



INOCUIDAD MICROBIOLÓGICA DEL QUESO COTIJA REGIÓN DE ORIGEN: ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO A TRAVÉS DE qPCR.

Belén Becerra, Irma Hernández, Hermann Mejía, Idalia Navarrete, Berenice Salto, Frida Torres, Cindy Estrada, Carolina Peña y Maricarmen Quirasco. Universidad Nacional Autónoma de México, Fac. Química. Depto. Alimentos y Biotecnología, Ciudad Universitaria, 04510, D.F. México. quirabma@unam.mx, Tel. (55) 5622-5305.

Palabras clave: PCR en tiempo real, queso madurado, bacterias patógenas.

Introducción. Las Reglas de Uso del queso Cotija artesanal madurado establecen que éste se debe elaborar a partir de leche cruda, proveniente de ganado libre de brucela y tuberculosis, siguiendo buenas prácticas de elaboración, bajo condiciones higiénicas y que debe madurarse en la región productora por un mínimo de tres meses antes de ser comercializado (1). Sin embargo, la COFEPRIS-SALUD tenía severas dudas sobre su calidad sanitaria. Esto originó que se solicitara un análisis microbiológico de un número representativo de quesos elaborados en la zona productora. La gran cantidad de muestras y la especificidad requerida para la detección microbiológica hizo necesaria la utilización de un método de gran capacidad de procesamiento y de alta especificidad.

El objetivo de esta investigación fue la detección de los siguientes microorganismos: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* (O157 y ETEC), complejo *Mycobacterium*, *Staphylococcus aureus* y *Brucella* spp. a través de la metodología de PCR en tiempo real (qPCR).

Metodología. Se analizaron 95 unidades de ensayo (UE) de queso Cotija artesanal madurado producido en la región de Jalisco, México. Se partió de 1 kg de queso, se homogenizaron 25 g de una muestra representativa y una alícuota se incubó en medios y condiciones de enriquecimiento para cada patógeno en particular. Posteriormente, se recuperó el paquete celular y se extrajo su ADN con el kit Fast-ID, Genetic-ID. La qPCR, de genes específicos para cada bacteria, se realizó en un equipo ABI7500, bajo condiciones estándar. Se comprobó la especificidad de los cebadores con cepas de colección (controles positivos y negativos).

Resultados. Para verificar la sensibilidad del método, se inoculó intencionalmente una cantidad de 5 - 10 UFC/g de queso, con cada uno de los patógenos. Después del procesamiento y análisis de la muestra, se comprobó que el ciclo umbral (Ct) obtenido después del paso de enriquecimiento fuera similar al que se obtenía con la cepa de referencia pura, cultivada en un medio óptimo. Los resultados se resumen en la Tabla 1. Se corrió un control con el ADN obtenido del análisis del queso inoculado, pero sin enriquecer; en todos los casos los valores obtenidos de Ct de dichos controles fue >27. Además, el Ct obtenido después del paso de enriquecimiento, fue menor a lo que se observó con el queso sin inocular (Ct > 35), por lo que la detección de células viables fue factible e inequívoca.

Tabla 1. Ct después de enriquecer, muestras de queso Cotija inoculadas intencionalmente. Entre paréntesis se indica el gen blanco.

Microorganismo	Ct(cepa de referencia)	Ct (queso inoculado y después de enriquecer)
<i>Salmonella</i> spp. (<i>invA</i>)	13.57 ± 0.12	14.28 ± 0.70
<i>S. enterica</i> Thyphimurium (<i>fliC</i>)	13.01 ± 0.06	13.05 ± 0.01
<i>S. enterica</i> Enteritidis (<i>sefA</i>)	13.74 ± 0.33	14.03 ± 0.20
<i>S. aureus</i> (<i>nucA</i>)	13.49 ± 0.28	14.78 ± 0.10
Complejo <i>Mycobacterium</i> (<i>cfp30B</i>)	11.93 ± 0.10	14.82 ± 0.11
<i>L. monocytogenes</i> (<i>hly</i>)	14.04 ± 1.17	13.99 ± 0.84
<i>Brucella</i> spp. (<i>per</i>)	12.24 ± 0.18	13.17 ± 0.71
<i>E. coli</i> ETEC (<i>elt B1</i>)	11.08 ± 0.23	11.35 ± 0.65
<i>E. coli</i> O157:H7 (<i>eae</i>)	12.32 ± 0.01	13.08 ± 1.15
<i>E. coli</i> O157:H7 (<i>rfb</i>)	12.88 ± 0.01	12.40 ± 0.13

Los resultados del análisis de las 95 UE indicaron la ausencia de *Listeria monocytogenes*, *Brucella* spp., *E. coli* ETEC y O157, y especies del complejo *Mycobacterium* en el 100% de las muestras. Si bien en ninguna de las UE se detectó la presencia de *Salmonella enterica* o *S. aureus* viables, sí se pudo detectar ADN proveniente de dichas bacterias en un 10% y 14% de las UE analizadas, respectivamente. Es probable que dichas bacterias hayan muerto durante el proceso de maduración del queso. Adicionalmente, se realizó la amplificación de la región V3 del ADNr 16S del pellet celular obtenido después del paso de enriquecimiento, para comprobar la calidad de amplificación del ADN obtenido. En todos los casos fue posible obtener el amplicón de aprox. 200 pb característico de dicha región, con lo que se demostró que en los medios de enriquecimiento sí hubo crecimiento de biomasa (ya que no eran medios selectivos) y que el ADN extraído de ésta tenía la calidad amplificable. Por lo que de haber estado presente el patógeno de interés se hubiera podido detectar a través de la qPCR.

Conclusiones. La etapa de maduración, de al menos 3 meses, es esencial para asegurar la buena calidad microbiológica del queso Cotija artesanal. A través del paso de enriquecimiento previo a la PCR se pudo distinguir a las células viables de las no viables.

Agradecimiento. Proyecto SAGARPA-CONACYT 2010-04-147499.

Bibliografía.

1. Álvarez R., Barragán E., Chombo P. (2005) Reglas de Uso, Queso Cotija Región de Origen. Colegio de Michoacán, A.C., CIATEJ. Michoacán, México. 1-24.