



VIABILIDAD DE *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSP. *PARATUBERCULOSIS* DURANTE LA MADURACIÓN DE QUESOS ELABORADOS CON LECHE CAPRINA.

Cirone, K¹, Morsella, C.¹, Colombo, D.²,
Paolicchi, F.¹

¹Laboratorio de Bacteriología, Área Producción Animal, Unidad Integrada INTA UNMDP, CC 276, (7620) Balcarce, Argentina.

²Med Vet Actividad Privada, Mar del Plata

RESUMEN

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (Map) es el microorganismo causante de la Paratuberculosis (Ptbc) o Enfermedad de Johne, enteritis crónica que afecta a ruminantes, animales domésticos y a especies silvestres. Las cabras infectadas con Map pueden excretar micobacterias en su leche, que consumida cruda o usada para la elaboración de quesos sin pasteurizar podría constituir una fuente potencial para la infección humana. El objetivo del trabajo fue determinar la viabilidad de Map en quesos elaborados con leche caprina infectada experimentalmente y sometida a diferentes tratamientos térmicos (leche termizada a 65 °C y no termizada). Durante la maduración Map fue aislada sólo en los quesos elaborados con leche no termizada. En éstos quesos, durante los primeros días del proceso de maduración las UFC/g disminuyeron en el orden de 10 log y la viabilidad de Map continuó cayendo hasta 0.8×10^1 UFC/g a los 60 días. Los mayores valores de pH se hallaron entre los 30 y 45 días de maduración, coincidiendo con los aislamientos más numerosos (24×10^1 UFC/g) de *M. paratuberculosis*. Los resultados preliminares de este trabajo indican que la maduración de los quesos disminuye la viabilidad de Map en los casos de los quesos elaborados con LnT y que el tratamiento de termizado de 65 °C seguido por el proceso de maduración de los quesos sería beneficioso para la elaboración de este producto ya que destruiría las micobacterias presentes.

SUMMARY

Viability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* during elaborated goat milk cheese maturity. Cirone, K.; Morsella, C.; Colombo, D. Paolicchi, F. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) is the etiologic agent of Paratuberculosis (Ptbc) or Johne's disease. This is a chronic enteritis affecting to ruminants, domestic and wild species. Goats infected with Map can excret micobacteria in their milk. This fact represents a potential risk when people consumes crude milk or not pasteurized cheese. The objective of this work was to determine the viability of Map in cheese elaborated with excret micobacteria in their milk. This fact represents a potential risk when people consumes crude milk or not pasteurized cheese. The objective of this work was to determine the viability of Map in cheese elaborated with experimentally infected goats milk with different termic treatments (60°C or 37°C (Lnt)). During cheese maturity, Map was isolated in cheeses with only treatment of milk with 37°C. In these cheeses, CFU/g decreased in order of 10log during the first days of maturity process. Viability of Map continued decreasing until 0.8×10^1 CFU/g at day 60. The higher values of pH were found between 30 and 45 days of maturity. In these days, a major number of Map was isolated (24×10^1 CFU/g). These preliminary

results indicate that cheese maturity decrease the Map viability in elaborated cheeses with termic treatment at 37°C, and the treatment with 65°C of temperature plus cheese maturity process would be beneficial for the mycobacteria elimination in these products.

INTRODUCCION

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (Map) es el microorganismo causante de la Paratuberculosis (Ptbc) o Enfermedad de Johne, enteritis crónica que afecta a ruminantes, animales domésticos y a especies silvestres. Esta caracterizada clínicamente por diarrea, pérdida de peso, debilitamiento y finalmente la muerte, sin embargo una gran proporción de los animales infectados cursan la misma bajo la condición de portadores asintomáticos. Map ha sido vinculada a la enfermedad de Crohn en humanos, como el agente de una enteritis crónica proliferativa. Se ha sugerido que la principal vía de infección al humano sería la ingestión de leche contaminada, sin embargo poco se conoce sobre esta vía de transmisión y de su supervivencia en procesamiento de productos lácteos.

Ciertos trabajos demostraron que la pasteurización es capaz de destruir las micobacterias (7) pero, por el contrario, otras investigaciones han indicado que Map resiste las condiciones de pasteurización (3, 4). La leche de cabra, que es consumida o utilizada para elaborar quesos frecuentemente sin pasteurizar, puede contener células de Map y podría constituir una fuente potencial para la infección humana. Collins, et al. (2000) estudió el efecto de tres factores: pH, concentración de sal y tratamiento térmico en la producción de quesos elaborados con leche bovina sobre la viabilidad de Map y encontró que el calentamiento a 62°C y 71°C de la leche cruda para la elaboración de quesos que se maduraron por 60 días, inactiva aproximadamente 10^3 células viables de Map por ml de queso. Se comprobó también que la concentración de sal tiene poco efecto sobre la viabilidad de este patógeno, sin embargo, el bajo pH fue correlacionado positivamente con la muerte de Map (1). Otros datos sobre la determinación de la presencia de esta micobacteria en este tipo de productos alimenticios no han sido reportados. El objetivo del trabajo fue determinar la viabilidad de Map en quesos elaborados con leche caprina infectada experimentalmente y sometida a dos diferentes tratamientos térmicos.

MATERIALES Y METODOS

1. Leche: Se recolectaron 5 litros de leche caprina fresca de un tambo ubicado en la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Los animales estaban libres de Brucelosis, Tuberculosis y al momento de la toma de muestras no presentaban sintomatología ni evidencias serológicas positivas por ELISA de Paratuberculosis.
2. Tratamiento: La leche fue dividida en dos partes: a) leche termizada (LT) y b) leche no termizada (LnT) y cada parte fue inoculada con 2,5 ml de un inóculo conteniendo $1,6 \times 10^{13}$ UFC/ml, de una cepa de Map tipificada por técnicas moleculares como PCR y RFLP, para identificación de IS900. Para comprobar la viabilidad de la cepa luego de agregada a la leche se tomó una muestra de cada una de las partes y se cultivó luego de someterlas

al tratamiento que se describe más adelante. La LT fue sometida a un calentamiento de 65°C/20 min. y enfriada a 37°C, mientras que la LnT fue sólo calentada a 37°C. Se agregó cultivo «starter» comercial mesófilo (cepa CHH-22), durante 20 minutos y se agregó a LT y LnT 4 ml de cuajo bacteriano hasta su coagulación. El cuajo se cortó para llevar a cabo el desuerado y las masas fueron coladas y colocadas en moldes apropiados para el prensado. Cada queso fue desmoldado y sometido a salado en seco por una hora. Los quesos se maduraron y se mantuvieron durante 60 días. La concentración final de micobacterias en el producto fue de 1.6×10^{11} , teniendo en cuenta que cada queso pesó 250 g.

3. Obtención y tratamiento de muestras: A los 10, 20, 30, 45 y 60 días del inicio de la maduración, se tomaron 5 grs. de muestra del centro de cada queso y el macerado fue sometido a decontaminación con 20 ml de hexadecilpiridinium al 0,75% durante 5hs. Las muestras se centrifugaron a 1500 rpm/15 min., resuspendiendo el pellet con 2 ml de buffer salino pH 7.0 (PBS).

4. Cultivo: Se sembraron 6 gotas de cada muestra por triplicado en los medios específicos usando Herrold con y sin agregado de micobactina y adicionando antibióticos (Paolicchi, 2002). El pH del queso fue medido cada vez que se tomó una muestra utilizando una cinta de pH (rango 0-14) sobre un macerado de la muestra.

5. Recuento de viables: Los cultivos fueron observados cada 15 días durante cuatro meses, identificando el desarrollo de las colonias sospechosas de Map. Cada colonia fue analizada microscópicamente mediante la coloración de Ziehl Neelsen. Los recuentos se expresaron en UFC/g de queso teniendo en cuenta que el pellet restante de los 5g utilizados, se resuspendió en 2 ml de PBS y sembrando 6 gotas de la suspensión.

RESULTADOS

1. Recuento y viabilidad de *M. paratuberculosis*: Se aisló Map sólo en los quesos elaborados con leche no termizada, manteniendo la viabilidad de las micobacterias hasta el final del proceso de maduración. Durante los primeros días del proceso de maduración las UFC/g de quesos disminuyeron en el orden de 10 log. En los días subsiguientes la viabilidad de esta micobacteria continuó cayendo en menor medida. A los 20 días del proceso de maduración los recuentos disminuyeron aproximadamente 1 log con respecto al periodo anterior. Sin embargo a los 30 días de dicho proceso se registró un recuento de viables muy alto llegando a valores de 24×10^1 UFC/g de queso. A los 45 días de maduración se detectaron micobacterias viables (1.4×10^1 UFC/g de queso), reduciéndose a 0.8×10^1 UFC/G a los 60 días (tabla 1).

2. PH durante la maduración: Al inicio del ensayo el queso elaborado con LT presentó el pH más bajo (pH 6.5) aumentando a 7.5 hacia los 30 y 45 días de almacenamiento, para luego bajar a pH 6 a los 60 días. El queso elaborado con LnT presentó un pH más alto (pH 7.0) que el anterior al inicio de la maduración, para descender a los 20 días posteriores hasta pH 6.5. A los 30 días alcanzó un pH 7.5, siendo el mayor para este queso, pero disminuyó a pH 7.0 a los 45 días y alcanzó pH 6.5 a los 60 días (tabla 2).

3. Relación entre el pH de los quesos y el recuento de células viables de Map: a los 30 días de maduración se registraron los valores más altos de pH, siendo igual a pH 7,5; coincidiendo con los aislamientos más numerosos (24×10^1 UFC/g) de Map (gráfico 1).

DISCUSION

Los resultados preliminares de este trabajo indican que la maduración de los quesos disminuyó la viabilidad de Map en los casos de los quesos elaborados con LnT, debido a que durante los primeros 10 días de maduración la población de micobacterias viables disminuyó aproximadamente 10 log. Por otro lado, en los quesos elaborados con LT no se logró aislar micobacterias durante el proceso de maduración, lo cual indica que Map podría ser sensible al proceso de termizado usado de 60°C/20min. El proceso de maduración de los quesos contribuiría con los cambios de pH observados, sugiriendo que este proceso tendría un efecto aditivo deletéreo sobre Map. Datos previos usando leche bovina para la elaboración de quesos bajo las mismas condiciones, indicaron que Map resistió menos las condiciones del proceso de elaboración en el queso de bovino que en el de cabra (datos no publicados). Esto puede deberse a la composición de la leche de cabra cuyo contenido en el porcentaje de lípidos es mayor lo que ejercería un efecto físico protector sobre las micobacterias(1). Pudo comprobarse que el efecto del descenso del pH en los quesos podría eliminar muchas de las células viables por g, ya que a los 30 días de maduración cuando el pH llegó a valores más altos se registraron los aislamientos más numerosos, probablemente porque el pH 7.5 sería el óptimo para el crecimiento de Map.

CONCLUSIONES

El proceso de termizado aplicado a la leche de cabra antes de la elaboración de los quesos, sería desde el punto de vista de Salud Pública, recomendable para eliminar la posible contaminación con Map en estos productos. Asimismo, debería asegurarse el descenso del pH en forma controlada durante el proceso de maduración, ya que la combinación de ambos factores (pH y maduración) resulta determinante sobre la viabilidad de Map.

BIBLIOGRAFIA

- Collins, M.T., Sung N. Effect of three factors in cheese production (pH, salt and heat) on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability. *Appl Environ Microbiol*, 2000; 66(4):1334-1339.
- Donaghy J.A., Totton N.L., Rowe M.T. evaluation of culture media for recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from Cheddar cheese, *Appl Environ Microbiol*, 2003; 37: 285-291.
- Grant, I., Ball H.J., Neill S.D., Rowe M.T. Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cows milk at pasteurization temperatures. *Appl Environ Microbiol*, 1996; 62 (2): 631-636.
- Grant I.R., Hatchings E.I, Ball H.J., Rowe M.T. Impact of commercial HTST pasteurization on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in naturally infected cow's milk; *Appl Environ Microbiol* vol 68, N°2; 2002; 602-607.
- Hermon-Taylor J. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and its relation to Crohn's disease. *Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis*, 2002 Bilbao, España.
- Paolicchi F., Zumarraga M., Gioffre A., Zamorano P., Morsella C., Verna A., Cataldi A., Alito A., Romano M. Application of different methods for the diagnosis of Paratuberculosis in a dairy cattle herd in Argentina; *J Vet*



Med; 2003; 20-26.

7. Stabel J.R.. Johne's disease and milk: do consumers need to worry? J Dairy Scie; 2000; 83(7):1659-1663.

Tabla 1: Recuento de células viables de *M. paratuberculosis* en UFC/g de quesos elaborado con LnT y LT durante 60 días de maduración.

Tipo de queso	Días de maduración				
	10	20	30	45	60
QLnT	9.8 x 10 ¹	0.9 x 10 ¹	24 x 10 ¹	1.4 x 10 ¹	0.8 x 10 ¹
QLT	sa	Sa	sa	sa	sa

Tabla 2: Evolución del pH de los quesos elaborados con LT y LnT durante la maduración de los mismos.

Tipo de queso	Días de maduración				
	10	20	30	45	60
QLnT	7	6.5	7.5	7	6
QLT	6.5	6.5	7.5	7.5	6.5

REFERENCIAS: QLnT: queso elaborado con leche de caprina no termizada QLT: queso elaborado con leche caprina termizada. sa: sin aislamiento

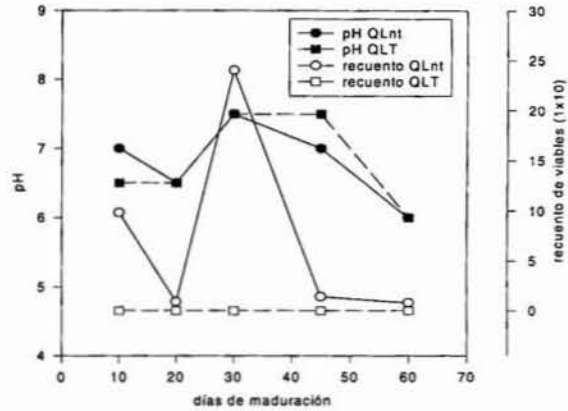


Gráfico 1: Evolución del pH de los quesos elaborados con LT y LnT comparado con el recuento de células viables de *Map* en UFC/g de queso elaborado con LT y LnT durante 60 días de maduración