

01674



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y
DE LA SALUD ANIMAL

FACTORES DE RIESGO QUE INFLUYEN EN LA CALIDAD
BACTERIOLOGICA DE LA CARNE DE BOVINO NACIONAL
E IMPORTADA, EN EL MERCADO FORMAL MEXICANO
DE TRES CIUDADES.

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
P R E S E N T A :
ELIZABETH FLORES CARRION

TUTOR:

MVZ MCV J. FERNANDO NUÑEZ ESPINOSA.

COMITE TUTORAL:

PhD. MARIA DE LA SALUD RUBIO LOZANO

MC JESUS REYNAGA OBREGON



MEXICO, D. F.

2005

m 343493



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A VÍCTOR, por todo su apoyo, comprensión,
amor y por confiar siempre en mí. Gracias.

A MI MAMÁ Y HERMANO por compartir este sueño

A MI SOBRINO Víctor Fabián con cariño.

A LA MEMORIA DE MI PADRE con todo mi cariño.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: ELIZABETH FLORES
CARRION
FECHA: 25 ABRIL 2005
FIRMA: [Firma]

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

A la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por las facilidades brindadas.

Al Departamento de Medicina Preventiva por las facilidades brindadas y apoyo para la realización de este trabajo.

Al Laboratorio de Genética Molecular por el apoyo para el análisis de PCR, en especial a Amanda y Feli

A Fernando Bruno, Goretti y Carolina por su apoyo en el laboratorio.

A mi comité tutotal, MVZ MCV José Fernando Núñez Espinosa
Dra. María de la Salud Rubio Lozano
MC Jesús Reynaga Obregón

Por la paciencia y orientación brindada.

A los integrantes del jurado, Dr. José Juan Martínez Maya
Dra. Carmen Watcher Rodarte

Financiamiento: Este trabajo fue posible gracias al apoyo brindado por PAPIIT.

RESUMEN

Se realizó un estudio para determinar la calidad bacteriológica de la carne fresca de bovino nacional e importada de los Estados Unidos que se comercializa en los supermercados de las ciudades de Monterrey, N.L., México, D.F. y Villahermosa, Tab. Se recolectaron 10 muestras de carne en 18 sucursales de tiendas de autoservicio, haciendo un total de 180 muestras de milanesa, 90 nacionales y 90 importadas. Los análisis realizados fueron: Determinación de bacterias coliformes totales y fecales por la técnica de diluciones en tubo múltiple (NOM-145-SSA1-1998), Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa (NOM-092-SSA1-1994), Determinación de *Staphylococcus aureus* (NOM-115-SSA1-1994) y Determinación de la presencia o ausencia de *Escherichia coli* O157:H7 por el método de PCR. Los resultados mostraron diferencia ($P < 0.05$) de la calidad sanitaria entre carne nacional e importada de coliformes fecales NMP/g (317.04 ± 34.09 vs 83.26 ± 35.8) y de psicrótrofos UFC/g (5.26 ± 0.04 vs 5.03 ± 0.04). También mostró diferencia ($P < 0.05$) de la calidad sanitaria entre las tres ciudades (Monterrey, D.F. y Villahermosa), encontrando los siguientes resultados para coliformes totales NMP/g (843.36 ± 58.54 vs 454.86 ± 49.36 vs 854.65 ± 67.59 respectivamente). Los resultados obtenidos para el recuento de psicrótrofos, coliformes totales y coliformes fecales se encontraron dentro del límite máximo permitido por la normatividad mexicana e ICMSF; por lo que la carne tiene calidad sanitaria aceptable. Considerando que las enfermedades transmitidas por alimentos son unos de los problemas más serios en salud pública hoy en día; aunque se buscó el aislamiento de *S. aureus* y *E. coli* O157:H7 no hubo ninguna muestra con dichos patógenos, por lo que podemos sugerir que la inocuidad de las muestras de investigación es aceptable. El estudio también tenía como objetivo conocer el estado de higiene que presentaban las tiendas donde se recolectaron las muestras para así poder relacionar la influencia que estos factores podrían ejercer sobre la calidad sanitaria de las muestras. En general, las tiendas del país tienen un estado general y una higiene del personal aceptable; la distribución

entre las secciones de los diferentes productos frescos, se puede observar que las tiendas seleccionadas tienen distribución aceptable de sus secciones. La ausencia de olor desagradable fue homogéneo para todas las tiendas al igual la ausencia de utensilios sucios, la carne no se encontró en contacto con algún otro producto indicando poca posibilidad de contaminación cruzada. Por último se tomaron temperaturas en los refrigeradores de donde se seleccionaba el producto y se observó que en la mayoría de las tiendas se encontraron dentro de las temperaturas recomendadas. Por todo lo anterior, en el presente estudio se encontró que la calidad bacteriológica de la carne de bovino que se adquiere en diferentes puntos de venta del país está influenciada por factores de riesgo de origen y venta.

Palabras claves: calidad bacteriológica, carne, coliformes, psicrótrofos, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7.

ABSTRACT

A study to determine bacteriological quality of Mexican and U.S fresh meat, commercialized in supermarkets from three major cities of Mexico, is presented. This research was carried out with a total of 180 samples, 90 of which were from Mexico, and the rest imported from US. Samples were collected at a rate of 10 samples per 18 stores, which were distributed in the cities of Monterrey, N.L, Mexico D.F and Villahermosa, Tab. According to the procedure, the following analyses were applied: coliforms Determination trough the dilution in multiple pipe technique (NOM-145-SSA1-1998), *Staphylococcus aureus* Determination (NOM-115-SSA1-1994), aerobic bacteria count in plate method (NOM-092-SSA1-1994) and absence or presence of *Escherichia. coli O157:H7* trough PCR method. Results showed a difference of (317.04 ± 34.09 vs. 83.26 ± 35.8) between Mexican and U.S meat of ($P < 0.05$) sanitary quality that is related to fecal coliforms, and related to psychrothrophs of (5.26 ± 0.04 vs. 5.03 ± 0.04) cfu/g. Also, a difference between the tree cities of ($P < 0.05$) of sanitary quality, regarding total coliforms, is as follows: (843.36 ± 58.54 vs. 454.86 ± 49.36 vs. 854.65 ± 67.59), which are for Monterrey, D.F, and Villahermosa respectively. total coliforms and fecal coliforms counting results, showed to be between the maximum permitted limit in the Mexican official standards and the ICMSF. Consequently, it can be suggested that the studied meat has an acceptable sanitary quality. Considering that transmitted diseases via food are a major public health concern at the present time, two pathogens that are *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli O157:H7*, were determined. Results showed not a single sample containing such pathogens. Thus, it can be inferred about an acceptable innocuousness of the investigated samples. The present study had also as an objective to determine hygiene conditions of the supermarkets in which samples were collected. This was in order to relate them to the possible influence over the sanitary quality of the samples. Results showed those generally sell points and laboring personal have adequate hygienic conditions and practices. For example, factors like

distribution and separation of different work areas, where fresh products are prepared for selling, were observed. Also, absence of foul odors or dirty utensils was registered. All of the above, suggests a low probability of meat cross contamination. Additionally, temperatures of refrigerated exhibitors were sensed, and they presented adequate values. Finally, according to the results in the present study, it has been found that bacteriological quality of bovine meat, which can be bought in different sell points of Mexico, is influenced by origin and sell risks.

Keywords: bacteriological quality, meat, coliforms, psychrotrophs
Staphylococcus aureus, *Escherichia coli* O157:H7.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. Antecedentes.....	
1.1. Rastros en México.....	2
1.2. Enfermedades transmitidas por alimentos en México....	3
1.3. Calidad sanitaria.....	4
1.4. Microorganismos indicadores.....	5
1.5. Microorganismos patógenos involucrados en la carne...	6
1.6. Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de microorganismos.....	7
1.7. El uso de PCR en microbiología de alimentos.....	8
MATERIAL Y MÉTODOS	10
1. Diseño del experimento.....	10
2. Selección de puntos de venta.....	10
3. Criterios generales para la selección de las muestras de carne	10
4. Muestreo.....	11
5. Evaluación de los factores de riesgo de venta.....	12
6. Análisis microbiológico.....	13
6.1. Toma y manejo de muestras.....	13
6.2. Pruebas bacteriológicas.....	13
6.3. Determinación de patógenos.....	16
6.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	16
6.3.2. <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	16
6.3.2.1. Procesamiento de las muestras para su análisis por PCR.....	16
6.3.2.2. Extracción de ADN de la bacteria y de las muestras para su análisis por PCR	19
6.3.2.3. Técnica de PCR.....	25
7. Análisis estadístico.....	28
RESULTADOS	30
1. Calidad Sanitaria de las Muestras de Carne.....	30
2. Detección de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> O157:H7	36
3. Características de Higiene de las Tiendas Seleccionadas.....	36
3.1. Análisis de Frecuencias.....	36
4. Correlación entre las variables de calidad sanitaria y los factores de riesgo en punto de venta.....	39
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	47
LITERATURA CITADA	48
ANEXO	53
FIGURA	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Recuento de Aerobios en Placa (RAP) Psicrótrofos.....	14
Figura 2.	Determinación de bacterias coliformes con la técnica de diluciones en tubo múltiple.....	15
Figura 3.	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>	17
Figura 4.	Preenriquecimiento para <i>Escherichia coli</i> O157 H:7.....	18
Figura 5.	Extracción de ADN bacteriano.....	20
Figura 6.	Extracción de ADN de las muestras.....	23
Figura 7.	Resultados de <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	56

INTRODUCCIÓN

La carne es, tanto por su valor nutritivo como por su valor sensorial, uno de los alimentos más importantes del hombre. En el consumo de carne influyen además de los factores señalados, aquellos asociados con la inocuidad y aceptabilidad sanitaria. La producción de carne, su obtención y su procesado tienen gran importancia económica. La obtención y procesado óptimo de la carne exigen un alto estándar higiénico, para poder ofrecer al consumidor carne y productos cárnicos que no supongan un riesgo sanitario. Por ello, la higiene tiene que estar completamente integrada en la moderna tecnología de los alimentos (Fischer, 1994).

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos son el problema sanitario más universal en el mundo y una causa importante de productividad económica reducida. En México, uno de los principales problemas de salud pública está dado por las enfermedades gastroentéricas. Los datos en los últimos años indican que aproximadamente el 30% de los casos notificados en el Sistema de Vigilancia Epidemiológica Obligatorio, corresponde a Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA'S) (Memorias del VII curso de actualización de higiene y calidad de la carne, 2002).

Las bacterias patógenas son la causa de la mayoría de los casos y brotes de dichas enfermedades. Es posible encontrar un cierto nivel de estos microorganismos en la mayoría de los alimentos crudos. Entre los microorganismos patógenos más importantes de detectar en la carne se encuentran, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* O157:H7, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* y *Staphylococcus aureus*. (ICMSF. Microorganismos de los alimentos 2, 2000).

Los microorganismos son frecuentemente asociados a la contaminación por manipuladores de alimentos y a las materias primas crudas en el establecimiento.

Los microorganismos indicadores en los alimentos, muestran la presencia de un posible peligro para la salud y que los productos estuvieron expuestos a condiciones que pudieron haber introducido microorganismos peligrosos y/o permitido el crecimiento de microorganismos infecciosos o toxigénicos (ICMSF. Microorganismos de los alimentos 2, 2000).

Por la importancia de las enfermedades a través de los alimentos se ha determinado que los países consideren la necesidad de someter a los productos a ciertas pruebas o estudios encaminados a evaluar su inocuidad y calidad sanitaria.

1. ANTECEDENTES

1.1. *Rastros en México*

El sacrificio de ganado bovino se realiza principalmente en rastros municipales; aunque en los últimos años se ha visto una tendencia al incremento de sacrificios en rastros Tipo Inspección Federal (TIF). En estos últimos, el procesamiento de la carne es más higiénico, el personal dispone de equipo y ropa adecuada; además, los empleados han recibido capacitación. Las principales ventajas de sacrificio en plantas TIF son el mayor control sanitario, las prácticas humanitarias de sacrificio y la presencia de cadena de frío para el transporte de la carne. Se cuenta aproximadamente con 39 plantas TIF para sacrificio de bovinos, localizadas en las siguientes entidades: Aguascalientes, Baja California, Coahuila, Chiapas, Chihuahua, Durango, Jalisco, Nuevo León, Puebla, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán y Zacatecas.

El Consumo Nacional Aparente (CNA) dentro del periodo 1992-1997, ha representado un comportamiento variable entre 14.1 y 15.8 kg por persona por año, debido a la evolución de la producción nacional y de las importaciones (SAGARPA, 1999; Aluja *et al.*, 1974 y Villanueva *et al.*, 1998).

1.2. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en México

Un brote de una enfermedad transmitida por alimentos (ETA) es definido por el CDC (Center for Disease Control de los EEUU) como un incidente en el cual dos o más personas sufren una enfermedad similar después de ingerir un mismo alimento. Los alimentos involucrados más frecuentemente en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos son los de origen animal. En la mayoría de los brotes ocurridos se identificaron como vehículo alimenticio: carne de bovino, carne picada, entre otros.

Una revisión de los brotes de ETA'S cuya transmisión tiene una relación directa con el agua o los alimentos y que fueron notificados a la Dirección General de Epidemiología durante el periodo 1981 a 1990, muestra los siguientes datos: se registraron 393 brotes con un promedio anual de 39 brotes. La etiología se logró precisar en el 79% de los casos. Los brotes de origen bacteriano ocuparon el primer lugar (42%) entre el total de notificaciones. Consideradas globalmente, las enfermedades infecciosas continúan siendo la principal causa de muerte a nivel mundial. Actualmente las enfermedades gastroentéricas siguen representando un grave problema de salud pública en México y su transmisión se encuentra estrechamente relacionada con el nivel de saneamiento y desarrollo económico (Memorias del VII curso de actualización de higiene y calidad de la carne, 2002).

Las muertes por diarrea presentan una gran variedad en cuanto a su distribución geográfica en México, debido a las diferentes condiciones sanitarias de cada lugar.

Algunas de las enfermedades emergentes de origen alimentario son bien conocidas, pero se les considera emergentes porque han incrementado su frecuencia dentro de las dos últimas décadas. Algunos de los patógenos han sido considerados emergentes recientemente. Tal es el caso de las

infecciones por *Escherichia coli* O157:H7 (INPPAZ, 2000; Abram, 1997 y Pascual, 1993).

1.3. Calidad microbiológica

Uno de los principales problemas de la carne a nivel mundial es la contaminación microbiológica que las canales sufren en los rastros. El mismo proceso de matanza conlleva el relacionar factores de riesgo para la canal, como por ejemplo, el desangrado, el desollado y el eviscerado. Todas estas etapas del proceso cuando no son adecuadamente realizadas pueden contaminar la carne de la canal. Existen además, otros agravantes, como el ambiente sanitario del propio rastro, la higiene de los operarios y la limpieza de los utensilios, que contribuyen a la contaminación de la canal. Posterior al sacrificio, la carne sigue sufriendo malos manejos, como el transporte no refrigerado, o como la venta en lugares insalubres donde la contaminación supone un riesgo alto (Aluja *et al.*, 1974; Villanueva *et al.*, 1998; INPPAZ, 2000).

Por esto se determinan microorganismos indicadores, para evidenciar por un lado, la falta de higiene y por otro, la contaminación fecal durante el proceso. Las bacterias coliformes totales y fecales son indicadores utilizados para estos propósitos, cuya enumeración o recuento se realiza con mayor facilidad y cuya presencia en los alimentos (en determinado número) indica que estos productos estuvieron expuestos a condiciones que pudieran haber introducido organismos peligrosos y sirven para evaluar la calidad microbiológica. En la mayoría de los casos de enfermedad transmitida por alimento se observa que los microorganismos patógenos deben estar en cantidades suficientes para causar una infección (dosis mínima infectante) o producir toxinas (Moreno, 1983).

1.4. Microorganismos indicadores

La presencia de microorganismos en los alimentos no significa necesariamente un peligro para el consumidor o una calidad inferior de estos productos. La mayor parte de los microorganismos se convierten en potencialmente peligrosos para el consumidor sólo después de que han sido violados los principios de higiene, limpieza y desinfección, situación que favorece la contaminación exacerbada de microorganismos.

La puesta en evidencia de estos riesgos se basa en el examen de muestras de alimentos en busca de los propios agentes causales o de indicadores de una contaminación no admisible.

En los alimentos los microorganismos en determinado número indican que estos productos estuvieron expuestos a condiciones que pudieran haber introducido organismos peligrosos y/o permitido la multiplicación de especies infecciosas. Los grupos o especies utilizadas con estos fines se denominan microorganismos indicadores, y sirven para evaluar tanto la seguridad que ofrecen los alimentos en cuanto a microorganismos y sus toxinas, como su calidad microbiológica.

Cada tipo de recuento de gérmenes viables es muy útil para fines específicos, pero el recuento de bacterias mesófilas aerobias es el comúnmente utilizado para indicar la calidad sanitaria de los alimentos con respecto a su vida útil. Los psicrótrofos son importantes para predecir la estabilidad del producto bajo diferentes condiciones de almacenamiento por lo que ayuda a predecir la vida útil de un alimento conservado en refrigeración por debajo de los 5°C (Moreno, 1983; Adams, 1997).

Entre los microorganismos indicadores sanitarios, considerados de riesgo indirecto para la salud se encuentran los coliformes totales y fecales que son microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae*. Los coliformes totales fermentan la lactosa con producción de gas cuando se incuban a 35-37°C durante 48 horas. Son bacilos Gram negativos no esporulados. Los

géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Klebsiella* forman este grupo. De todos éstos el género *Escherichia coli* es el único que se encuentra en el tracto intestinal de los seres humanos y animales como hábitat primario. Las otras bacterias pueden encontrarse en los vegetales y en el suelo donde son más resistentes que algunas bacterias patógenas de origen intestinal. Así la presencia de coliformes totales no indica necesariamente, contaminación fecal. Las bacterias del grupo de los coliformes fecales tienen la capacidad de fermentar la lactosa con producción de gas a una temperatura de 44-45.5°C. (Adams, 1997; ICMSF. Microorganismos de los alimentos 1 y 2, 2000).

1.5. Microorganismos patógenos involucrados en la carne

La carne cruda puede contener *Staphylococcus aureus* aunque, por lo general, en pequeñas cantidades. Este tiene poca capacidad de competir con la flora típica de la carne, por lo que para que constituya un riesgo sanitario, la flora normal de la carne debe estar restringida y ha de producirse un abuso en la temperatura de almacenamiento del producto. Su presencia en un alimento se interpreta, como indicativo de contaminación a partir de la piel, la boca y las fosas nasales de los manipuladores de alimentos, si bien el material y equipo sucio y las materias primas de origen animal pueden ser la fuente de contaminación. Cuando se encuentra un gran número de estafilococos en un alimento, ello significa, que las prácticas de limpieza y desinfección y el control de la temperatura no han sido, en algún lugar, adecuados. Una característica importante de *Staphylococcus aureus* es que su toxina puede provocar intoxicación cuando se ingiere con los alimentos. La presencia de un número elevado de dicho microorganismo en un alimento refleja poca higiene por inadecuada manipulación y si además son cepas enterotoxigénicas, suponen un riesgo para la salud (Moreno, 1983; Adams, 1997).

En 1982 surgió un brote de colitis hemorrágica en los Estados Unidos y se demostró que había sido causado por *Escherichia coli* O157:H7 y puede complicarse con el síndrome hemolítico urémico; esta complicación, se da en particular en los niños y presenta una elevada letalidad. Actualmente se ha reconocido que constituye un problema importante en América del Norte ya que en Estados Unidos se han producido algunos brotes graves por ingestión de hamburguesas de carne mal cocida. La transmisión a través de los alimentos contaminados ocurre con mayor frecuencia en carne de res. La capacidad de producir brotes epidémicos junto a la gravedad de las complicaciones de las enteritis confiere a este microorganismo una gran importancia en salud pública. Puede estar presente en el intestino de bovinos y contaminar la carne durante el sacrificio y faenado. (ICMSF. Microorganismos de los alimentos 2, 2000; Pascual, 1992).

1.6. Técnica de Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de microorganismos

En abril de 1983, Kary Mullis da a conocer la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica ha invadido de tal forma la Biología Molecular, que hoy en día es muy difícil imaginar esta ciencia sin ella. Es un método *in vitro* de síntesis de ácidos nucleicos por el cual un segmento particular de DNA marcado por dos iniciadores que indican el comienzo de la secuencia a replicar, la cual se somete a repetidos ciclos de desnaturalización, alineación y extensión con la enzima taq polimerasa. Se obtienen así múltiples copias de la secuencia escogida del DNA. La reacción en cadena de la polimerasa simplifica la labor, pues con ella se obtiene la cantidad de ADN que se desee (Kary *et al.*, 1998).

Las ventajas principales de la técnica de PCR son la especificidad, la sensibilidad y la rapidez de la prueba. La selección de iniciadores que amplifiquen secuencias de ADN de genes responsables de codificar factores

de virulencia o toxinas, permite identificar únicamente aquellos organismos potencialmente patógenos (Erlich *et al.*, 1992 y Harris *et al.*, 1992).

1.7. El uso de PCR en microbiología de alimentos

La introducción de PCR después de quince años ha sido una herramienta exitosa de la investigación, para el descubrimiento de patógenos en alimentos (Elmerdahl, 2000). En 1999, la Comisión europea aprobó el proyecto de la investigación, que apunta a validar y regularizar el uso de diagnóstico por PCR para el descubrimiento de bacterias patógenas en alimentos (Malorny *et al.*, 2003).

Se usan cada vez más la técnica de PCR en investigación en microbiología de alimentos, porque ellos ofrecen un descubrimiento sensible y específico de patógenos. El descubrimiento directo de organismos en muestras de alimentos es una meta mayor para la tecnología de PCR.

Por todo lo anterior, este estudio tiene como objetivo determinar la calidad bacteriológica, dada por la inocuidad y aceptabilidad sanitaria, de la carne de bovino de origen nacional e importada, influenciada por factores de riesgo de origen y de venta en el mercado formal mexicano de tres ciudades. El estudio forma parte de un proyecto de investigación en el cual se determinaran otros microorganismos en la carne en trabajos posteriores, titulado "Factores de riesgos relacionados con la calidad bacteriológica y sensorial de la carne de bovino nacional e importada en México". PAPIIT IN206401.

HIPÓTESIS

Es probable que exista diferencia significativa en la calidad bacteriológica influenciada por los factores de riesgo de origen y venta en la carne nacional e importada, que se ofrece en el mercado formal mexicano de tres ciudades.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la calidad bacteriológica de la carne de bovino nacional e importada influenciada por factores de riesgo de origen y venta, en el mercado formal mexicano de tres ciudades.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar los factores de riesgo de origen y de venta, asociados a la calidad bacteriológica de la carne de bovino que se comercializa en el mercado formal mexicano en tres ciudades.
- b) Determinar el recuento de psicrótrofos aerobios en placa, coliformes totales y fecales, y *Staphylococcus aureus*, en carne cruda de origen nacional e importada que se comercializa en los puntos de venta del mercado formal, en Monterrey, N.L., México, D.F. y Villahermosa, Tabasco.
- c) Determinar la presencia o ausencia de *E. coli* O157:H7 por el método de PCR en carne cruda nacional e importada en los puntos de venta del mercado formal, en Monterrey N.L., México, D.F. y Villahermosa, Tabasco.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño del Experimento

Se realizó un muestreo no probabilístico en tres ciudades de las regiones ganaderas del país (norte, centro y sur) basado en los siguientes criterios:

- a) regiones de mayor producción (anual) de carne bovina,
- b) sacrificio de bovinos en rastros TIF y
- c) regiones más pobladas según las zonas geográficas de la República.

Las ciudades elegidas por regiones fueron las siguientes: zona norte, Monterrey, N.L; zona centro, México, D.F. y zona sur Villahermosa, Tab. Así mismo, se seleccionaron puntos de venta de carne dentro del mercado formal en México.

2. Selección de puntos de venta

Dentro de estas ciudades se seleccionaron establecimientos comerciales que venden carne dentro del mercado formal como lo son las tiendas de autoservicio.

En Monterrey, N. L., se eligieron 2 Wal Mart, 2 Soriana y 2 tiendas Gigante. En México, D.F., se eligieron 4 Wal Mart, 2 Comercial Mexicana y 2 Gigante y; en Villahermosa, Tab., se eligieron 1 Soriana, 1 Gigante y 2 Wal Mart.

3. Criterios generales para la selección de las muestras de carne

Para evaluar la calidad bacteriológica de la carne, se aplicaron los siguientes criterios de inclusión:

- a) Muestras de carne refrigerada, empacada y sin marcas comerciales, para lograr homogeneidad entre la carne nacional e importada.
- b) Se seleccionó un corte específico, la milanesa de bola, por tratarse de uno de los cortes más comunes en la cocina mexicana.

4. Muestreo

El número y tamaño de las muestras fueron determinados por conveniencia económica, considerando la presentación comercial y de acuerdo con los criterios microbiológicos establecidos por la Comisión Internacional de Estandarización Microbiológica de Alimentos (ICMSF del inglés International Commission on Microbiological Specifications for Foods, of the International Union of Microbiological Societies). El procedimiento de muestreo para los paquetes de venta al detalle, como carne fresca refrigerada y empaquetada, impone el análisis de 5 paquetes (ICMSF. Microorganismos de los alimentos 2, 2000; Wachter, 2000). Cada paquete se marco e identificó con el número de muestra, ciudad y origen. Se seleccionaron 5 paquetes de milanesas nacionales de 250 g aproximadamente y 5 importados, haciendo un total de 10 muestras por tienda.

Para la determinación de microorganismos indicadores, se hizo el muestreo en 6 tiendas de Monterrey, N.L., 8 tiendas en México, D.F. y 4 tiendas de Villahermosa, Tab., haciendo un total de 18 tiendas y considerando el número de muestras por tienda se obtuvo un total de 180 muestras. Para la determinación de patógenos se hizo el muestreo en 2 tiendas de Monterrey, N.L., 4 tiendas en México, D.F. y 2 tiendas de Villahermosa, Tab., haciendo un total de 8 tiendas; y considerando el número de muestras por tienda se obtuvo un total de 80 muestras.

5. Evaluación de los factores de riesgo en punto de venta

Los factores de riesgo asociados a la calidad bacteriológica de la carne evaluada, están relacionados con el país de origen (nacional e importada) y las condiciones higiénico - sanitarias en el punto de venta.

Previo a la toma de muestras, se aplicó un formulario (Anexo 1) en los puntos de venta del mercado formal de la carne, para identificar los factores de riesgo, tales como:

- a) Datos sobre la tienda:
 - Estado general de limpieza,
 - Aspecto higiénico del personal que manipula los alimentos.
- b) Datos sobre la sección de carne:
 - Ubicación
 - Presencia de olores desagradables,
 - Presencia de suciedad,
 - Estado general de los utensilios.

Las anotaciones del formulario se clasificaron con las siguientes escalas:

- Estado general de limpieza: 1 = Bueno, 2= Regular y 3= Malo
- Higiene del personal: 1 = Bueno, 2= Regular y 3= Malo
- Sección de pescado, pollo, fruta y abarrotes:
 - 1= Sí < de 5 m de la sección de carne y
 - 2= No > de 5 m de la sección de carne.
- Presencia de olor desagradable, suciedad: 1= Sí (presente) y
2 = No (ausente)
- Utensilios sucios y utensilios en mal estado:
 - 1= Sí (sucio o en mal estado) y
 - 2=No (limpio o en buen estado).
- Carne fresca o empacada en expositores cubierto:
 - 1=Sí y 2=No Productos en contacto con la carne:

- Temperatura de refrigerador: rango encontrado en la tienda de 0 - 6°C

6. Análisis microbiológico

6.1. Toma y Manejo de Muestras

Para la toma y manejo de las muestras de carne, se cumplió con lo recomendado por el Manual de Toma y Manejo de Muestras para el Análisis Bacteriológico (Secretaría de salud), el Manual de Técnicas y Procedimientos para el Análisis Microbiológico de Productos Cárnicos (Secretaría de salud) y para la preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis bacteriológico (NOM-110-SSA1-1994).

6.2. Pruebas bacteriológicas

Se utilizó el método para la cuenta de bacterias aerobias en placa, tales como recuento de psicrótrofos, así como también determinación de coliformes totales y fecales; indicadores sanitarios que nos permiten evaluar el manejo higiénico del producto.

- Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa para los psicrótrofos (NOM-092-SSA1-1994, Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa). (Figura 1)

- Determinación de coliformes totales y fecales por la técnica de diluciones en tubo múltiple. (NOM-145-SSA1-1995, Productos cárnicos troceados y curados. Productos cárnicos curados y madurados). (Figura 2)

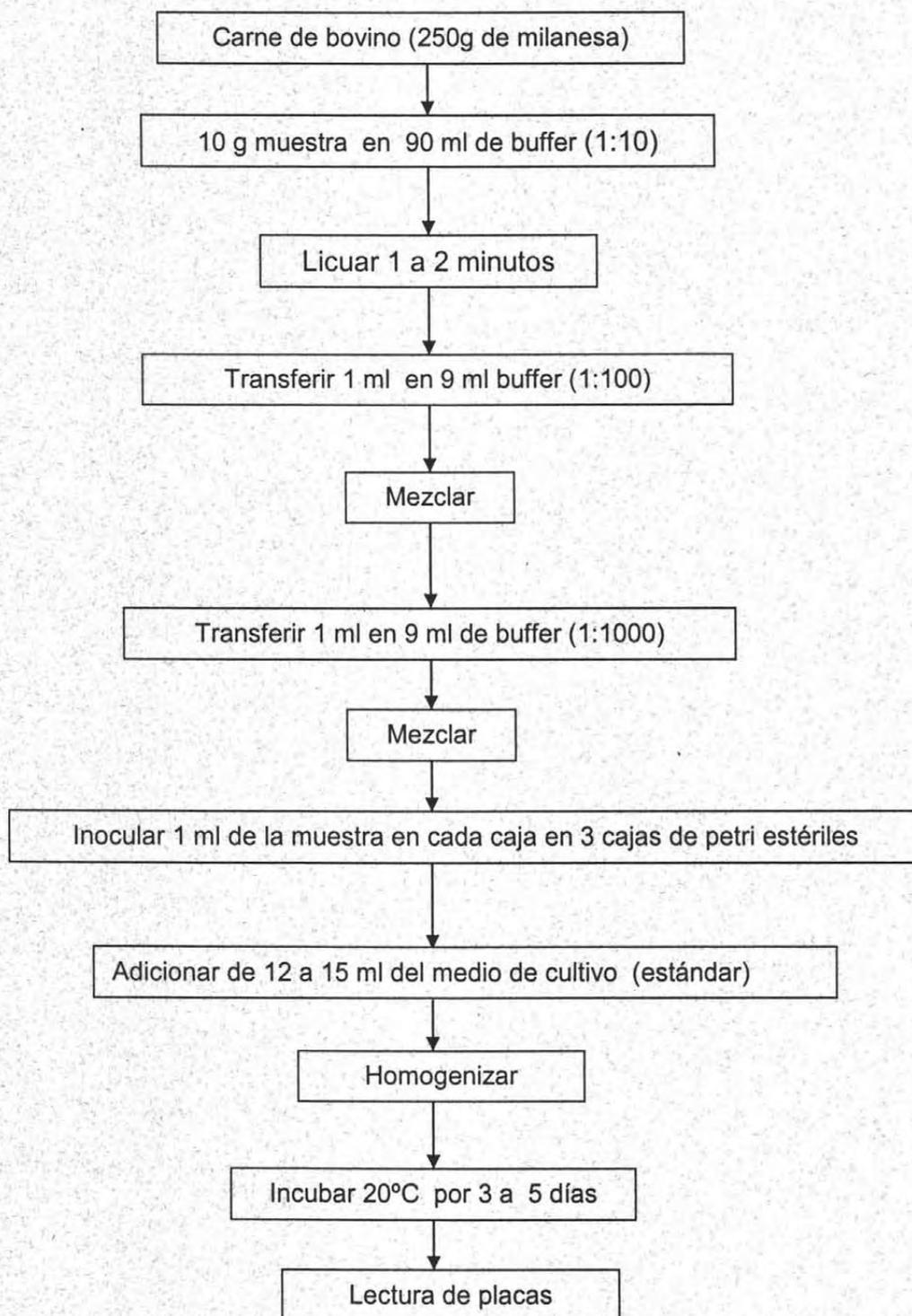


Figura 1. Recuento de Aerobios en Placa (RAP) Psicrótrofos. (Diagrama)

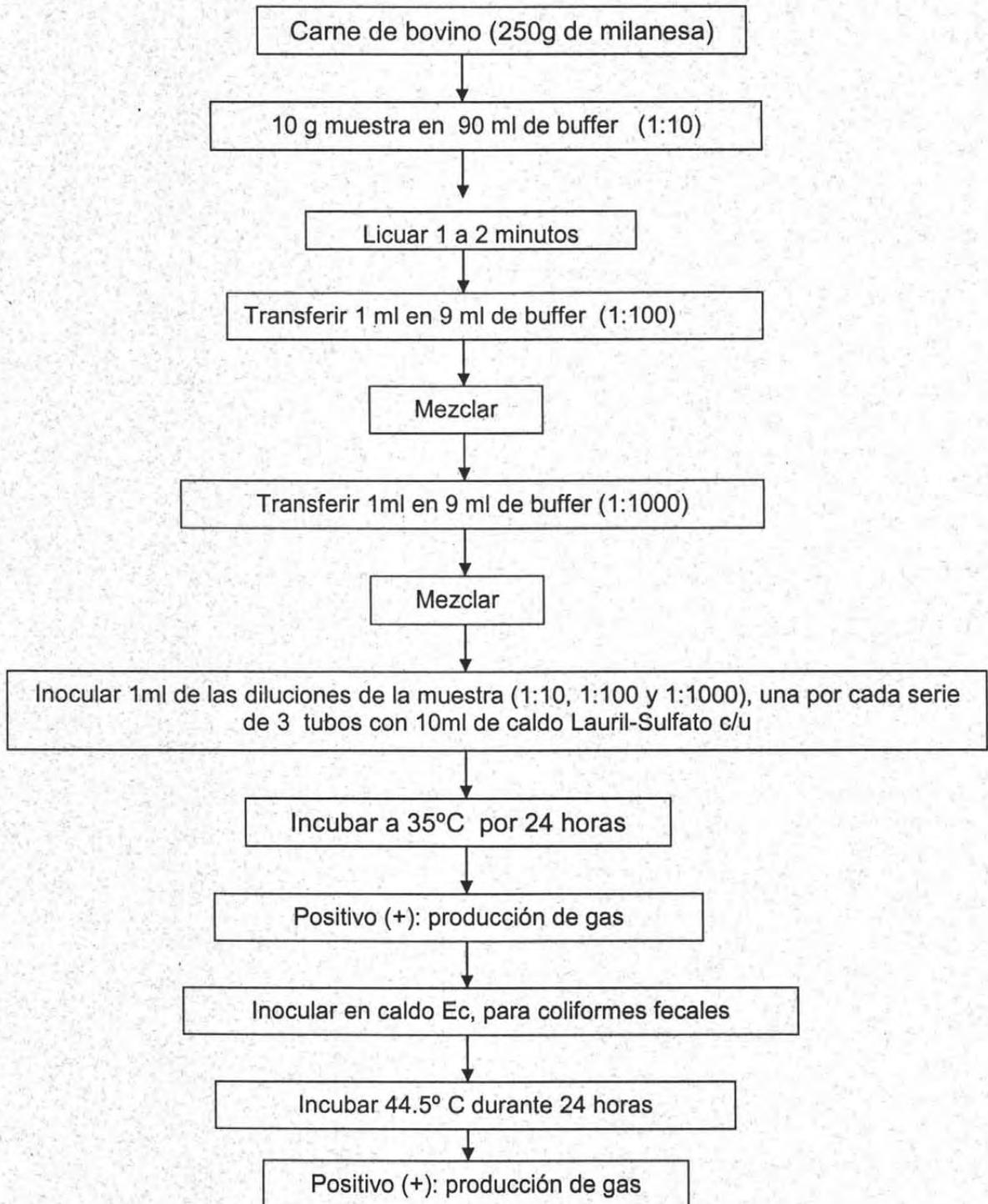


Figura 2. Determinación de bacterias coliformes con la técnica de diluciones en tubo múltiple. (Diagrama de coliformes totales y fecales)

6.3. Determinación de patógenos

6.3.1. *Staphylococcus aureus*

Se realizó el recuento de *Staphylococcus aureus* por sus implicaciones toxigénicas. El análisis bacteriológico se realizó de acuerdo a las técnicas establecidas en las normas oficiales mexicanas correspondientes: Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos (NOM-115-SSA1-1994) y Manual de técnicas microbiológicas para productos cárnicos de la Secretaría de Salud (Figura 3).

6.3.2. *Escherichia coli* O157:H7

Para determinar la presencia o ausencia de *Escherichia coli* O157:H7, se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual es más rápida y eficaz, capaz de detectar pequeñas cantidades de ADN del microorganismo específico.

6.3.2.1. Procesamiento de las muestras para su análisis por PCR

Todas las muestras fueron procesadas siguiendo el Manual para la toma y manejo de muestras para el análisis bacteriológico de alimentos (Secretaría de Salud), y la NOM-110-SSA1-1994. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis bacteriológico. Se pesaron 25g provenientes de cada muestra en condiciones de esterilidad y se depositaron en 225ml en caldo EC, se licuó durante 2 minutos y se dejó incubar durante 24 horas. (Figura 4).

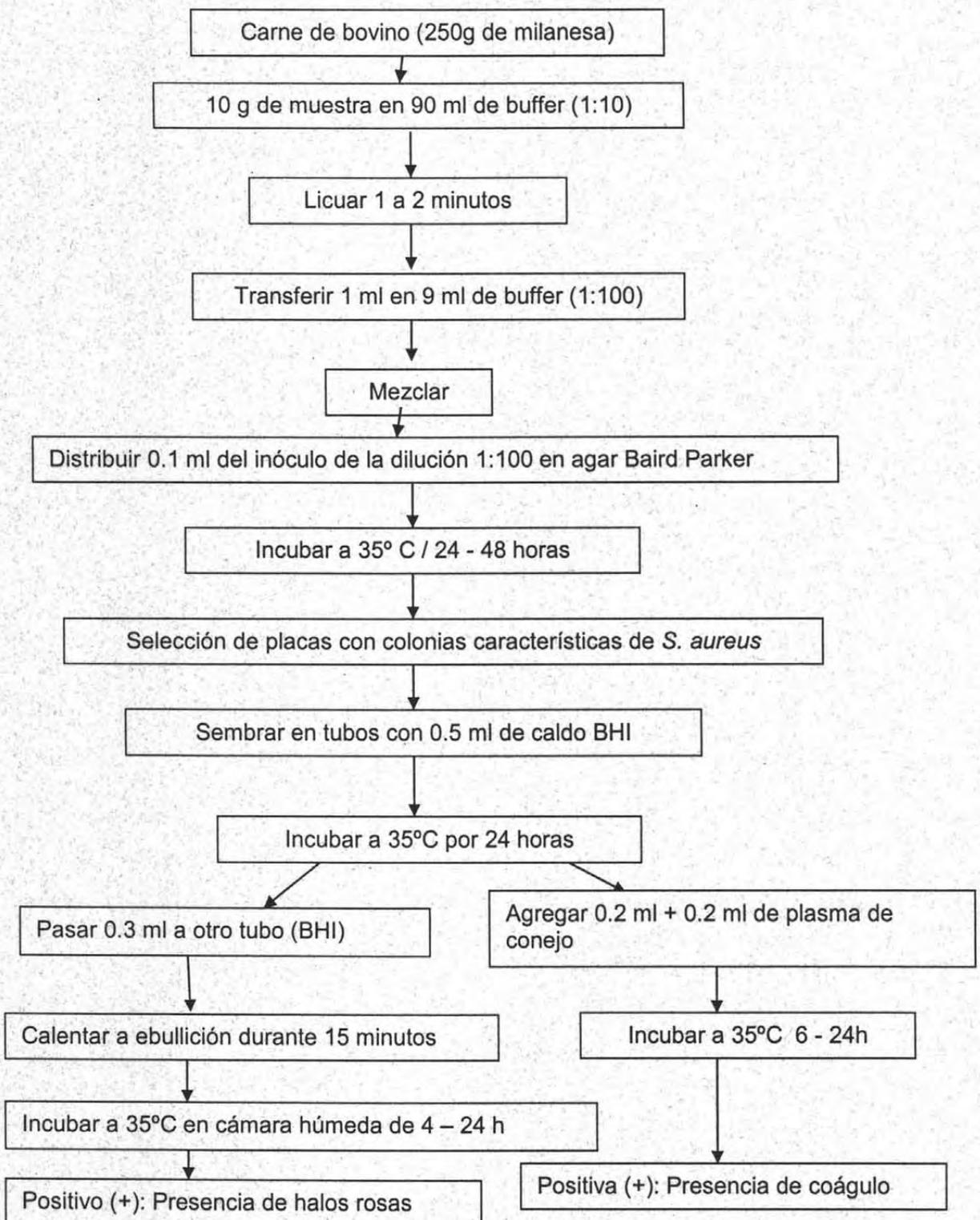


Figura 3. Recuento de *Staphylococcus aureus*.(Diagrama)

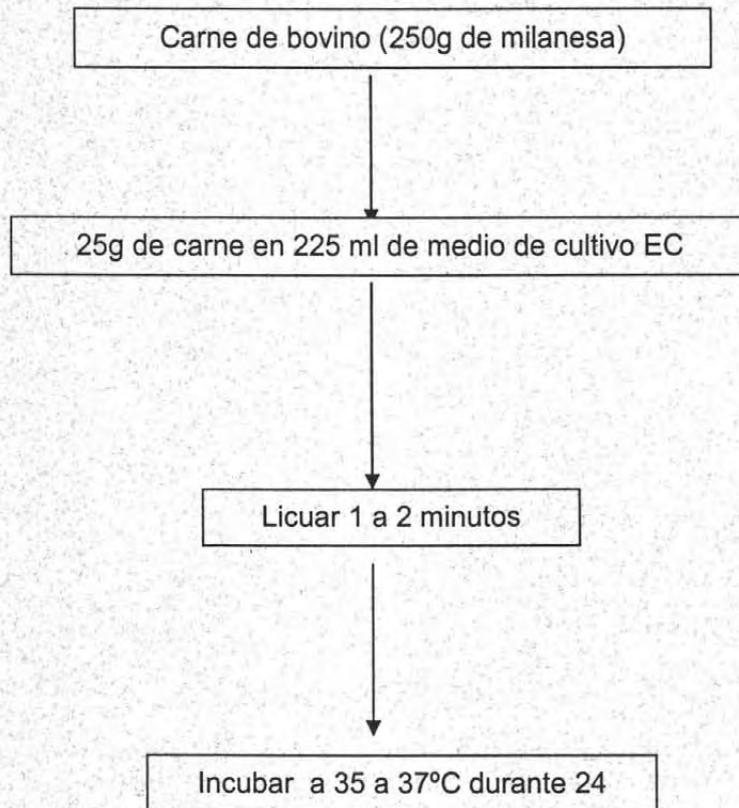


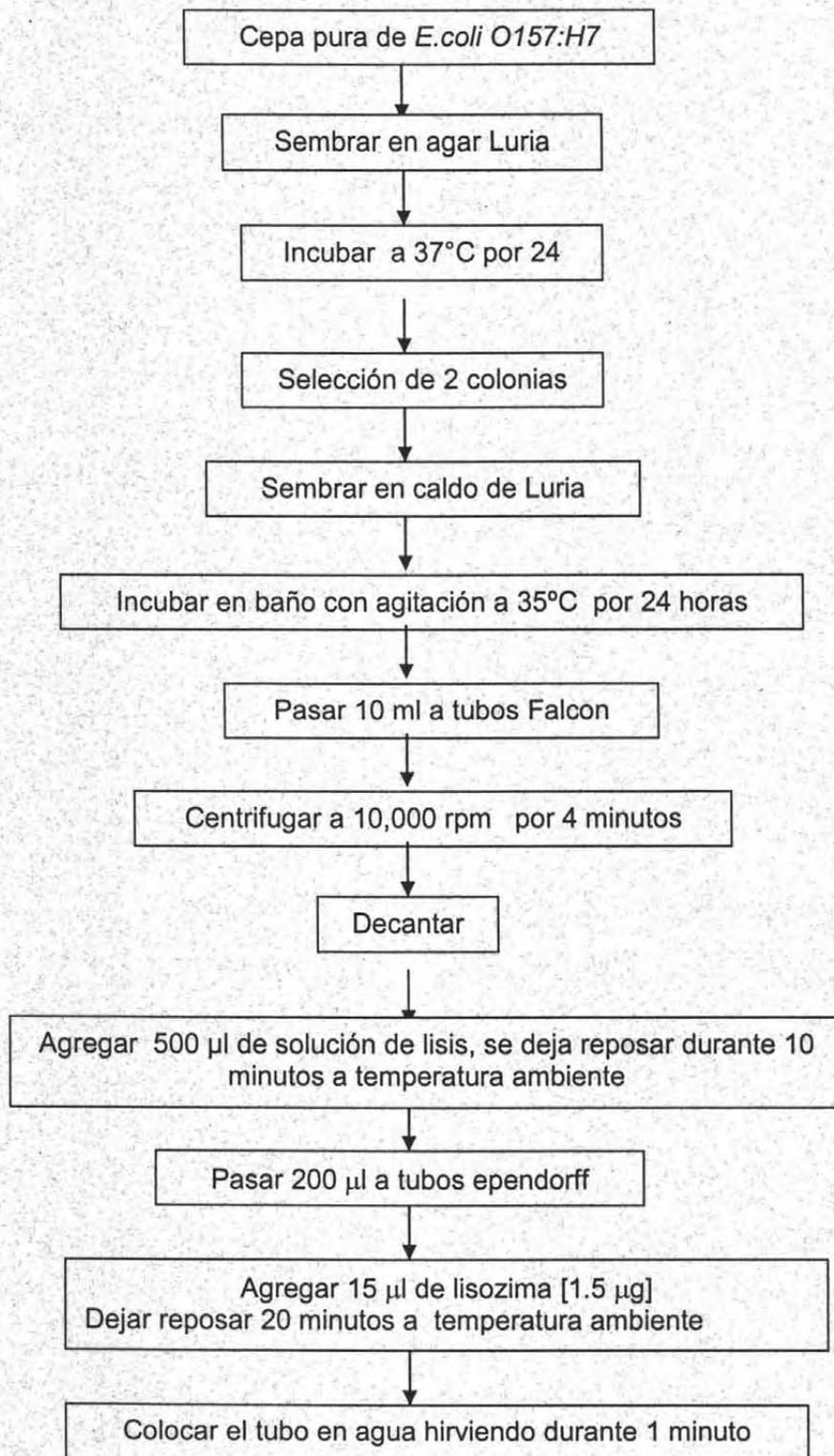
Figura 4. Preenriquecimiento para *Escherichia coli* O157 H:7. (Diagrama)

6.3.2.2. Extracción y purificación de ADN de la bacteria y de las muestras para su análisis por PCR

6.3.2.2.1. Extracción de ADN de la bacteria

Para la extracción de ADN, de la bacteria se sembraron cepas puras de *E. coli* O157:H7 en agar Luria (LB); después de 24 horas, se tomó una colonia y fue sembrada en caldo Luria (LB), y se dejó incubando en un baño con agitación a 35°C por 24 horas. Posteriormente se depositaron 10ml en un tubo Falcon, se centrifugó a 4,000rpm por 10 minutos, se decantó y a la pastilla resultante del precipitado se le agregaron 500µl de solución de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA, 8% sacarosa, 5% tritón X-100) se mezcló con la pastilla obtenida y se dejó reposar durante 10 minutos al medio ambiente, se pasaron 200µl a tubos eppendorf; se agregaron 15µl de lisozima, se dejó reposar nuevamente 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se colocó el tubo en agua hirviendo durante 1 minuto y se agregaron 7.5µl de RNAsa dejándose incubar con esta enzima durante 1 hora a 37°C, después de este tiempo se agregó proteinasa K y se sometió a calentamiento en un termoblok a 55°C durante 30 minutos y después a 60°C durante 1 hora, al término de este tiempo se agregó una solución de cloruro de sodio 2M, se centrifugó a 12,000rpm durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto dejándose en congelación a -20°C durante 24 horas. Posteriormente, se centrifugó a 12,000rpm por 10 minutos, se obtuvo una pastilla y se decantó cuidadosamente. La pastilla obtenida se lavó en dos ocasiones con etanol al 70%, por cada ocasión se centrifugó a 10,000rpm 5 minutos y se decantó nuevamente para someterlo a secado en termoblock a 55°C aproximadamente de 3 a 5 minutos. Por último, se agregaron 150µl de agua bidestilada para resuspender el ADN obtenido y finalmente se verificó la

integridad de éste, corriendo la muestra en un gel de agarosa al 1%. (Figura 5) (Silhavy *et al.*, 1984; Sambrook *et al.*, 1989; García, Tesis maestría, 2002).



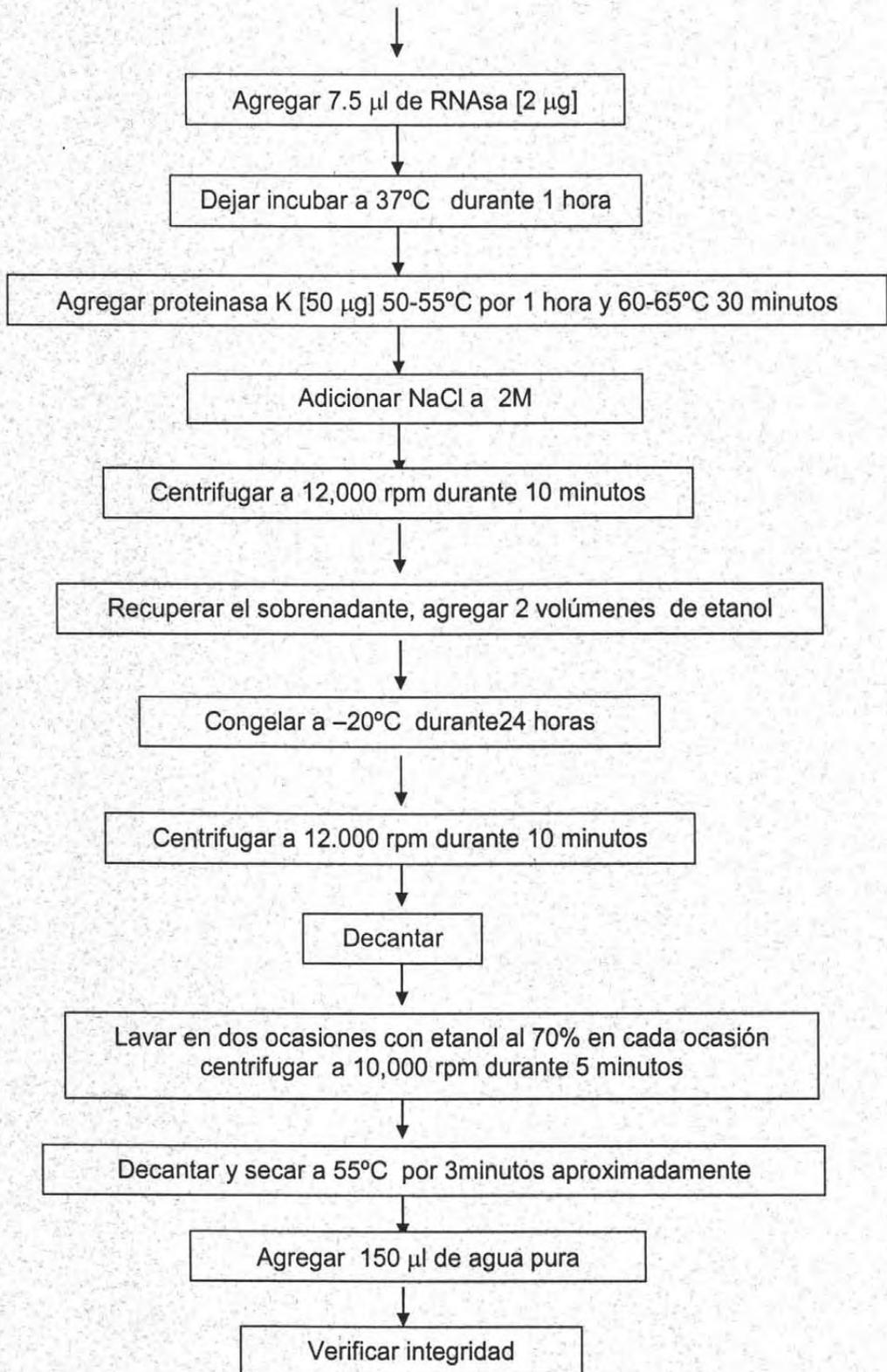
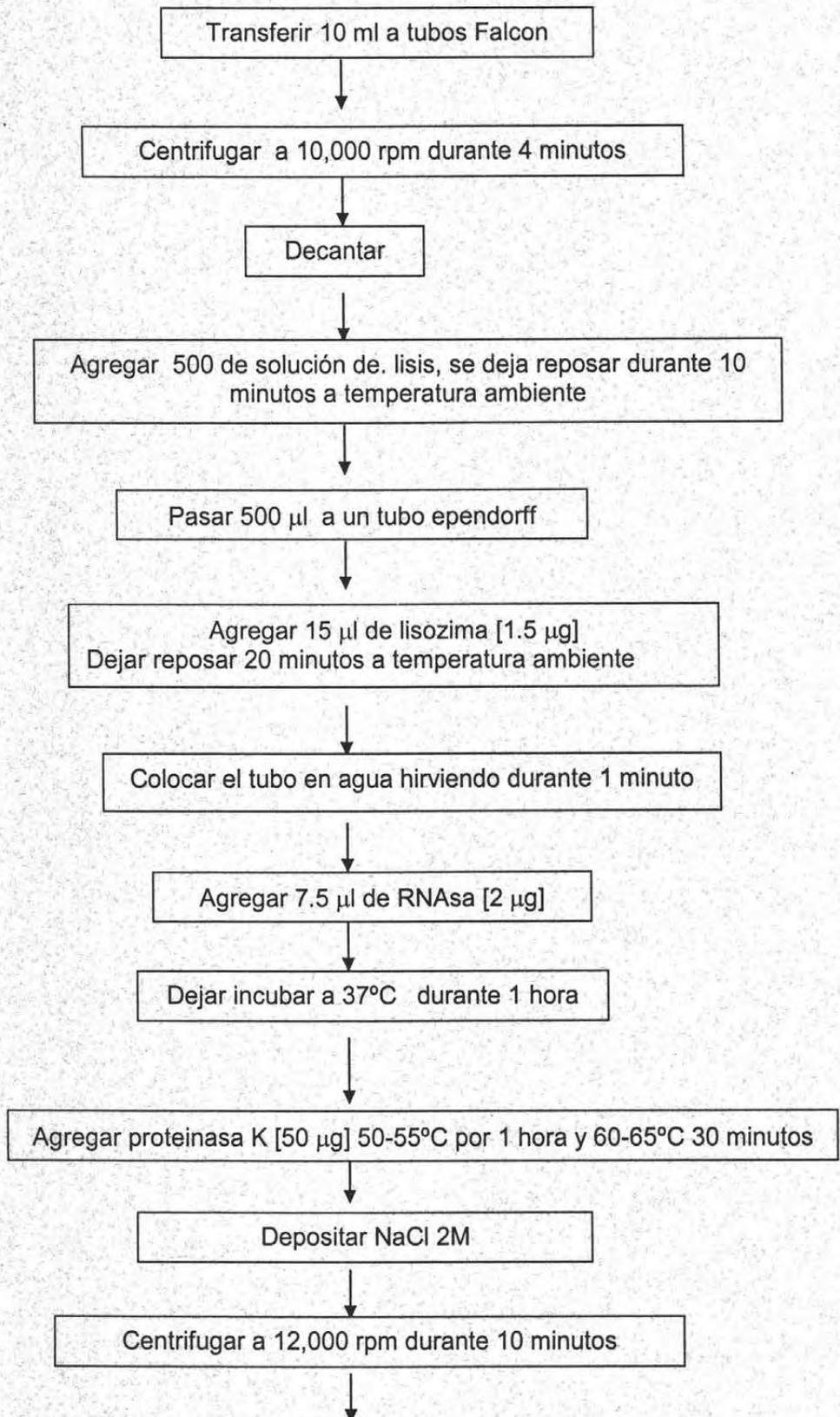


Figura 5. Extracción de ADN bacteriano.

6.3.2.2.2. Extracción de ADN de las muestras para su análisis por PCR

Se tomaron 10 ml de la muestra en un tubo Falcon, se centrifugó a 4,000rpm durante 10 minutos, el sobrenadante, se decantó cuidadosamente y a la pastilla resultante del precipitado se le agregaron 500 μ l de solución de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA, 8% sacarosa, 5% tritón X-100) se mezcló con la pastilla obtenida, se dejó reposar durante 10 minutos al medio ambiente, después se pasaron 200 μ l a un tubo ependorff; posteriormente se agregaron 15 μ l de lisozima y se dejó reposar nuevamente 20 minutos a temperatura ambiente. Después de este lapso se colocó el tubo en agua hirviendo durante 1 minuto y se agregaron 7.5 μ l de RNAsa dejándose incubar durante 1 hora a 37°C, después de este tiempo se agregó proteinasa K y se sometió a calentamiento en un termoblok a 55°C durante 30 minutos y después a 60°C durante 1 hora, al término de este tiempo se agregó una solución de cloruro de sodio 2M, se centrifugó a 12,000rpm durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto y se dejó en congelación a -20°C durante 24 horas, para después centrifugar a 12,000rpm por 10 minutos. La pastilla obtenida se lavó en dos ocasiones con etanol al 70% por cada ocasión, se centrifugó a 10,000rpm por 5 minutos y se decantó nuevamente para someterlo a secado en termoblock a 55°C aproximadamente de 3 a 5 minutos. Se agregaron 150 μ l de agua bidestilada para resuspender el ADN obtenido y finalmente se verificó la integridad de éste, corriendo la muestra en un gel de agarosa al 1%, y cuantificando los nanogramos obtenidos en el fluorómetro (Figura 6) (Silhavy *et al.*, 1984; Sambrook *et al.*, 1989; García, Tesis maestría, 2002). Se conservó en congelación (-20°C) y posteriormente se realizó la PCR.



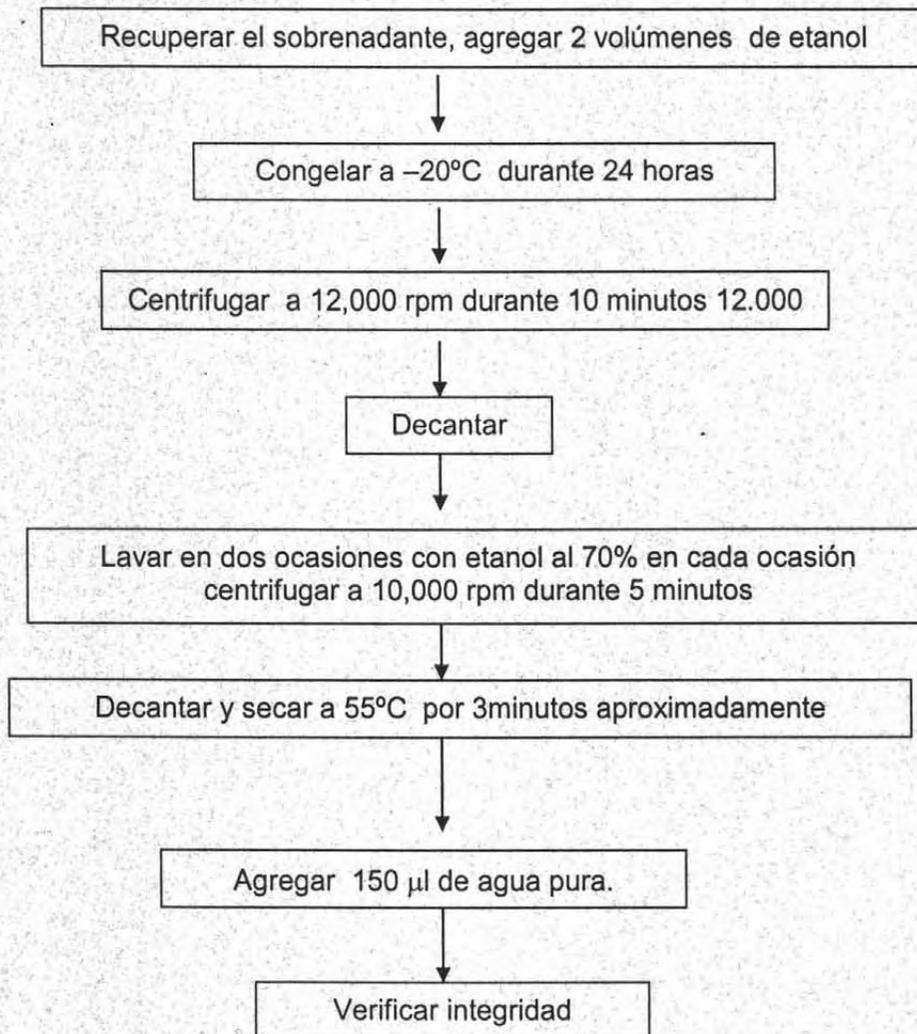


Figura 6. Extracción de ADN de las muestras de carne de bovino.
(Diagrama de extracción de ADN para muestras)

6.3.2.3. Técnica de PCR para las muestras de carne

Algunos investigadores (Cebula *et al.*, 1995) han desarrollado una mezcla de iniciadores para la identificación específica de *E. coli* O157:H7, en base a sus factores de virulencia, identificando simultáneamente los genes que codifican para las toxinas que produce; además de amplificar el gen *uidA* el cual codifica para β -glucoronidasa. Aunque los aislamientos de *E. coli* O157:H7 no tienen actividad β -glucoronidasa, ellas llevan el gen *uidA*. Se ha secuenciado este gen y se encontró que tiene un residuo G (en lugar de un residuo T encontrado en otros tipos de *E. coli*) en la posición 92, así como en el final de extremo 3' también hay una G (en lugar de una A). Este cambio de base altamente conservado se usa para identificar el serotipo O157:H7. En este estudio se utilizó un iniciador ya probados para la amplificación de *E. coli* O157:H7 del gen *uid-A* (Tabla 1) el cual fue probado en una PCR con la posibilidad de detección de ADN del microorganismo a partir de una reacción de PCR (Gilbert *et al.*, 2003; García (Tesis maestría), 2002; Feng *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 1993 y Yoshitomi *et al.*, 2003).

TABLA 1

Iniciador para la identificación de *E. coli* O157:H7

Gen amplificado	Tamaño del producto de PCR	Designación del iniciador	Secuencia del iniciador
<i>uid-A</i>	252 pb	UID-P UID-N	5'-GCGAAAAGTGTGGAATTGGG-3' 5'-TGATGCTCCATAACTTCCTG-3'

pb. = pares de bases

Para cada reacción se utilizó un control interno que fue producto de la amplificación de ADN plasmídico denominado M13, los cuales generan un producto de PCR de 120 pares de bases (Tabla 2).

TABLA 2

Características del control interno utilizado para la amplificación de ADN

Gen amplificado	Tamaño del producto de PCR	Designación del iniciador	Secuencia del iniciador
M13	120 pb	Puc	5'- CGTTGTAAAACGACGGCCAGTG- 3' 5'- CACAGGAAACAGCTATGACCATG-3'

pb = pares de bases

La PCR se realizó en condiciones estándares de volúmenes y concentraciones de cada uno de los reactivos; una vez cuantificado el ADN obtenido proveniente de cada microorganismo, se hicieron las diluciones correspondientes para alcanzar una concentración final de 20ng/μl; dicha concentración fue utilizada para todas las reacciones que se llevaron a cabo.

Para llevar a cabo la reacción, los iniciadores seleccionados se emplearon a una concentración 10μM; se utilizó una solución buffer de amplificación constituida por tritón X-100 pH 8 al 2%, Albúmina Sérica Bovina (BSA) 3mg/ml; 2mMoles de dNTP's, y 5 unidades/μl de Taq polimerasa, empleando como vehículo agua bidestilada estéril. Esta mezcla se hizo en tubos eppendorf estériles que contenían todos los reactivos mencionados excepto el ADN blanco, el cual era el primero en ser depositado en tubos (PCR), posteriormente se depositó la mezcla descrita llevando cada reacción a un volumen final de 20μl (Tabla3).

TABLA 3

Concentraciones finales para la realización de una reacción de PCR

Reactivo	[Stock]	[Final]	μl por rx
DNA <i>E. coli</i> O157:H7	20 ng/ μl	100 ng	5 μl
DNA Puc	1 ng/ μl	1 ng	1 μl
Primer específico	10 μM	0.2 μM	0.4 μl
Primer interno	10 μM	0.05 μM	0.1 μl
Taq polimerasa	5 U/ μl	1 U/rx	0.2 μl
dNTP'S	2 mM	0.2 mM	2 μl
BSA	3 mg/ml	0.15 mg/ml	1 μl
Tritón	2%	0.1 %	1 μl
Buffer C	10 X	1 X	2 μl
H ₂ O bidestilada		cpb 20 μl	7.3 μl

Las condiciones de temperatura y ciclos en el termociclador fueron, 94°C por 5 minutos; 94°C por 30 segundos, 56°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto y 72°C por 5 minutos con 30 ciclos.

Tanto para confirmar la integridad del ADN obtenido como para observar los productos resultantes de la PCR, se elaboraron geles de agarosa en una solución de TBE 1x (Tris base, ácido bórico, EDTA pH 8 0.5M).

Para observar integridad del ADN, se disolvió agarosa al 1% en una solución de TBE 1x, en tanto que para observar los productos de la reacción en cadena de la polimerasa, se disolvió agarosa al 3% en la solución que ya se señaló, calentando hasta su ebullición; se vertió en el molde de la cámara de electroforesis y una vez gelificado, se llenó la cámara con solución TBE 1x, se mezclaron 5 μl de la muestra con 3 μl de solución de carga y se depositaron en el pozo correspondiente. Se utilizó un marcador de peso

molecular (pBR 322 *Msp* / BIOGENICA, S.A. de C.V.) para comparar los productos obtenidos por PCR. Concluida la electroforesis a 70-90 voltios, el gel se depositó en un recipiente con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) para su tinción, tras lo que fue observado sobre un haz de luz ultravioleta (Sambrook *et al.*, 1989).

7. Análisis Estadístico

Los datos sobre Calidad Microbiológica (CT, CF y Psicrótrofos) fueron sometidos a un análisis de varianza a través de la utilización del Procedimiento General Linear Model en el programa estadístico SAS (SAS 2001). En dicho análisis se utilizaron como variables de clase el origen (nacional o importado) y la zona geográfica donde se colectó la muestra (centro, norte y sur de la República) y como variables independientes los CT, CF y Psicrotrofos. El modelo aplicado fue:

$$Y_{ijkl} = \mu + R_j + S_i + (R*S)_{ji} + \beta A_{ijkl} + \beta C_{ijkl} + E(i)_{jkl}$$

Donde:

Y_{ijkl} = valor de la variable dependiente

μ = media general

R_j = origen (nacional e importada)

S_i = zona (centro, norte y sur)

$(R*S)_{ji}$ = interacción origen*zona

$E(i)_{jkl}$ = error aleatorio

Con esta metodología se calcularon las medias, desviaciones estándar y coeficientes de variación generales para todas las variables estudiadas. Los efectos se presentan inicialmente separados y luego en conjunto. Cuando se detectaron diferencias significativas, las medias se discriminaron

por medio de la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher (Lentner y Bishop, 1986).

Por otro lado, los datos sobre los Factores de Riesgo relacionados con el estado higiénico de las tiendas se analizaron a través de un análisis de frecuencias (SPSS versión 10.0). Por último, se realizó un estudio de correlación de Pearson entre los factores de riesgo relacionados con la higiene de las tiendas y los indicadores de la calidad sanitaria.

RESULTADOS

Con el propósito de determinar la calidad bacteriológica en la carne de bovino nacional e importada que se ofrece en el mercado formal mexicano de tres ciudades, se realizaron los análisis cuantitativos y cualitativos de los datos.

1. Calidad Sanitaria de la Carne de Bovino

Los resultados mostraron una tendencia a las cuentas elevadas de indicadores sanitarios, pero dentro de la normatividad mexicana e ICMSF. De los análisis realizados con los métodos microbiológicos oficiales, para determinar la calidad sanitaria a 180 muestras de carne de bovino, 90 nacionales y 90 importadas en punto de venta, los resultados para la cuenta de psicrótrofos (UFC/g) mostraron que 12 muestras (13%) de origen nacional tuvieron la cuenta más alta (790,000 UFC/g); de las cuales 2 muestras (2%) correspondieron a la zona Norte y 10 muestras (11%) a la Zona Sur. En la determinación de bacterias coliformes totales (NMP/g) se encontró que 45 muestras (50%) de origen nacional tuvieron la cuenta más alta (1100 NMP/g), de las cuales 15 muestras (17%) se encontraron en la zona norte, 10 muestras (11%) en la zona centro y 20 muestras (22%) en la zona sur; por otra parte, 42 muestras (46%) importadas también tuvieron la cuenta más alta (1100 NMP/g) de coliformes totales; de las cuales 20 muestras (22%) correspondieron a la zona norte, 12 (13%) a la zona centro y 10 (11%) a la zona sur. Para la determinación de bacterias coliformes fecales se encontró que 19 muestras (21%) de origen nacional tuvieron la cuenta más alta (1100 NMP/g), de las cuales 9 (10%) correspondieron a la zona norte y 10 (11%) a la zona sur; también se observó que 1 muestra de origen importada tuvo esta misma cuenta (1100 NMP/g) de coliformes fecales, y correspondió a la zona norte del país.

1.1. Análisis Estadístico de la Calidad Sanitaria

En el Cuadro 1 se muestran las diferencias existentes entre la calidad sanitaria de las muestras obtenidas de origen nacional y las de origen importado. En estos resultados se observa que la carne nacional e importada no difieren ($P>0.05$) en la cantidad de coliformes totales, sin embargo la carne nacional presenta mayor ($P<0.05$) carga de coliformes fecales y aunque ligeramente ($P<0.05$), la carga de psicrótrofos es también superior a la importada.

CUADRO 1

Calidad sanitaria en carne de bovino, nacional e importada

Calidad sanitaria	Carne Nacional	Carne Importada
	Media \pm DE (n=90)	Media \pm DE (n=90)
Coliformes Totales NMP/g	730.20 \pm 46.90 ^a	705.04 \pm 49.36 ^a
Coliformes Fecales NMP/g	317.04 \pm 34.09 ^a	83.26 \pm 35.8 ^b
Psicrótrofos UFC/g (log)	5.26 \pm 0.04 ^a	5.03 \pm 0.04 ^b

a,b Medias con letras diferentes en una misma fila difieren significativamente ($P< 0.05$)

En el Cuadro 2 se presentan las diferencias en Calidad Sanitaria de las muestras de carne recolectadas en las tres zonas del país donde se llevó a cabo el muestreo. En general, los resultados muestran que la carne de la zona centro tiene menor ($P<0.05$) carga microbiana que las muestras de las otras dos zonas. Las muestras de carne de las zonas norte y sur tienen la misma ($P>0.05$) carga de coliformes totales y fecales, la cual es mayor

($P < 0.05$) a la de las muestras recolectadas en la zona centro. Con respecto a la carga de psicrótrofos, la zona sur presenta la mayor ($P < 0.05$) carga comparada con las zonas norte y centro (5.48, 5.09 y 4.86, respectivamente).

CUADRO 2

Calidad sanitaria de la carne de bovino, nacional e importada en las diferentes zonas geográficas

Calidad sanitaria	Norte	Centro	Sur
	Media \pm DE (n=60)	Media \pm DE (n=80)	Media \pm DE (n=40)
Coliformes Totales NMP/g	843.36 \pm 58.54 ^b	454.86 \pm 49.36 ^a	854.65 \pm 67.59 ^b
Coliformes Fecales NMP/g	300.52 \pm 42.54 ^b	16.01 \pm 35.87 ^a	283.92 \pm 49.13 ^b
Psicrótrofos UFC/g (log)	5.09 \pm 0.05 ^b	4.86 \pm 0.04 ^a	5.48 \pm 0.06 ^c

a,b,c Medias con letra diferente en una misma fila difieren significativamente ($P < 0.05$)

El Cuadro 3 muestra la Calidad Sanitaria de la carne nacional en las tres zonas del país. Como se puede observar, la carne nacional de la zona sur se encuentra con la mayor carga microbiana ($P < 0.05$) de coliformes totales, fecales y psicrótrofos. Por otra parte, no presenta diferencia ($P < 0.05$) de coliformes totales y psicrótrofos en la zona centro y norte, pero sí se observa diferencia ($P < 0.05$) de coliformes fecales en las tres zonas de estudio.

CUADRO 3

Calidad sanitaria de la carne de bovino, nacional en las diferentes zonas geográficas

Calidad sanitaria	Nacional		
	Norte	Centro	Sur
	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE
	(n=30)	(n=40)	(n=20)
Coliformes Totales NMP/g	586.72±67.59 ^a	503.90±78.05 ^a	1100.00±95.59 ^b
Coliformes Fecales NMP/g	378.30±49.13 ^b	12.13±56.73 ^a	560.70±69.48 ^c
Psicrótrofos UFC/g (log)	4.98±0.06 ^a	4.85±0.07 ^a	5.94±0.09 ^b

a,b,c Medias con letra diferente en una misma fila difieren significativamente P(< 0.05)

En el Cuadro 4 se muestra la Calidad Sanitaria de la carne importada en las tres zonas y se observa que en la zona norte hay mayor carga microbiana (P<0.05) de los tres indicadores de estudio. Por otro lado, la zona centro y sur presentan la misma carga microbiada (P<0.05) de coliformes totales, coliformes fecales y psicrótrofos.

CUADRO 4

Calidad sanitaria de la carne de bovino, importada en las diferentes zonas geográficas

Calidad sanitaria	Importada		
	Norte Media ± DE (n=30)	Centro Media ± DE (n=40)	Sur Media ± DE (n=20)
Coliformes Totales NMP/g	1100.00±95.59 ^b	405.82±60.46 ^a	609.30±95.59 ^a
Coliformes Fecales NMP/g	222.75±69.48 ^b	19.90±43.94 ^a	7.15±69.48 ^a
Psicrótros UFC/g (log)	5.19±0.09 ^b	4.88±0.06 ^a	5.02±0.09 ^a

a,b,c Medias con letra diferente en una misma fila difieren significativamente P(< 0.05)

El Cuadro 5 muestra la relación existente entre la carne nacional e importada en las diferentes zonas geográficas con respecto a las cargas microbianas analizadas. La mayor carga (P<0.05) de coliformes totales se encuentra en las muestras de carne Nacional de la zona sur y las Importadas de la zona norte. Comparándolas con las demás, estas muestras de carne duplican la cantidad de coliformes totales con respecto a las demás. Es significativo observar que la carga de coliformes fecales de las muestras Nacionales de la zona centro y las Importadas de la zona centro y sur es significativamente menor (P<0.05) que en las demás muestras recolectadas. Las muestras Nacionales de la zona sur tuvieron el mayor (P<0.05) número de coliformes fecales. Las muestras de carne Nacionales de la zona sur mostraron mayor número de psicrótros (P<0.05) que las muestras restantes.

CUADRO 5

Calidad sanitaria de la carne de bovino, nacional e importada y las diferentes zonas geográficas

Calidad sanitaria	<u>Nacional</u>				<u>Importada</u>	
	Norte (n=30)	Centro (n=40)	Sur (n=20)	Norte (n=30)	Centro (n=40)	Sur (n=20)
Coliformes Totales NMP/g	586.72±67.59 ^a	503.90±78.05 ^{a,c}	1100.00±95.59 ^b	1100.00±95.59 ^b	405.82±60.46 ^c	609.30±95.59 ^{a,c}
Coliformes Fecales NMP/g	378.30±49.13 ^a	12.13±56.73 ^b	560.70±69.48 ^c	222.75±69.48 ^a	19.90±43.94 ^b	7.15±69.48 ^b
Psicrótrofos UFC/g (log)	4.98±0.06 ^a	4.85±0.07 ^a	5.94±0.09 ^b	5.19±0.09 ^c	4.88±0.06 ^a	5.02±0.09 ^{a,c}

a,b,c Medias con letra diferente en una misma fila difieren significativamente P(< 0.05)

1. Detección de *Staphylococcus aureus* y *E. coli* O157:H7

El estudio de la calidad bacteriológica de las muestras de carne incluyó la determinación de dos microorganismos patógenos de alta relevancia. *Staphylococcus aureus* fue determinado a través de técnicas convencionales y los resultados mostraron que ninguna muestra seleccionada contenía esta bacteria formadora de toxina. *Escherichia coli* O157:H7 fue investigado a través de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, y los resultados muestran que en ningún caso se pudo encontrar dicho microorganismo considerado actualmente emergente (Figura 7).

3. Características de Higiene de las Tiendas Seleccionadas

Otro objetivo fue conocer el estado de higiene que presentaban las entidades donde las muestras de carne se seleccionaban, para relacionar la influencia que tiene el estado de higiene de las tiendas, sobre la calidad sanitaria de las muestras, se realizaron análisis de frecuencias.

3.1. Análisis de Frecuencias

El análisis de frecuencias mostró que en el 94% de las tiendas (17), el estado general de limpieza y la higiene del personal fue bueno (Cuadro 6).

Otro de los aspectos que puede afectar la calidad sanitaria de la carne es la cercanía de la sección de carnes con respecto a las secciones de pescado, pollo, fruta y abarrotes. En el Cuadro 7 se puede observar que en el 61%% de las tiendas (7) las secciones de pescado y pollo se muestran a una distancia menor a 5 m y en un 72% (5) la sección de frutas y por último se observa que la sección de abarrotes se muestra a una distancia mayor a 5 m en la totalidad de las tiendas.

CUADRO 6

Frecuencias y porcentajes del estado general de limpieza y la higiene del personal de las tiendas

Estado general de limpieza	Frecuencia	Porcentaje
Bueno	17	94%
Regular	1	6%
Total	18	100%
Higiene del personal		
Bueno	17	94%
Regular	1	6%
Total	18	100%

Bueno = cumple totalmente con las buenas practicas de higiene y sanidad³⁰
Regular = cumple parcialmente³⁰

CUADRO 7

Frecuencias y porcentajes de la distancia de las secciones de pescado, pollo, frutas y abarrotes con respecto a la sección de carne de las tiendas

Sección de pescado	Frecuencia	Porcentaje
Sí	11	61%
No	7	39%
Total	18	100%
Sección de pollo		
Sí	11	61%
No	7	39%
Total	18	100%
Sección de frutas		
Sí	5	28%
No	13	72%
Total	18	100%

Sí = < de 5 metros de la sección de carne
No = > de 5 metros de la sección de carne

Al evaluar la presencia de suciedad en el 94% de las tiendas (17) no se observó y no se encontró olor desagradable (Cuadro 8).

CUADRO 8

Frecuencias y porcentajes de presencia de suciedad y olor desagradable en la sección de carne de las tiendas

Presencia de suciedad	Frecuencia	Porcentaje
Sí	1	6%
No	17	94%
Total	18	100%

Sí = presencia de suciedad y/o presencia de olor desagradable
No = ausencia de suciedad y/o ausencia de olor desagradable

Al evaluar los utensilios utilizados para el corte de la carne, tanto en su estado general como en su estado higiénico. Se encontró que en el 94% de las tiendas estaban en buen estado y en su totalidad se encontraron limpios (Cuadro 9).

CUADRO 9

Frecuencias y porcentajes del comportamiento de presencia de utensilios en mal estado y sucios en la sección de carne de las tiendas

Utensilios en mal estado	Frecuencia	Porcentaje
Sí	1	6%
No	17	94%
Total	18	100%

Sí = presencia de utensilios en mal estado y sucios
No = utensilios en buen estado y limpios

Al evaluar la carne empacada y fresca se observó que en todas las tiendas se encontraron en exhibidores cubiertos y sin contacto con otro producto (vegetales, pollo, pescado).

Por último, se tomaron temperaturas en los refrigeradores de donde se seleccionaba el producto y en el Cuadro 10 se observa que 17 tiendas (94%) se encontró dentro del rango permitido, es decir entre 0 y 4°C y solo 1 lo rebasa.

CUADRO 10

Frecuencias y porcentajes del comportamiento de temperatura de refrigerador de las tiendas

Temperatura de refrigerador (°C)	Frecuencia	Porcentaje
0°C	11	61%
1°C	2	11%
2°C	3	17%
4°C	1	5.5%
6°C	1	5.5%
Total	18	100%

*Rango recomendado para un buen almacenamiento 0 - 4°C

3. Correlación entre las variables de calidad sanitaria y los factores de riesgo en punto de venta

Por último, se evaluó la correlación existente entre las cargas microbianas examinadas en las muestras de carne obtenidas por las tres zonas seleccionadas del país con las características de higiene observadas en la tienda donde fueron adquiridas. Los resultados de correlación se muestran en el Cuadro 9. Existen correlaciones significativas ($P < 0.05$) para:

- a) Estado general de limpieza vs NMP/g CF y UFC/g Psicrótrofos.
- b) Cercanía de sección de pescado vs NMP/g CF y UFC/g Psicrótrofos.
- a) Cercanía de sección de pollo vs NMP/g CF y UFC/g Psicrótrofos.
- b) Cercanía de sección de frutas vs NMP/g CT y CF y UFC/g Psicrótrofos.
- c) Presencia de suciedad vs NMP/g CT.
- d) Utensilios en mal estado vs NMP/g CT y CF y UFC/g Psicrótrofos.
- e) Temperatura de refrigerador vs NMP/g CT.
- f) Coliformes Totales (NMP/g) vs NMP/g CF y UFC/g Psicrótrofos.
- g) Coliformes Fecales (NMP/g) vs UFC/g Psicrótrofos.

CUADRO 9

Correlación entre los factores de riesgo en punto de venta y los indicadores sanitarios de la carne

	9. CT ¹	10. CF ²	11. PSI ³
1. Estado general de limpieza	-0.07 <i>P</i> <0.34	0.23 <i>P</i> <0.0017	0.35 <i>P</i> <0.0001
2. Higiene del personal	-0.13 <i>P</i> <0.61	-0.11 <i>P</i> <0.1180	-0.09 <i>P</i> <0.2259
3. Sección de pescado	0.05 <i>P</i> <0.46	0.18 <i>P</i> <0.013	0.19 <i>P</i> <0.0078
4. Sección de pollo	0.05 <i>P</i> <0.46	0.43 <i>P</i> <0.0001	0.25 <i>P</i> <0.0007
5. Sección de fruta	0.40 <i>P</i> <0.0001	0.40 <i>P</i> <0.0001	0.25 <i>P</i> <0.0006
6. Presencia de suciedad	0.33 <i>P</i> <0.0001	-0.07 <i>P</i> <0.3269	-0.08 <i>P</i> <0.2727
7. Utensilios en mal estado	-0.20 <i>P</i> <0.0050	-0.57 <i>P</i> <0.0001	-0.78 <i>P</i> <0.0001
8. Temperatura de refrigerador	-0.22 <i>P</i> <0.0020	-0.09 <i>P</i> <0.22	-0.02 <i>P</i> <0.7074
9. Coliformes totales NMP/g		0.44 <i>P</i> <0.0001	0.43 <i>P</i> <0.0001
10. Coliformes Fecales NMP/g			0.57 <i>P</i> <0.0001

¹CT= coliformes totales NMP/g= número más probable / gramo

²CF= coliformes fecales NMP/g = número más probable / gramo

³PSI = psicrótrofos UFC/g= unidades formadoras de colonia/ gramo

DISCUSIÓN

En el presente estudio se encontró que la calidad bacteriológica de la carne de bovino que se adquiere en diferentes puntos de venta del país está influenciada por factores de riesgo de origen y venta.

Los resultados obtenidos en este estudio para el recuento de psicrótrofos (cuenta de bacterias aerobias en placa) se encontraron dentro del límite microbiológico establecido (10^6 UFC/g) en el proyecto de norma, PROY-NOM-SSA-194 y según el ICMSF; y para coliformes totales y fecales se encontraron por abajo del límite máximo establecido en la norma (NOM-SSA-145); y por lo tanto, la carne tiene calidad sanitaria aceptable.

1. CARNE NACIONAL VS IMPORTADA

Con el análisis bacteriológico realizado se encontró que la carne nacional tiene un conteo de coliformes fecales y psicrótrofos mayor ($P < 0.05$) al de la carne importada. Esto implica que el origen de la carne está influyendo en su calidad sanitaria. Cabe mencionar que en México la carne se obtiene a partir de dos tipos de régimen, uno en los rastros tipo inspección federal (TIF) donde la higiene se vigila más estrictamente y el otro es el régimen de rastros municipales donde la higiene está más descuidada. Alrededor del 80% del ganado en México se sacrifica en condiciones sanitarias inadecuadas, con un manejo poco humanitario de los animales y sin la infraestructura necesaria para mantener la cadena de frío. Esto se debe a que la mayor parte de los sacrificios tiene lugar en la propia granja o en los llamados rastros municipales. El 20% del ganado restante es sacrificado en rastros TIF; donde se dispone de instalaciones adecuadas y personal capacitado para el sacrificio de los animales y manejo de la carne (Villanueva y Aluja, 1998).

En el 2001 se sacrificaron 1.2 millones de cabezas en rastros TIF, lo que representa poco más del 40% de la capacidad instalada. La

principal causa de este comportamiento se debe a que el costo de sacrificio por animal en rastros TIF es entre 30 y 50% mayor que en los rastros municipales (Lastra y Galarza, 1998; Gallardo *et al.*, 2002).

Aunque en las tiendas la generalidad es que el 100 % de la carne proviene de rastros TIF en donde hay un mayor control sanitario se encontró mayor carga microbiana en la carne nacional.

En los EEUU, los rastros en general guardan unas condiciones de higiene estrictamente vigiladas. Existen 850 plantas en EEUU operando bajo la Inspección Federal y más de 2,200 plantas bajo la inspección Estatal. (NASS, 2004). Cerca del 95% del total de rastros en EEUU para cualquier especie está bajo (1) Inspección Federal (FI), son plantas que transportan carne interestatal donde deben emplear a los inspectores federales para asegurar que se cumpla con las normas de USDA. Otro tipo es (2) Talmedge-Aiken (TA) plantas de sacrificio en las que USDA es responsable para la inspección. Sin embargo, la inspección federal es llevada a cabo por empleados Estatales. Se considera que estas plantas son inspeccionadas federalmente. (3) Inspección No Federal (NFI) son Plantas que venden y transportan sólo a nivel interestatal; los inspectores estatales aseguran cumplir con las normas del Estado y es considerado sacrificio de la granja; (4) Finalmente las Plantas Custom-Exempt son plantas que no se inspeccionan los animales y no venden carne y deben considerar normas de salud. También a éstos son considerados NFI. Por lo anterior el control en EEUU es más estricto y probablemente por eso, los resultados encontrados en este estudio, favorecen la calidad de carne importada; pero a pesar de mostrar la carne nacional mayor carga microbiana, la presencia de psicrótrofos, coliformes totales y fecales, no son un riesgo directo a la salud y solo indican falta de higiene; además son responsables de la descomposición de alimentos, por lo que disminuyen su vida útil y aceptabilidad sanitaria. Los psicrótrofos son utilizados para predecir la estabilidad del producto bajo diferentes condiciones de almacenamiento por lo que ayudan a predecir la vida útil de un alimento conservado en refrigeración por debajo de los 5°C. La

presencia de coliformes totales no implican necesariamente, contaminación fecal, indican falta de higiene en el proceso; la presencia de coliformes fecales en un alimento sí indica una contaminación directa o indirecta de origen fecal; sin embargo, su presencia no constituye directamente la presencia de un patógeno, sino que implica únicamente un cierto riesgo de que pudiera estar presente. (ICMSF. Microorganismos de los alimentos 1 y 2, 2000; Vanderzant, 1989; inppaz, 2002; Adams, 1998; Jay, 1994).

2. INFLUENCIA DE LAS ZONAS GEOGRAFICAS DEL PAIS

Esta investigación también mostró haber diferencia significativa ($P < 0.05$) entre las zonas geográficas, observando menor carga microbiana ($P < 0.05$) en la zona centro, indicando que la higiene en esta zona es mejor que en la zona norte y sur. Por otra parte, en un estudio realizado por Villanueva y Aluja (1998), sobre el estado de algunas plantas de sacrificio de animales para consumo humano en México mostraron que las plantas TIF visitadas operaban correctamente de acuerdo con la legislación vigente; contrariamente, la situación encontrada en los rastros particulares visitados fue muy heterogénea, algunos trabajaban bajo estándares de una planta TIF, mientras que otros laboran de manera similar que los rastros municipales. En la mayoría de los rastros municipales visitados en las zonas centro y sur del país, la situación es caótica, mientras que en la zona norte, las condiciones fueron aceptables. El resultado obtenido indicando en la zona centro mejor higiene se asemeja al estudio realizado por Pérez *et al.*, (1999) en la Ciudad de México, donde analizaron carne al menudeo de diferentes especies animales, microorganismos indicadores (coliformes y psicrótrofos) entre dichas especies la de bovino, encontrando las cuentas microbianas dentro de los límites legales a pesar de haber almacenado la carne durante cinco días a 4°C. Esto no fue observado en las demás especies evaluadas.

3. FACTORES DE RIESGO EN PUNTO DE VENTA

El comportamiento de los factores de riesgo en punto de venta en las zonas del país mostró que el estado general de limpieza de las tiendas de la zona norte y sur es bueno y se encontró correlación con coliformes fecales NMP/g y psicrótrofos UFC/g, microorganismos indicadores de la falta de higiene. Por otra parte, la higiene del personal de las tiendas donde se adquirieron las muestras de carne importadas mostró homogeneidad en las tres zonas, a diferencia de la que se observó en el personal de las tiendas en donde se adquirieron muestras de carne nacionales en las cuales, la higiene del personal es menos adecuada en la zona centro. En cuanto a las distancias de las diferentes secciones, se consideró en la mayoría de las tiendas como aceptables y con una correlación de las secciones con NMP/g de coliformes totales y fecales y UFC/g de psicrótrofos, por ser estos indicadores de la falta de higiene y ser responsables de la descomposición de alimentos, ya que disminuyen su vida útil y aceptabilidad sanitaria. Otra correlación que se obtuvo en esta investigación fue la de presencia de suciedad (restos de carne, mugre) con NMP/g de coliformes totales microorganismos indicadores de higiene y que también pueden encontrarse en el suelo.

La ausencia de olor desagradable fue homogénea en todas las tiendas donde se obtuvieron las muestras tanto nacionales como importadas; así como tampoco se observaron utensilios sucios en las tiendas de las tres zonas indicando buenas prácticas de higiene. La carne no se encontró en contacto con algún otro producto (vegetales, pescados aves) mostrando poca posibilidad de contaminación cruzada. También se pudo observar que la carne se encontró en exhibidores adecuados en todas las tiendas y con temperatura de refrigeración no controlada, rebasando el rango aceptable para su conservación en una tienda de la zona centro de muestras nacionales e importadas y mostrando correlación con NMP/g de coliformes totales.

4. DETECCION DE PATOGENOS

En cuanto a las UFC/g de *Staphylococcus aureus*, no se encontró un valor significativo en ninguna muestra de carne nacional o importada en el mercado formal mexicano, los resultados obtenidos estuvieron muy por debajo del límite máximo (1000 UFC/g) en carne fresca refrigerada en expendios (Proyecto de Norma Oficial Mexicana 194-SSA1-2000) esto es importante, ya que la carne cruda puede contener *S. aureus*, en pequeñas cantidades indicando contaminación procedente de vías orales, nasales y piel de los manipuladores de alimentos, así como también el material y equipo sucio pueden ser fuentes de contaminación. Esto nos sugiere que el personal que manipula el producto cumple con buenas prácticas de higiene. (ICMSF. Microorganismos de los alimentos 1(2000) y 5 (1996); Vanderzant, 1989; inppaz, 2002; Adams, 1998; Jay, 1994).

En un estudio realizado por Narasimha y Ramesh, (1988) se examinó carne fresca para la calidad microbiológica y vida de almacén mostrando que la carne obtenida de las tiendas locales al menudeo presentó cuentas microbianas altas de *S. aureus* y mesófilos aerobios. En Australia, Scriven y Singh, (1986) realizaron un estudio de comparación de poblaciones microbianas de carne de res al menudeo y carne de cerdo, las poblaciones de coliformes y *S. aureus* fueron más altas en carnes desmenuzadas en ambas especies.

Considerando que las enfermedades transmitidas por alimentos es uno de los problemas más serios en salud pública hoy en día y *Escherichia coli* O157:H7 es capaz de producir enteritis hemorrágica, que puede complicarse con el síndrome hemolítico urémico; esta complicación, se da en particular en los niños y presenta una elevada letalidad. La transmisión a través de los alimentos y la capacidad de producir brotes epidémicos junto a la gravedad de las complicaciones de las enteritis confieren a este microorganismo una gran importancia en salud pública. La enfermedad se transmite por vía fecal-oral y el vehículo más frecuente de infección humana es la carne de bovino,

fundamentalmente las hamburguesas poco cocidas. en este estudio se determinó *Escherichia coli* O157:H7 por la técnica de PCR, método preciso, capaz de detectar pequeñas cantidades de ADN del microorganismo específico lo que la hace una prueba de elección en la industria de los alimentos; un patógeno importante que afecta al consumidor y a la industria de los alimentos (ICMSF. Microorganismos de los alimentos 5, 1996; Inppaz, 2002; Adams, 1998), los resultados obtenidos en la totalidad de las muestras de carne fueron ausencia de dicho patógeno, siendo esto una respuesta positiva para carne nacional e importada que se comercializa en el mercado formal mexicano, esto nos sugiere que la inocuidad está garantizada en este producto. En otro trabajo similar en Europa en donde realizaron pruebas para la detección de *E. coli* O157:H7 en diferentes productos de carne de bovino y las muestras fueron tomadas de supermercados, mercados y carnicerías; encontraron muestras positivas provenientes solamente de carnicerías y mercados. Por lo que nos lleva a enfatizar que el control para microorganismos patógenos en supermercados es confiable (Stampi *et al.*, 2004). Por otra parte, en un estudio realizado por Callaway *et al.*, (2004) con respecto a la prevalencia de *E. coli* O157:H7 en ganado bovino y en cerdos en el Centro de México en Octubre de 2001, encontró solo el 1.25% en ganado bovino y 2.1% en cerdos. Mostrando una prevalencia baja y podría relacionarse a la prevalencia baja en humanos en México.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados de los indicadores sanitarios, se puede inferir que la calidad sanitaria de la carne de bovino de origen nacional e importada que se adquiere en diferentes puntos de venta del país está influenciada por factores de riesgo de origen y venta; aunque los resultados se encontraron por debajo del límite máximo establecido, la mayor carga microbiana se encontró en la carne de origen nacional, revelando la diferencia en el control sanitario entre los rastros de México y de los EEUU. Este resultado nos permite recomendar a las plantas de sacrificio en México para que lleven a cabo acciones más estrictas que ayuden a fortalecer los programas de Buenas Prácticas de Higiene y Sanidad. Con relación a las tiendas del país se puede señalar que tienen un estado general de higiene y del personal aceptable, así como también un adecuado control en la temperatura y utensilios en la sección de carnes, por lo que nos lleva también a sugerir que el producto estuvo sujeto a Buenas Prácticas de Higiene y Sanidad en el punto de venta.

Por otra parte, no se encontró *Escherichia coli* O157:H7 bacteria patógena para el hombre que desarrolla síntomas gastroéntéricos y que actualmente tiene importancia en enfermedades transmitidas por alimentos. Esto nos puede sugerir confianza de la carne de bovino en el mercado formal de la República Mexicana por ser higiénicamente aceptable e inocua.

LITERATURA CITADA

1. Abram, SB. Manual para el control de las enfermedades transmisibles. Decimo sexta, Ed. Organización Panamericana de la Salud (OPS), 1997.
2. Aluja AS, Pasch LM, Méndez D, Uruchurtu AM. 1974. Higiene, sacrificio y desperdicio en algunos rastros del país. *Veterinaria México* 5:105-114.
3. Adams MR. Microbiología de los alimentos. Zaragoza, España: Aribia, 1997.
4. Callaway TR, Anderson RC, Tellez G, Rosario C, Nava GM, Eslava C, Blanco MA, Quiroz MA, Olguin, Herradora M, Edrington TS, Genovese KJ, Harvey RB, Nisbet DJ. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle and swine in central Mexico. *J Food Prot* 2004 Oct 67 (10): 2274-6.
5. Cebula TA, Payne, WL, Feng P. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. 1995. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 248-50.
6. Elmerdahl JO. DNA-based methods for detection of food-borne bacterial pathogens. 2000. *Food Research International*. 33:257-266.
7. Erlich HA. PCR technology, principles and applications for DNA amplification. USA: Oxford University Press, 1992.
8. Fischer, A. Schmidhofer, T.: Tecnología e Higiene de la Carne. Editorial Acribia, Zaragoza, España, 1994.
9. Feng, P., Monday, S.R., Multiplex PCR for detection of trait and virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. *Molecular and Cellular Probes* (2000).
10. Feng P. 1993. Identification of *Escherichia coli* serotype O157:H7 by DNA probe specific for an allele of uid A gene. *Molecular and Cellular Probes*. 7: 151-154.

11. Gallardo NJL, García BCM, Albarrán DM, Leiner MA, Ochoa BR, Ortega RC. 2002 Situación actual de la producción de carne de bovino en México. *Claridades Agropecuarias* 109: 3-32.
12. García López Esperanza. Detección de *Salmonella* spp., y *Escherichia coli* en canales de bovino usando un iniciador múltiple con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). 2002. Tesis de Maestría.
13. Gilbert, C. Winters, D. Development of a triplex PCR assay for the specific detection of *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., and *Escherichia coli* O157:H7. *Molecular and Celular Probes*. 2003.
14. Harris LJ and Griffiths MW. The detection of foodborne pathogens by the polymerase chain reaction. *Food Research Int* 1992, 25:457 – 459.
15. ICMSF. Microorganismos de los alimentos 2. Métodos de muestreo para análisis microbiológico: Principios y aplicaciones especificadas. 2da Ed. Zaragoza, España: Acribia, 2000.
16. ICMSF. Microorganismos de los alimentos 1. Su significado y métodos de enumeración. 2da. Ed. The International Commission on Microbiological Specifications for foods. Zaragoza, España: Acribia, 2000.
17. ICMSF. Micoorganisms in foods 5. Microbiological Specifications of food pathogens. The Internacional Commosion on Microbiological Specifications for Foods. Great Britain, 1996.
18. ICMSF. Microorganisms in Food 6. Microbial Ecoligy Of Food Commodities. 1998.
19. Instituto Panamericano de Protección de Alimentos. www.inppaz.org.ar
20. Kary B. Mullis y Fred A. Specific Synthesis of DNA in vitro via a polymerase-Catalyzd chain reaction. *Methods in Enzymology*, vol. 155, 335-350.
21. Lastra MIJ, Galarza JM. 1998 Situación actual y perpectivas de la producción de carne de bovino en México. SAGAR, México.
22. Letner M, Bishop T. 1986. Experimental design and analysis. Valley Book Company. Blacksburg, 563 pp.

23. Malorny B, Panayotis TT, Peter R, Cook N, Wagner M, Hoorfar J. 2003. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*. 83: 39-48.
24. Memorias del VII Curso de actualización en higiene y calidad de la carne. Departamento de Medicina Preventiva y Salud y Pública, FMVZ-UNAM, 2002.
25. Moreno, BV. Díaz, M.: Microorganismos de los alimentos 1. Técnicas de V análisis microbiológico. ICMSF, editorial Acirbia, Zaragoza España, 1983.
26. Narasimha D, Ramesh BS. 1988. Microbial profiles of minced meat. *Meat Science*. 23: 279-291.
27. National Agricultural Statistics Service (NASS), Agricultural Statistics Board, U.S. Department of Agriculture. December, 2004.
28. Norma Oficial Mexicana NOM-092- SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Publicada en el Diario Oficial de la Federación. 12 de Diciembre, 1995.
29. Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis bacteriológico. Muestras sólidas. México D.F., 1994.
30. Norma Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994, Bienes y servicios. Métodos para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos.
31. Norma Oficial Mexicana. NOM-120-SSA1-1994. Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad para el proceso de alimentos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas.
32. Norma Oficial Mexicana NOM-145-SSA-1-1995, Productos cárnicos troceados y curados. Productos cárnicos curados y madurados..
33. Norma Oficial Mexicana NOM – 122 -SSA1-1994, bienes y servicios. Productos en la carne. Productos cárnicos curados y cocidos y curados emulsionados y cocidos. Especificaciones sanitarias. Secretaría de Salud (Health Secretariat, Mexico) (1997) Norma Oficial Mexicana para especificaciones sanitarias para carnes rojas,

- refrigeradas y congeladas NOM-000-SSA1-1995. México: Secretaría de Salud.
34. Proyecto de Norma. PROY-NOM-194-SSA1-2000. Bienes y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al faenado de animales para abasto, corte, deshuese, envasado, almacén y expendio. Especificaciones sanitarias de productos.
 35. Pascual, AMR.: Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas. Madrid, España, 1992.
 36. Pérez ML, Rodríguez SGM, Lara CP, Guerrero I. Microbial spoilage of meats offered for retail sale in Mexico City. *Meat Science* 51 (1999) 279-282.
 37. SAGARPA. Secretaría de agricultura, ganadería, pesca y alimentos, 1999. www.sagarpa.gob.com.mx.
 38. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning a Laboratory Manual*. USA: Coldspring harbord laboratory Press, 1989.
 39. SAS Institute: *SAS/STAT guide for personal computers*. Versión 6.0 2001 ed. Cary (NC): SAS Institute Inc., 2001.
 40. Secretaría de Salud. *Manual de prácticas. Curso Toma y Manejo de Muestras para Análisis Bacteriológico*. México, D.F., Subsecretaría de Regulación y Fomento Sanitario. Laboratorio Nacional de Salud Pública, 1992.
 41. Secretaría de Salud. *Manual de Técnicas y Procedimientos para el Análisis Microbiológico de Productos Cárnicos*.
 42. Scriven FM, Singh R. 1986. Comparison of the microbial populations of retail beef and pork. *Meat Science*. 18: 173-180.
 43. Silhavy, T. Berman, M. and Enquist, J.: *Experiments with gene fusions*. Cold Spring Harbor Laboratory, USA, 1984.
 44. Stampi S, Caprioli A, De Luca Giovanna, Quaglio P, Sacchetti R, Zanetti F. 2004. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine meat products in northern Italy. *International Journal of Food Microbiology*. 90: 257-262.

45. Vanderzant C, Acuff GR. Basic Processed Food Inspection. Department of Animal Science Texas A&M University College Station, TX. 1989.
46. Villanueva MV, Aluja As. 1998. Estado actual de algunas plantas de sacrificio de animales para consumo humano en México. Veterinaria México, 29(3): 273-278.
47. Wachter, R. Ma. C :Planes de muestreo y criterios microbiológicos. V Curso de Higiene y Calidad de la carne, FMVZ. UNAM. División de Educación Continua, Departamento de Medicina Preventiva, OPS, SSA. 28 de agosto al 9 de septiembre de 2000.
48. Yoshitomi KJ, Jinneman KC, Weagant SD. 2003. Optimization of a 3'-minor groove binder-DNA probe targeting the *uid A* gene for rapid identification of *Escherichia coli* O157:H7 using real-time PCR. Molecular and Cellular Probes, 17:257-280.

ANEXO 1

FORMULARIO

Factores de riesgo asociados con la calidad sanitaria y comercial de la carne de bovino nacional e importada, en puntos de venta.

OBJETIVO

Identificar los factores de riesgo asociados con la calidad sanitaria y comercial, de la carne de bovino nacional e importada, en puntos de venta de diferentes ciudades de las zonas norte, centro y sur de la República Mexicana.

NOMBRE OBSERVADOR: _____ FECHA: _____

DATOS SOBRE LA TIENDA

1. CIUDAD:
2. CADENA COMERCIAL:
3. NOMBRE DEL Centro COMERCIAL:
4. ¿QUÉ TIPO DE TIENDA ES?
 - a. MEGA O BODEGA
 - b. ESTÁNDAR
 - c. MINI "SUPER"
5. ¿EN QUÉ ZONA SOCIOECONÓMICA SE ENCUENTRA UBICADA?
 - a. ZONA ALTA
 - b. ZONA MEDIA
 - c. ZONA BAJA
6. ¿CUÁL ES EL ESTADO GENERAL DE LIMPIEZA EN LA TIENDA?
 - a. BUENO
 - b. REGULAR
 - c. MALO
7. ¿CUÁL ES EL ASPECTO HIGIÉNICO DEL PERSONAL QUE TRABAJA CON LOS ALIMENTOS? (PARTICULARMENTE EN LA SECCIÓN DE CARNES Y AVES)
 - a. BUENO
 - b. REGULAR
 - c. MALO
8. LA SECCIÓN DE CARNES ESTÁ UBICADA CERCA DE:
() VENTA DE PESCADO Y MARISCOS
() VENTA DE FRUTAS Y HORTALIZAS
() OTRA, ESPECIFIQUE CUÁL: _____

9. ¿CÓMO CONSIDERA LA UBICACIÓN DE LA SECCIÓN DE CARNES?

- a. BUENA
- b. REGULAR
- c. MALA

10. EN LA SECCIÓN DE CARNES,

- a. ¿SE DETECTA OLOR DESAGRADABLE? SÍ NO
- b. ¿SE OBSERVA SUCIEDAD? SÍ NO
() POLVO
() MUGRE
() RESTOS DE CARNE
() COCHAMBRE
- c. ¿SE OBSERVAN UTENSILIOS SUCIOS? SÍ NO
- d. ¿SE OBSERVAN UTENSILIOS EN MAL ESTADO? SÍ NO

11. ¿SE ENCUENTRA LA CARNE FRESCA EN EXHIBIDORES CUBIERTOS?

SÍ NO

12. ¿SE ENCUENTRA LA CARNE EMPACADA EN EXHIBIDORES CUBIERTOS?

SÍ NO

13. PRODUCTOS EN CONTACTO CON LA CARNE.

a. CARNE CRUDA Y COCIDA SÍ NO

b. VERDURAS PARA SEPARACIÓN O COMO DECORACIÓN
SÍ NO

Resultados de *Escherichia coli* O157:H7

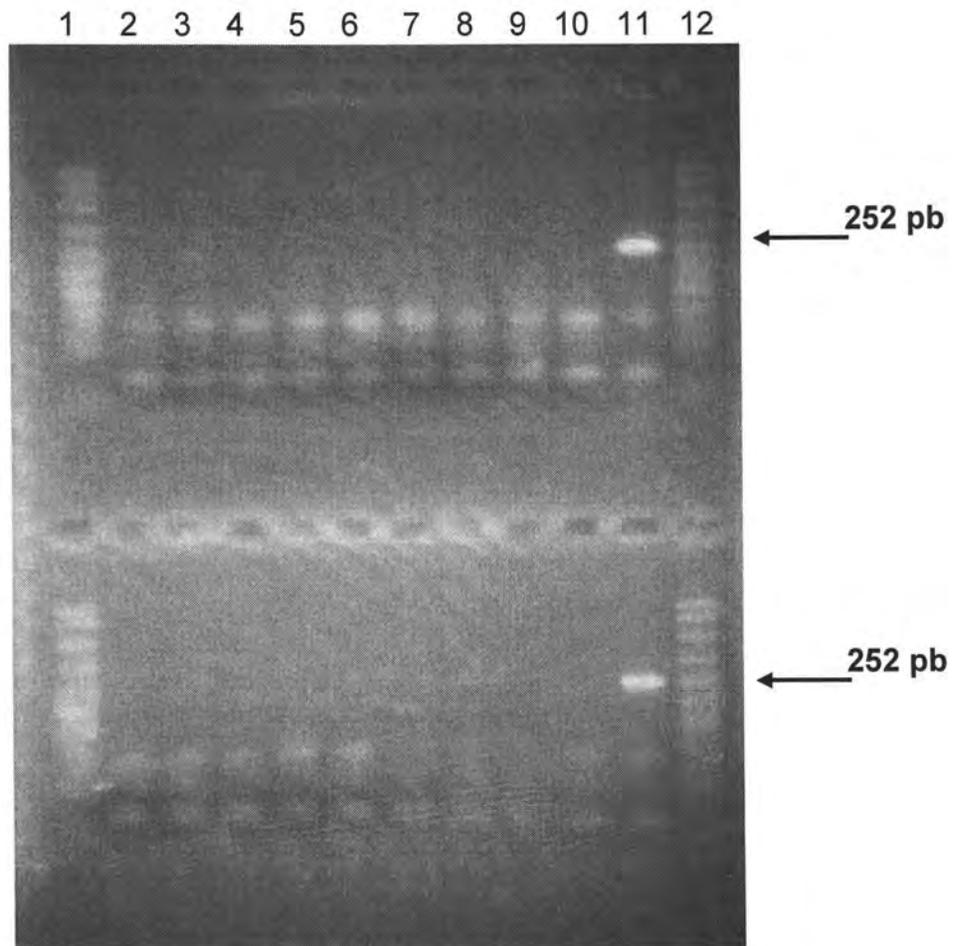


Figura 7. Resultado negativos de *E. coli* O157:H7. Carril 1 y 12 marcador de peso molecular (pBR 322 DNA Digest I). Carril 2 al 10 resultado de muestras de ADN no amplificado. Carril 11 control positivo de *E. coli* O157:H7.