada. Con esta técnica se pueden producir un billón de copias de la secuencia en estudio en sólo unas pocas horas. (Hanna & Wang, 2005)

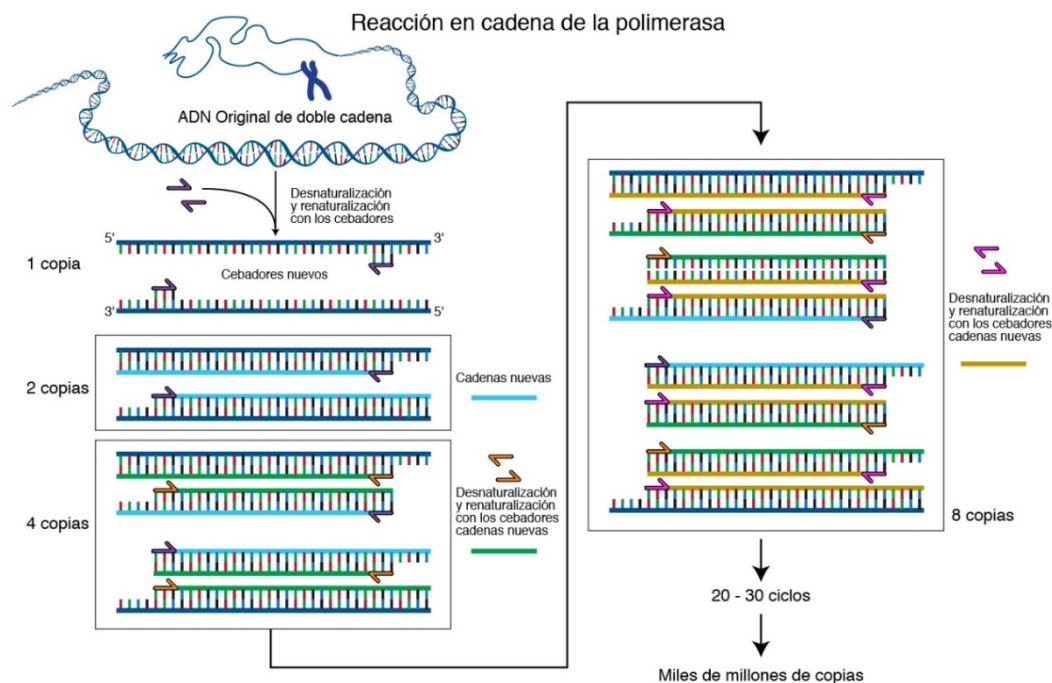


Ilustración 5. Reacción en cadena de polimerasa

PCR, o la reacción en cadena de la polimerasa, es una reacción química que los biólogos moleculares utilizan para amplificar (crear copias) fragmentos de ADN. Esta reacción permite que unos pocos fragmentos de ADN se repliquen en millones o miles de millones de copias. La amplificación del ADN nos permite estudiar la molécula del ADN en detalle en el laboratorio. Para amplificar un segmento de ADN utilizando la RCP, primero se calienta la muestra para la desnaturalización del ADN, es decir para que se separe en dos segmentos de una sola hebra de ADN. Luego, una enzima llamada "polimerasa Taq" sintetiza - construye - dos nuevas hebras de ADN, utilizando las hebras originales como plantillas. Este proceso resulta en la duplicación del ADN original, en la que cada una de las nuevas moléculas contiene una hebra vieja y una hebra nueva de ADN. Entonces, cada una de estas hebras puede usarse para crear dos copias nuevas, y así sucesivamente. El ciclo de la desnaturalización y síntesis del nuevo ADN se repite tantas como 30 o 40 veces,

dando lugar a más de mil millones de copias exactas del segmento de ADN original. (Chan, 2002)

El proceso de ciclado completo de la RCP es automático y puede completarse en tan sólo unas pocas horas. El proceso es dirigido por una máquina llamada termociclador, que está programada para cambiar la temperatura de la reacción cada poco minuto para hacer posible la desnaturalización y síntesis del ADN.

6. IDENTIFICACIÓN DE POLINUCLEOTIDOS POR ELECTROFORESIS

La electroforesis es una técnica que emplean los científicos en el laboratorio utilizada para separar el ADN, el ARN, o moléculas o proteínas en base a su tamaño y carga eléctrica. Se utiliza una corriente eléctrica para mover las moléculas y que se separen a través de un gel. Los poros del gel actúan como un colador, permitiendo que las moléculas más pequeñas se muevan más rápido que las grandes. Las condiciones utilizadas durante la electroforesis se pueden ajustar para separar moléculas en el rango de tamaño que se desee. (Harris & Zagory, 2002)

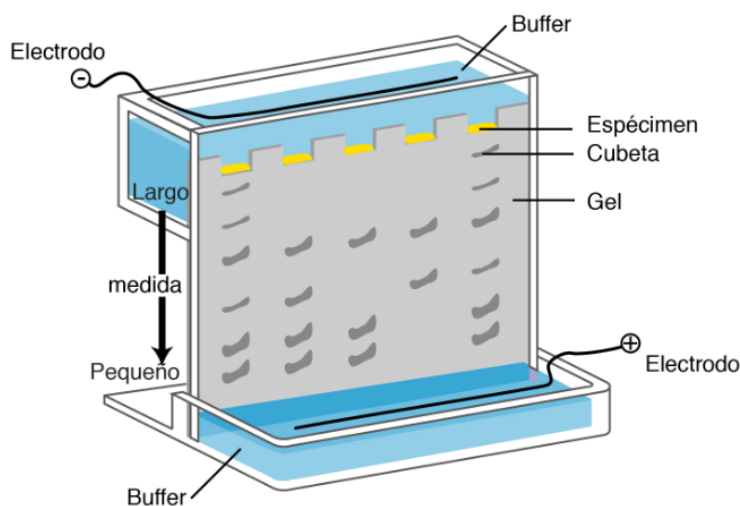


Ilustración 6. IDENTIFICACIÓN DE POLINUCLEOTIDOS POR ELECTROFORESIS

La electroforesis es una técnica que se utiliza de forma generalizada en la que, fundamentalmente, se aplica corriente eléctrica a moléculas biológicas, ya sean ADN, proteínas o ARN, y se separan en función de si son más grandes o más pequeñas. Se utiliza en una gran variedad de aplicaciones, como en medicina forense para determinar la identidad de las personas que puedan haber participado en un delito, mediante la vinculación de su patrón de ADN su patrón de electroforesis- a uno que esté en una base de datos. El proyecto genoma humano se llevó a cabo con algo que se llama electroforesis capilar, mediante la separación de ADN en piezas más cortas y su separación en geles de electroforesis que permite a los patrones de A, C, T y G ser caracterizados. También son muy importantes en la investigación de proteínas, y en la investigación de mutaciones genéticas, porque cuando las proteínas o el ADN están mutados, son con frecuencia más o menos largos, y por lo tanto, aparecen en un gel de electroforesis de manera diferente de lo normal. Las pruebas de diagnóstico para muchos casos todavía se realizan mediante electroforesis. Es una técnica muy utilizada en la investigación básica, muy importante para la comprensión de la función de genes y proteínas, pero ahora ha irrumpido en el área de diagnóstico clínico y forense. Una electroforesis se realiza generalmente en una especie de caja que tiene una carga positiva en un extremo y una carga negativa en el otro. Y como todos aprendimos en las clases de física, cuando se pone una molécula cargada en un entorno así, las moléculas negativas van a la carga positiva, y viceversa. Al analizar las proteínas en un gel, en una de estas cajas, por lo general se toma la proteína completa para ver lo grande que es. Cuanto más corta, más migran en el gel, de modo que las proteínas pequeñas terminará en la parte inferior del gel, porque han ido más lejos, y las más grandes terminarán quedándose en la parte superior. En el caso del ADN, el ADN es una molécula muy larga, así que no se puede hacer un gel de una molécula entera de ADN de una célula. Es tan grande que nunca se metería en el gel, así que lo que hacen los científicos es cortar el ADN con cosas como las enzimas de restricción, que cortan el ADN en pedazos más manejables, y entonces esas piezas,

dependiendo de lo grande que sean, migran más o menos por el gel y terminan más arriba o más abajo. (Harris & Zagory, 2002)

CAPITULO 2. METODOLOGIA

2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.1 Microorganismos de referencia

Cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Lysteria monocitogenes* y *Staphylococcus aureus*. Se aislaron en el laboratorio de Microbiología de Alimentos del Instituto Tecnológico de Oaxaca. Se prepararon cultivos mediante la inoculación de una colonia independiente de cada cepa en 5 ml de medio líquido apropiado a 37°C con agitación a 250 rpm durante 24 h. El crecimiento celular se estimó mediante la medición de la absorbancia a 600 nm, y las concentraciones reales se determinaron realizando cultivos de las diluciones en los medios apropiados.

2.1.2 Obtención de las muestras

Se adquirieron muestras de productos lácteos provenientes de Reyes Etlá Oaxaca que fueron leche broca y queso de diferentes establos y queserías. Los productos fueron colocados en bolsas de plástico estériles, etiquetados y colocados en hieleras a una temperatura de 4-8 °C y fueron procesadas en un lapso máximo de 2 h después de su traslado al laboratorio.

2.1.3 Extracción de ADN directa de productos lácteos

Se pesaron 20 g de cada producto de queso y 20 ml de leche broca y se homogeneizaron con 60 ml de agua inyectable. Posteriormente, 40 mL del producto molido fue centrifugado a 2500 xg. Se eliminó la grasa superficial por aspiración. Se tomaron 10 ml del sobrenadante y se le añadieron 800 µL de EDTA 0.5 M. La muestra se incubó a 40°C, 5 min. A continuación, la muestra se centrifugó a 4700 xg durante 15 min a temperatura ambiente. Se eliminó la capa de grasa por aspiración. Se eliminó el sobrenadante dejando aproximadamente 50 µL en cada tubo. El sedimento se resuspendió en 450 µL en buffer de lisis. Se agregaron 3 µL de DNasa I y se incubó 5 min a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se

centrifugaron 2 min a 15,000 xg. Se eliminó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió por pipeteo en 100 uL de PS con EDTA 1 mM. Se agregó tripsina y se llevó a incubación 5 min a temperatura ambiente con mezclado periódico. Fueron añadidos 400 uL de PS+T y se centrifugó 2 min a 15,000 xg. El sobrenadante fue eliminado y la pastilla formada se diluyó en 50 uL de agua inyectable. Las muestras fueron guardadas a -20°C hasta su uso.

2.1.4 Análisis microbiológico de alimentos

Se pesaron 20g de muestra y se molieron con 180 ml de caldo lauril, teniendo así una dilución 1:10, de la molienda se tomó 0.1 gramos de la dilución y se sembró en cajas Petri que contenían Agar para Cuenta Estándar (ACS), Agar Baird Parker (BP), Agar de Papa y dextrosa (PDA) para finalmente dejar incubando en una estufa a 35°C por 48 horas. Terminado el tiempo de incubación se procedió a tomar lectura de los microorganismos crecientes en el agar.

MUESTRA	CONVENCIONAL							KIT	
	ACS (0.1ML) UFC	CT	CF	STRAPHYLOCOCCUS	SALMONELA	PDA (H Y L)	ACC	SALMONELLA	LISTERIA
A	1967	9	1054	250	NEGATIVO	17	10	NEGATIVO	NEGATIVO
B	3933	257	741	3733	NEGATIVO	7	4104	NEGATIVO	NEGATIVO
C	3363	60	10	3363	NEGATIVO	52	24	NEGATIVO	NEGATIVO
D	3480	0	0	3480	NEGATIVO	15	1397	NEGATIVO	POSITIVO
E	627	0	0	9462	NEGATIVO	25	1568	NEGATIVO	NEGATIVO
F	105	90	0	6270	NEGATIVO	28	1148	NEGATIVO	NEGATIVO
G	585	8	3562	2821	NEGATIVO	1480	8	NEGATIVO	NEGATIVO
H	3961	1	26	778	NEGATIVO	109	589	NEGATIVO	NEGATIVO
I	4805	12	589	3509	NEGATIVO	4104	26	NEGATIVO	NEGATIVO

Tabla 2 . Cuantificación de microorganismos presentes en la leche mediante técnicas microbiológicas

Detección de *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes* mediante el kit RapidCheck®

Para la determinación de *Salmonella spp* se partió de un cultivo de 180 ml y se le agregaron 20 g de la muestra, posteriormente se incubó de 16-22 horas a 42°C. Se

tomaron 100 µl del medio de enriquecimiento y se depositaron en un tubo de vidrio, donde se coloca 1 ml de medio secundario, posteriormente se incubó de 16-22 horas a 42°C. Se dejó enfriar y posteriormente, se insertó una tira de reactivo con las flechas hacia abajo y se desarrolló el resultado durante 10 minutos. La aparición de una línea roja indicó el resultado negativo, y la aparición de dos líneas rojas indicó el resultado positivo.

Extracción de ADN genómico de las cepas

Se utilizará el método de extracción de ADN de Birnboim y Doli (1979). El caldo de cultivo con una colonia independiente cultivada durante 12 h se dividirá en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se centrifugará 3 min a 12000 rpm y se decantará el sobrenadante. Se agregarán 110 µl de solución salina P1 (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0) más 3 µl de RNAsa (20 mg/ml) y se suspenderá la pastilla, se adicionarán 110 µl de solución P2 (NaOH 0.2 N, SDS 1%, preparar al instante), mezclando por inversión lentamente 4 veces y finalmente se agregarán 135 µl de solución P3 (60 ml CH₃COOK 5 M, 11.5 ml CH₃COOH glacial, 28.5 ml agua) agitando por inversión. Para la separación de proteínas, se incubará por 10 minutos a temperatura ambiente y se adicionará 200 µl de cloroformo a 4°C, se mantendrá en agitación hasta formar un precipitado blanco y se llevará a centrifugación por 10 minutos a 12,000 rpm. El sobrenadante será recuperado en un tubo de 1.5 ml y se depositará un volumen de isopropanol a -20°C agitando por inversión. Se centrifugará por 10 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante será desechado, se agregarán 500 µl de etanol al 70% y se agitará para disolver la pastilla formada, se centrifugará 5 minutos a 12,000 rpm, se decantará y se dejará secar por 10 minutos. El ADN se almacenará a -20 ° C y será diluido con agua libre de nucleasas. La pureza del ADN se determinará estableciendo la relación de absorbancia 260/280 entre un rango de 1.8 – 2.0. La integridad se evaluará utilizando un gel de agarosa al 2%.

Tratamiento de las muestras de productos lácteos.

El análisis de muestras de leche se realizará mediante el protocolo de extracción de ADN de *E. coli* O157 y *L. monocytogenes*, descrito por Paul y colaboradores (Paul y col., 2013; Paul y col., 2015). En tubos de centrifuga de 15 ml se agregarán 10 ml de una solución (25 ml de leche en 25 ml de agua destilada). Se añadirán 800 µL de EDTA 0.5 M y se mantendrá a 40°C durante 5 min. Las diluciones de bacterias (50 µL) serán agregadas a la suspensión calentada y se mezclarán por inversión. La muestra será centrifugada durante 15 min a 4,700 xg a temperatura ambiente. La capa de grasa se eliminará por aspiración en todas las muestras. Se recolectarán 50 µL de sobrenadante con una punta limpia. El sedimento se resuspenderá en 450 µL de buffer de lisis (SDS 0.1%, NaCl 30 mM, MgCl₂ 2mM) por pipeteo y será transferido a un tubo de microcentrifuga que contendrá ADNasa I (2 ml de 500 U/ml en Tris 10 mM, CaCl₂ 2mM, MgCl₂ 2mM, pH 7.5), y se incubará durante 5 min. El tubo será centrifugado durante 2 minutos a 15,000 xg. El sobrenadante se eliminará por aspiración y el sedimento se resuspenderá por pipeteo en 100 µL de PS (NaCl 0.85%) con EDTA 1 mM. Se agregará tripsina (5 ml de 2 mg/ml en buffer de fosfatos) a las muestras y se incubarán durante 5 minutos a temperatura ambiente con mezclado periódico. Se añadirán 400 µL de PS + T (NaCl 0.85% + Tween 20 0.1%) y el tubo se centrifugará durante 2 minutos a 15,000 xg. El sobrenadante será eliminado por aspiración.

Extracción de ADN mediante reactivos HotShot

A tubos de 0.6 ml con <5 µL de muestra, se añadirá 5 µL de HS + T [reactivo HotShot (NaOH 25 mM + Na₂EDTA 0.2mM, pH 12.0) + Tween 20 0.1%] de concentración 5X. El tubo se centrifugará ligeramente para sedimentar los sólidos, después de lo cual se mezclarán los contenidos del tubo por agitación. La muestra se calentará durante 5 min a 95°C. y se enfriará rápidamente a 20°C. Se añadirá un volumen de 5 µL HS neutralizador (Tris-HCl 40 mM, pH 5.0) de concentración 5X, se centrifugará para sedimentar los sólidos, después de lo cual se mezclará por agitación. Este material será utilizado para los procedimientos de la PCR. Por otra

parte, se evaluará la extracción de ADN utilizando 10 µL de la solución de extracción QuickExtract™ + 0.1 µL de lisozima (Ready-lyse lysozyme solution) sobre una muestra de 2 µl. El contenido de los tubos se mezclará por agitación y se incubará a temperatura ambiente durante 15 min, después de lo cual se calentará a 80°C durante 1-10 min. Los contenidos se utilizarán para las determinaciones de la PCR.

PCR estándar

Se realizarán ensayos de PCR para evaluar la calidad de ADN extraído de las bacterias control. Se optimizarán gradientes de temperatura y concentración de primers. Como control positivo de amplificación se utilizará una muestra de ADN genómico de E-coli DH5. La Tabla 2 muestran las concentraciones finales de los reactivos para amplificación de muestras de DNA de leche a evaluar las cuáles serán programadas en un termociclador (Labnet, modelo Multigene Gradient TC9600-G) utilizando los primers sintetizados y el ADN genómico correspondientes a cada microorganismo.

COMPONENTE	20 µl/ RXN	CONCENTRACIÓN FINAL
H2O	7.4 µL	
2X Phusion Flash PCR Master Mix	10 µL	1X
Primer Fw	0.8 µL	0.5 µM
Primer Rw	0.8 µL	0.5 µM
ADN de plantilla	1 µL	1pg–10 ng

Tabla 3 Componentes de reacción de PCR

Con el objetivo de amplificar de manera óptima la secuencia se realizarán gradientes de temperatura de 55°C a 67°C. La temperatura teórica de la amplificación será

tomada de acuerdo a la temperatura de metilación de los primeros sintetizados.

2.1.5 Extracción de ADN de cultivos bacterianos con kit Thermo scientific

Para este protocolo se utilizó una colonia independiente de cada microorganismo. Los microorganismos aislados fueron cultivados en medio líquido enriquecido durante 12 h a 37°C. Se siguieron las indicaciones del fabricante y el producto final se rehidrató con 20 µl de agua inyectable.

2.1.6 Cuantificación de pureza e integridad

La cuantificación de ADN se realizó utilizando un Nanodrop (NanoDrop 2000, Termo Scientific Fisher). Se calculó la relación A260nm/A280nm, la cual debe tener un valor superior a 1.8, asumiendo que cuando el valor es igual a 2, el extracto es óptimo para posteriores procesos moleculares.

2.1.7 Electroforesis en gel de agarosa

Esta técnica fue empleada para analizar la integridad del ADN. Los geles empleados se prepararon al 1.5% de agarosa. Las muestras fueron preparadas en buffer TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA, pH 8.0), como agente intercalante se utilizó bromuro de etidio (BrEt) con una concentración de 0.04 µg/ml. Para la homogeneización de las muestras, se añadió 3 µL de buffer de carga (Loading Buffer 6X) y se mezcló por pipeteo. Se empleó como buffer de corrida TAE 1X, el voltaje fue de 80 V por 1 h y los resultados fueron analizados mediante un de luz UV con una longitud de onda de 302 nm.

Análisis electroforético

Esta técnica será empleada para analizar resultados de reacciones de alineamiento, integridad de ADN y productos de la PCR. Las concentraciones de los geles empleados se realizarán entre 0.7% y 2%, y serán preparados en buffer TAE 1X (40mM Tris, 20mM ácido acético, 1mM EDTA, pH=8). Como marcador de peso molecular se utilizará GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). Se empleará como buffer de corrida TAE 1X, y un voltaje de 90V por 1 hora. Las muestras serán tratadas con distintos volúmenes de Buffer de carga 6X y Bromuro de Etidio (BrEt) a

PASO DEL CICLO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización Inicial	98	10 s	1
Desnaturalización	98	10 s	30
Alineamiento	63.5	10 s	30

una concentración 0.04 µg/ml y serán observadas mediante un transiluminador con una longitud de onda de 302 nm.

CAPITULO 3 RESULTADOS

El método microbiológico convencional para *Salmonella* spp mostró resultados negativos para todas las muestras; y resultados negativos en todas las muestras para la detección de *Listeria monocytogenes*. Mediante el kit comercial para *Salmonella* spp mostró resultados negativos para todas las muestras; y resultados negativos en todas las muestras para la detección de *Listeria monocytogenes* excepto la muestra de el queso de la queseria los tres reyes” (Tabla 1).

La extracción de bacterias de queso por el método directo, permitió obtener material genético con alta calidad e integridad en un tiempo de 4 horas con absorbancias de 1.8 a 2 (Figura 1, Tabla 2). Las colonias de cada uno de los microorganismos de referencias fueron crecidas en Agar Cromogénico de Coliformes para la detección microbiológica de *E. Coli*, Agar sulfito Bismuto para *Salmonella*, Baird Parker para *Staphylococcus aureus* y Agar Oxford para *Listeria monocytogenes*. Se obtuvieron colonias de hasta 1×10^3 UFC/g para cada una de las muestras. Lo anterior indica la presencia de microorganismos patógenos en los alimentos de queso y que estos productos no cumplen con los parámetros indicados por la NOM-223-SCFI/SAGARPA-2018 Se obtuvo ADN libre de contaminación de ARN, no degradado, correspondiéndose la intensidad de la banda de ADN con la concentración de las muestras medidas espectrofotométricamente en todos los métodos analizados (Fig. 2, Tabla 2)

MUESTRA	TÉCNICA MOLECULAR		KIT RapidCheck®	
	<i>Salmonella spp</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella spp</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Queso los tres reyes	Detectable	No detectable	Negativo	Positivo
Queso el enredo	Detectable	No detectable	Negativo	Negativo
Queso vicky	No detectable	No detectable	Negativo	Negativo
Leche bosque	Detectable	No detectable	Negativo	Negativo
Leche petridita	Detectable	No detectable	Negativo	Negativo
Leche bernarda	Ausencia	Ausencia	Negativo	Ausencia

Tabla 1. Detección de microorganismos presentes en los productos lácteos (quesos leche bronca) mediante técnicas microbiológicas convencionales y kit de detección.

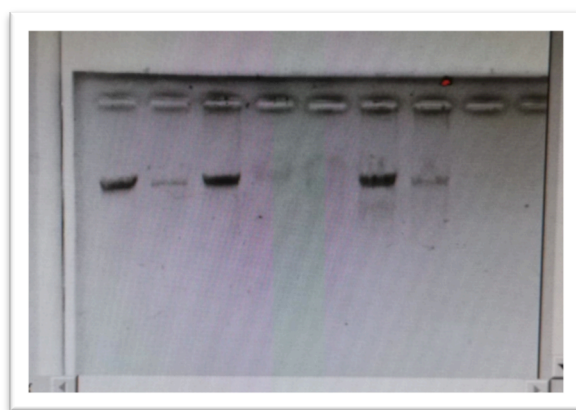


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos lácteos por el método directo



Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. ADN genómico de bacterias mediante el kit de extracción de ADN.

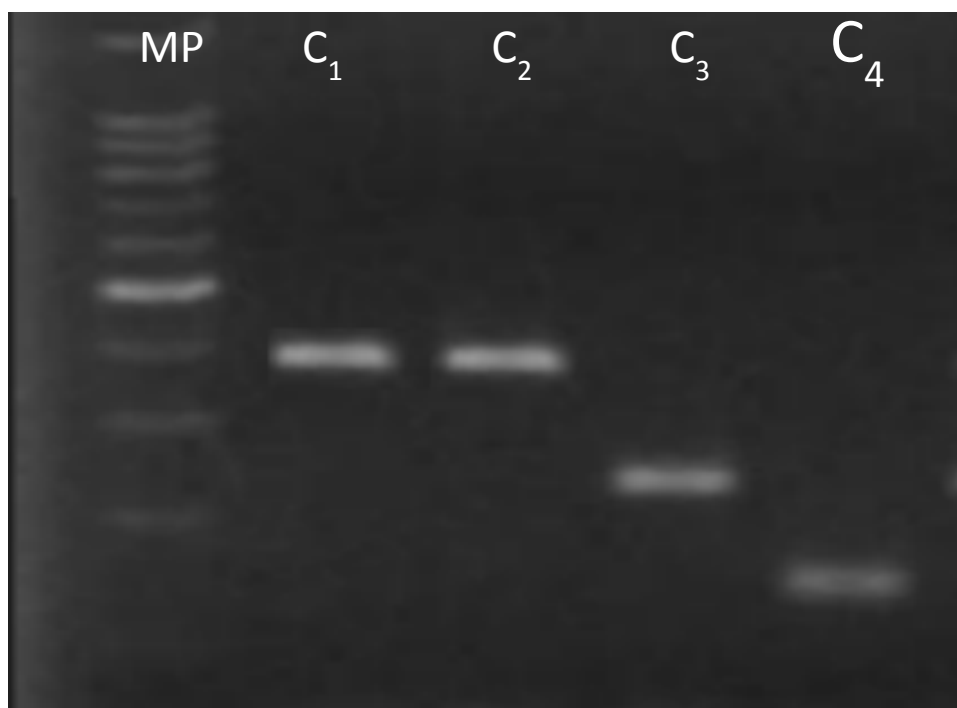


Figura. Análisis electroforético de productos de PCR para la identificación de microorganismos en muestras microbiológicas. MP) Marcador de peso molecular 100 pb NEB. C₁) *Escherichia. coli*, C₂) *Listeria monocytógenes*, C₃) *Staphylococcus. aureus* y C₄) *Salmonella* spp.

Método de ADN	Microorganismo	Tiempo de extracción (h)	Concentración (ng/uL)	A260/A280
Leche y Queso	A	4h	364.9	0.95
	B	4h	95.6	0.71
	C	4h	115.7	0.80
	D	4h	103.8	0.79
	E	4h	117.4	1.07
	F	4h	68.0	1.11
Bacterias control	STAPH	4h	9.0	2.03
	E. COLI	4h	237.4	1.54
	SALMO	4h	-20.4	0.00
	LISTERIA	4h	18.3	1.56

A= leche, establo(Bosque)

B= leche, establo(Betridita)

C= leche, establo(Bernarda)

D= Queso, local(Los tres reyes)

E= Queso, local(El enredo)

F= Queso, local(Vicky)

Tabla2. Parámetros de cuantificación de concentración y calidad de ADN genómico bacteriano.

Conclusiones

1. El método microbiológico convencional para *Salmonella* spp mostró resultados negativos para todas las muestras; y resultados negativos en todas las muestras para la detección de *Listeria monocytogenes*.
2. Mediante el kit comercial para *Salmonella* spp mostró resultados negativos para todas las muestras; y resultados negativos en todas las muestras para la detección de *Listeria monocytogenes* excepto el del queso de la quesería los tres reyes.
3. Se estandarizó un protocolo para la extracción de ADN genómico de productos de leche y queso mediante el método directo reportado por Chang y col. 2012 y se obtuvieron concentraciones de hasta (364.9 ng/uL) valores de pureza de 1.8-2 y el gel de agarosa mostró bandas integras.
4. Se estandarizó un protocolo para la extracción de ADN genómico de bacterias control y se obtuvieron concentraciones de hasta (237.4 ng/uL) valores de pureza de 1.8-2 y el gel de agarosa mostró bandas integras.
5. La evaluación realizada a estos productos lacteos fue hecha mediante dos tipos de técnica, por biotecnología molecular y a través del método convencional, es decir, con ayuda de medios de cultivo para la visualización de los microorganismos presentes en dichos alimentos.
6. En general los productos lacteos evaluados contienen niveles inaceptables para la mayoría de los microorganismos patógenos como lo son *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y mesófilos aerobios que son los que la norma exige como criterios microbiológicos para la buena calidad de los productos lacteos.

7. Finalmente, la aplicación de las técnicas moleculares como lo son la extracción y purificación de ADN, el análisis electroforético de las extracciones y el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) representan una alternativa más específica, eficiente y rápida para la detección de los microorganismos, disminuyendo así el tiempo que conlleva obtener los resultados a través de un método convencional de días a unas cuantas horas.

Bibliografía

- Chan, O. W. (2002). Molecular Techniques: An overview. Biotechnology.
- Christian Turégano Roldán. (2011). *Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2003*,. Comité Consultivo Nacional de Normalización de Seguridad al Usuario, Información Comercial y Prácticas de Comercio,, Mexico.
- Burtin, S. (2005). *Real-Time PCR In: Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics*. New York: Marcel Dekker.
- D'Aoust, J.-Y. (2007). Especies de Salmonella. En M. Doyle, & a. T. L. R. Beuchart, *Microbiología de los Alimentos* (págs. 133-163). Acribia S.A, Zaragoza.
- Hanna, S. E., & Wang, C. C. (2005). Real-Time polymerase chainreaction for the food microbiologist: technologies, applications and limitations. *Journal of Food Science* , 70(3), 49-53.
- Harris, L., & Zagory, D. a. (2002). Safty factors. In: Kader. *University of California* , 301-314.
- Olga halushchenko y Erika kaltenbrunner. (diciembre de 2001). *productos lacteos* . (vicente lopez) Obtenido de la webtecnica:
<http://lawebtecnica.freevar.com/aliment/lacteos/lacteos.html>
- V., C.-U., & Echeverria, J. y. (2014). Determinacion por PCR en Tiempo Real de Escherichia coli. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida* , 19(1), 44-50.