

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE QUESO COTIJA. IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR PUNTO FINAL

Cindy A. Estrada H., Carolina Peña M., Maricarmen Quirasco B.
Universidad Nacional Autónoma de México, Fac. Química. Depto. Alimentos y Biotecnología,
Ciudad Universitaria, 04510, D.F. México. quirabma@unam.mx, Tel. y fax (55) 5622-5305

Palabras clave: Queso Cotija, inocuidad alimentaria, PCR

Introducción. El Queso Cotija es un producto artesanal elaborado en Jalisco y Michoacán, México. Los productores se han preocupado por mantener al ganado libre de brucela y tuberculosis. Sin embargo, debido a que ni la materia prima ni el proceso involucra algún tratamiento térmico, surgió la necesidad de evaluar la calidad sanitaria de este producto mediante un análisis microbiológico general y de verificar la ausencia de microorganismos que pudieran representar un riesgo para la salud: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Brucella abortus* y *Listeria monocytogenes*.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la calidad microbiológica de diez muestras de Queso Cotija tradicional y aplicar la técnica de PCR sobre ADN extraído directamente del alimento, para la detección de los microorganismos patógenos mencionados.

Metodología. a) Análisis microbiológico general. Cuenta en placa de mesófilos aerobios, hongos y levaduras (1) y cuenta en placa de bacterias coliformes e identificación de *E. coli* en un medio diferencial. b) Detección de bacterias patógenas por PCR. Los cebadores reportados para la detección de los patógenos mencionados (2-3) se comprobaron con el programa BLAST. La extracción de ADN de cepas puras y de quesos se realizó con el sistema Fast ID (Genetic-ID). Se optimizaron las condiciones de PCR para cada microorganismo y se probó su especificidad utilizando cepas de colección. Se analizaron 10 muestras de queso con las condiciones determinadas. Se probó la sensibilidad de la técnica mediante inoculación de una muestra de queso con el microorganismo patógeno y subsecuente detección por PCR. La prueba confirmativa de las muestras positivas fue mediante patrón de restricción enzimático (HaeIII y HincII) del amplicón obtenido.

Resultados y discusión. El análisis microbiológico general mostró que la calidad microbiológica de los quesos varía notablemente entre productores. Dos de diez muestras estuvieron arriba de 5×10^5 UFC mesófilos/g. Ninguno de los quesos superó el límite de coliformes fecales ni hongos; mientras que cuatro de las muestras sí superaron el límite de levaduras, establecidos en la NOM-121 (4). Por otra parte fue posible optimizar la técnica de PCR para la búsqueda de bacterias patógenas. Los cebadores utilizados (reportados en la literatura) (2-3) para identificar *L. monocytogenes* y *Brucella abortus* resultaron ser

altamente específicos, mientras que aquellos utilizados para identificar *S. aureus* y *S. typhi* mostraron una menor especificidad. Se verificó la eficiencia del método de extracción y purificación de ADN, así como la sensibilidad de la técnica de PCR. No se detectó *L. monocytogenes* ni *B. abortus* en ninguna de las muestras. *S. typhi* se detectó en dos de las muestras, y *S. aureus* en tres de ellas. Esos resultados no indican si estaban viables al momento del análisis. Las enzimas de restricción HincII y HaeIII fueron de utilidad para confirmar los resultados positivos mediante digestión del amplicón (Fig. 1).

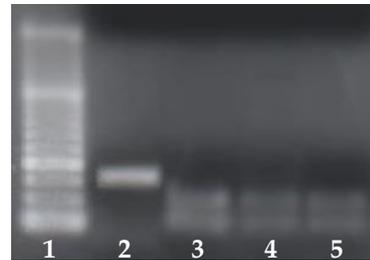


Fig. 1. Patrón de restricción del amplicón de *S. typhi* con HincII. 1.- Marcador de 50pb. 2.- *S. typhi* sin digerir. 3.- *S. typhi* digerida. 4.- Amplicón de muestra 6 digerido. 5.- Amplicón de muestra 10 digerido

Conclusiones. La calidad microbiológica de las muestras de Queso Cotija es variable entre productores, la mayoría de las muestras analizadas entró dentro de la normatividad establecida por la NOM-121 (4). Se logró la detección de bacterias patógenas utilizando la técnica de PCR. Los cebadores utilizados para *S. typhi* y *S. aureus* no resultaron muy específicos. En ninguna de las muestras se encontró presencia de *L. monocytogenes* ni de *B. abortus*. Se recomienda mejorar las prácticas higiénicas de manufactura.

Agradecimiento. PAIP 5490-16. Química-UNAM.

Bibliografía.

- 1.- NOM-092-SSA1-1994, NOM-111-SSA1-1994.
- 2.- Kim, J. *et al.* (2006) Simultaneous detection by PCR of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella thymurium* in artificially inoculated wheat grain. *J. Food Microb.* 111: 21-35.
- 3.- Hambdy, M y Amin, A. (2002) Detection of *Brucella* Species in the Milk of Infected Cattle, Sheep, Goats and Camels by PCR. *Vet. J.* 163:299-305.
- 4.- NOM-121-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana. Quesos : frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias