

01674



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

"DETECCIÓN DE *Listeria monocytogenes*,
Salmonella spp y *Yersinia enterocolitica*, EN
CARNE DE RES EN PUNTO DE VENTA
MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA (PCR)"

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO EN MAESTRO EN
CIENCIAS

PRESENTA

JOSÉ FERNANDO MARTÍNEZ BRUNO

TUTOR:

DRA. MARÍA DE LA SALUD RUBIO LOZANO

COMITÉ TUTORAL

DRA. CRISTINA ESCALANTE OCHOA
MC. MARIA DE LOS ANGELES VALDIVIA LÓPEZ

MEXICO D.F.

2005

M: 350067



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIAS

- A JESUCRISTO por permitirme entender la vida y accederme estar en ella.
- A MI MADRE. Mil gracias por tu ayuda incondicional brindada en toda mi vida.
- A MIS HERMANOS Y CUÑADOS. Más por los buenos momentos que los malos que hemos convivido.
- A MIS SOBRINOS. Ingrid, Bryan, Fany, Alex y Ari que nos brindan alegría y esperanza para afrontar esta vida.
 - Al sacrificio y esfuerzo desarrollado en esta etapa de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

- A la UNAM-FMVZ por permitirme acceder a un posgrado.
- A la Dra. Maria de la Salud Rubio Lozano por su apoyo y confianza a mi persona.
- Al Dr. Francisco Suárez G. por permitirme trabajar en la sección de Brucellosis del Depto. de Microbiología e Inmunología.
- Al MC Rigoberto Hernández Castro por su apoyo y asesoría incondicional para la finalización de la investigación. Mil millones de gracias.
- Al Comité tutorial por sus críticas constructivas y comentarios hacia el trabajo.
 - A la QPB Carolina Castro Mtz. Gracias por tu apoyo y asesoría desinteresada. Muchas gracias.
- A la MC. Elizabeth Flores C. Gracias por tu apoyo y amistad brindada en esta difícil etapa de nuestra vida académica.
 - A PAPIIT por el financiamiento al proyecto.
 - A CONACYT por su apoyo mediante la facilitación de una beca.
- Al laboratorio de Medicina Preventiva y Salud Pública por el uso de sus instalaciones y equipo para la realización de la etapa de enriquecimiento.
- Al laboratorio de Genética Molecular por el uso de sus instalaciones y equipo para la realización de la etapa de extracción de ADN.

INDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN..... | 1 |
| SUMMARY..... | 2 |
| 1. INTRODUCCION..... | 3 |
| 1.2. ANTECEDENTES..... | 4 |
| 1.2.1. Calidad microbiológica de la carne bovina..... | 4 |
| 1.2.2. Fuentes de contaminación de la carne bovina..... | 5 |
| 1.2.2.1. Contaminación exógena..... | 5 |
| 1.2.2.2. Contaminación endógena..... | 7 |
| 1.2.2.3. Tipos bacterianos contaminantes en la canal bovina..... | 7 |
| 1.3. Infraestructura de sacrificio y transformación primaria de la carne bovina en México..... | 8 |
| 1.4. Calidad sanitaria de la carne bovina en los Estados Unidos de América (EUA)..... | 10 |
| 1.5. Consumo de carne bovina en México..... | 12 |
| 1.6. Origen de la carne bovina consumida en México..... | 13 |
| 1.7. Sistemas de comercialización de la carne bovina en México..... | 13 |
| 1.8. Situación epidemiológica de <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella spp</i> y <i>Y. enterocolitica</i> en México..... | 14 |
| 1.9. Epidemiología de las ETA en los EUA..... | 16 |
| 1.10. Impacto económico de las ETA en los EUA..... | 18 |
| 1.11. Métodos de detección de patógenos bacterianos en alimentos..... | 18 |
| 1.11.1. Métodos Convencionales o Microbiológicos Estándar..... | 19 |
| 1.11.2. Inmunoensayo enzimático (ELISA)..... | 19 |
| 1.11.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)..... | 20 |

| | |
|--|----|
| 2. JUSTIFICACION..... | 22 |
| 3. OBJETIVO GENERAL..... | 22 |
| 4. MATERIAL Y METODOS | |
| 4.1. Diseño del experimento..... | 23 |
| 4.1.1. Característica de la muestra de campo..... | 23 |
| 4.1.2. Muestreo..... | 24 |
| 4.1.3. Selección de puntos de venta..... | 24 |
| 4.2. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento..... | 25 |
| 4.3. Extracción de ADN bacteriano a partir de cultivos puros bacterianos..... | 26 |
| 4.4. Selección de los oligonucleótidos..... | 27 |
| 4.5. Determinación de las condiciones de la PCR..... | 29 |
| 4.5.1. Detección límite de la PCR empleando ADN Puro bacteriano..... | 30 |
| 4.5.1.1. Condiciones de la PCR..... | 30 |
| 4.5.2. Detección límite de UFC por la PCR empleando cultivos puros bacterianos..... | 31 |
| 4.5.2.1. Condiciones de la PCR..... | 32 |
| 4.5.3. Detección límite de UFC por la PCR empleando cultivos con carne bovina inoculada artificialmente con <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. typhimurium</i> y <i>Y. enterocolitica</i> | 34 |
| 4.5.3.1. Condiciones de la PCR..... | 36 |
| 4.6. Adquisición y procesamiento de muestras de milanesa de res en punto de venta..... | 38 |
| 5. RESULTADOS | |
| 5.1. Límite de detección de la PCR empleando ADN puro bacteriano..... | 41 |
| 5.1.1. Límite de detección de la PCR empleando ADN puro de <i>L. monocytogenes</i> | 41 |
| 5.1.2. Límite de detección de la PCR empleando ADN puro de <i>Salmonella spp</i> | 42 |

| | |
|---|----|
| 5.1.3. Límite de detección de la PCR empleando ADN puro de <i>Y. enterocolitica</i> | 42 |
| 5.2. Límite de detección de UFC por la PCR empleando cultivos puros bacterianos..... | 43 |
| 5.2.1. Límite de detección de UFC por la PCR empleando cultivos puros de <i>L. monocytogenes</i> | 43 |
| 5.2.2. Límite de detección de UFC por la PCR empleando cultivos puros de <i>Salmonella spp</i> | 44 |
| 5.2.3. Límite de detección de UFC por la PCR empleando cultivos puros de <i>Y. enterocolitica</i> | 44 |
| 5.3. Límite de detección de UFC por la PCR empleando cultivos con carne bovina inoculada artificialmente con <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. typhimurium</i> y <i>Y. enterocolitica</i> | 45 |
| 5.3.1. Límite de detección de UFC por la PCR empleando cultivos con carne bovina inoculada artificialmente con <i>L. monocytogenes</i> | 45 |
| 5.3.2. Límite de detección de UFC por la PCR empleando cultivos con carne bovina inoculada artificialmente con <i>Salmonella spp</i> | 45 |
| 5.3.3. Límite de detección de UFC por la PCR empleando cultivos con carne bovina inoculada artificialmente con <i>Y. enterocolitica</i> | 46 |
| 5.4. Detección de <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella spp</i> y <i>Y. enterocolitica</i> en milanesa de res en punto de venta..... | 47 |
| 5.4.1. Detección de <i>L. monocytogenes</i> en muestras de milanesa de res en punto de venta..... | 47 |
| 5.4.2. Detección de <i>Salmonella spp</i> en Muestras de milanesa de res en punto de venta..... | 49 |
| 5.4.3. Detección de <i>Y. enterocolitica</i> en Muestras de milanesa de res en punto de venta..... | 51 |
| 6. DISCUSION..... | 53 |
| 7. CONCLUSIONES..... | 60 |
| 8. REFERENCIAS..... | 61 |

INDICE DE CUADROS.

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Métodos de detección de patógenos utilizados en alimentos..... | 21 |
| Cuadro 2. Distribución y número de muestras por ciudad..... | 24 |
| Cuadro 3. Características de selección de colonias bacterianas puras..... | 26 |
| Cuadro 4. Oligonucleótidos utilizados en este estudio..... | 29 |
| Cuadro 5. Condiciones de incubación..... | 35 |
| Cuadro 6. Porcentaje de positividad de <i>L. monocytogenes</i> en muestras de milanesa de res en punto de venta..... | 48 |
| Cuadro 7. Porcentaje de positividad de <i>L. monocytogenes</i> por ciudad..... | 49 |
| Cuadro 8. Porcentaje de positividad de <i>Salmonella spp</i> en muestras de milanesa de res en punto de venta..... | 50 |
| Cuadro 9. Porcentaje de positividad de <i>Salmonella spp</i> por ciudad..... | 50 |
| Cuadro 10. Porcentaje de positividad de <i>Y. enterocolitica</i> en muestras de milanesa de res en punto de venta..... | 52 |
| Cuadro 11. Porcentaje de positividad de <i>Y. enterocolitica</i> por ciudad..... | 52 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Diagrama de flujo para la extracción de ADN bacteriano..... | 28 |
| Figura 2. Diagrama de flujo para la determinación del límite de detección de UFC por la PCR empleando cultivos puros bacterianos | 33 |
| Figura 3. Diagrama de flujo para la determinación del límite de detección de UFC por la PCR empleando cultivos con carne inoculada artificialmente con <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. typhimurium</i> y <i>Y. enterocolitica</i> | 37 |
| Figura 4. Diagrama de flujo para la detección de <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. typhimurium</i> y <i>Y. enterocolitica</i> en muestras comerciales (milanesa de res) procedente de supermercados..... | 40 |
| Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% donde muestra DNA puro extraído de cultivos puros bacterianos..... | 41 |
| Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde muestra el límite de detección de ADN puro de <i>L. monocytogenes</i> | 42 |
| Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde muestra el límite de detección de ADN puro de <i>S. typhimurium</i> | 42 |
| Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde muestra del límite de detección de ADN puro de <i>Y. enterocolitica</i> | 43 |
| Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde muestra el límite de detección de UFC empleando Cultivos Puros de <i>L. monocytogenes</i> | 43 |
| Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde muestra el límite de detección de UFC empleando cultivos puros de <i>S. typhimurium</i> | 44 |
| Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde muestra el límite de detección de UFC empleando cultivos puros de <i>Y. enterocolitica</i> | 44 |
| Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde muestra el límite de detección de UFC empleando cultivos con carne bovina inoculada artificialmente con <i>L. monocytogenes</i> | 45 |
| Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde muestra el límite de detección de UFC empleando cultivos con carne bovina inoculada artificialmente con <i>S. typhimurium</i> | 46 |
| Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde muestra el límite de detección de UFC empleando cultivos con carne inoculada artificialmente con <i>Y. enterocolitica</i> | 46 |
| Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1% donde muestra ADN extraído en muestras de milanesa de res..... | 47 |
| Figura 16-A. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde muestra los resultados positivos a <i>L. monocytogenes</i> en milanesa de res mediante la PCR..... | 47 |
| Figura 16-B. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde muestra los resultados positivos a <i>L. monocytogenes</i> en milanesa de res mediante la PCR..... | 48 |
| Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde muestra los resultados positivos a <i>Salmonella spp</i> en milanesa de res mediante la PCR..... | 49 |
| Figura 18-A y 18-B. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde muestra los resultados positivos a <i>Y. enterocolitica</i> en milanesa de res mediante la PCR..... | 51 |

“Causa mucho mejor efecto que los demás descubran tus cualidades sin tu ayuda”.

Judith Martín

“Donde hay soberbia, allí habrá ignorancia, más donde hay humildad habrá sabiduría”

Salomón

RESUMEN

José Fernando Martínez Bruno. "Detección de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Yersinia enterocolitica*, en carne de res en punto de venta mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)".

Bajo la dirección de la Dra. María de la Salud Rubio Lozano.

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) constituyen un problema importante en el área de Salud Pública aunado al impacto económico que provocan. La aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la detección de patógenos bacterianos ha sido empleado por su alta especificidad y sensibilidad en distintas matrices biológicas como la carne. El objetivo del presente trabajo fue detectar la presencia de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Yersinia enterocolitica* en cortes comerciales de carne de origen bovino (milanesa de res), distribuida en punto de venta en supermercados de las ciudades del Distrito Federal, Monterrey y Villahermosa, México. Se realizaron tres ensayos de límite de detección o mínima cantidad detectable con el propósito de establecer las condiciones adecuadas de la PCR. Los ensayos fueron: 1) empleando ADN puro bacteriano, donde el límite de detección fue 0.625 fg/μl para *L. monocytogenes* equivalente a 0.2 genomas, 2.08984 fg/μl para *S. typhimurium* equivalente a 0.4 genomas y 0.78125 fg/μl para *Y. enterocolitica* equivalente a 0.16 genomas, 2) empleando cultivos puros bacterianos, donde la mínima cantidad detectable fue 0.3 UFC/ml para *L. monocytogenes*, 0.005 UFC/ml para *Salmonella spp* y 0.2 UFC/ml *Y. enterocolitica*; y, 3) empleando cultivos con carne inoculada artificialmente, donde la mínima cantidad detectable fue de 30 UFC/g para *L. monocytogenes*, 10 UFC/g para *S. typhimurium* y 18 UFC/g para *Y. enterocolitica*. Se seleccionó las condiciones de la PCR del ensayo 3 para el análisis de las muestras de campo. Se adquirieron 90 muestras comerciales de milanesa de res en punto de venta de supermercados. Del total del muestreo se detectaron 25 muestras positivas a *L. monocytogenes*, 8 para *Salmonella spp* y 26 para *Y. enterocolitica* que representan el 27.78, 8.89 y 28.89% de positividad, respectivamente. El ensayo de la PCR demostró la presencia de *L. monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Y. enterocolitica* en milanesa de res, por lo que estos resultados sugieren un posible riesgo en la salud del consumidor final o en grupos poblacionales de alto riesgo debido a la existencia potencial de la mínima dosis infectante de cada patógeno.

Palabras claves: PCR, patógenos, ETA, detección, ocurrencia, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp*, *Yersinia enterocolitica*

ABSTRACT

"Detection of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Yersinia enterocolitica* in beef meat samples from retail supermarkets by polimerase chain reaction (PCR)"

Under the direction of the PhD. Maria de la Salud Rubio Lozano

The foodborne diseases constitute an important problem in the public health united to the economic impact that they prompt. The application of the polimerase chain reaction (PCR) the detection of bacterial pathogens has been an used by its high specificity and sensibility in dferents biologicals matrices as the beef meat. The aim of the prsent work was to detect the presence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Yersinia enterocolitica* in cuts commercial of beef meat (milaese), distributed of retail supermarkets of the cites of the Federal District, Monterrey and Villahermosa, México. Three tests of detection limit were made to establish the conditions of the PCR. The test were: 1) using bacterial pure DNA, where the detection limit for *Listeria monocytogenes* was 0.625 fg/ μ l equivalent to 0.2 genomes; 2.08984 fg/ μ l for *S. typhimurium* equivalent to 0.4 genomes and 0.78125 fg/ μ l for *Yersinia enterocolitica* equivalent to 0.16 genomes; 2) using bacterial pures cultures, where the minimum detectable quantity was 0.3 UFC/ml for *Listeria monocytogenes*, 0.005 UFC/ml for *S. typhimurium* and 0.2 UFC/ml for *Yersinia enterocolitica*; and 3) using cultures with inoculated meat artificially, where the minimum detectable quantity was 30 UFC/g for *Listeria monocytogenes*, 10 UFC/g for *S. typhimurium* and 18 UFC/g for *Yersinia enterocolitica*. There were selected the conditions of the PCR of test number 3 for analysis of the naturally contaminated samples (milanese). The all sampling, twenty-five samples positives to *Listeria monocytogenes* were detected, eight for *Salmonella spp* and twent-six for *Yersinia enterocolitica*, that represent the 27.78, 8.89 and 28.89%, respectively. The esaays of the PCR demostrated to the presence of *Listeria monocytogenes*, *S. typhimurium* and *Yersinia enterocolitica* in the cuts milanese, for that these results suggest a possible risk in the health of the consumer or population groups of high risk due to the potencial existence of the minimum infect dose of every pathogen.

Word Keys: *Listeria monocytogenes*, *S. typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, PCR, detection.

1. INTRODUCCION

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) constituyen los síndromes originados por la ingestión de alimentos y/o agua que contengan distintos agentes patógenos en cantidades tales que afecten la salud del consumidor a nivel individual o, a grupos de la población. En México como en el resto del mundo, las ETA son uno de los principales desafíos del siglo XXI debido al comportamiento epidemiológico y a su magnitud en el área de salud pública, en la salud humana e impacto socioeconómico (Schlundt, 2002). Las ETA ha encaminado a varios países a la implementación de programas eficaces y confiables para su control, prevención y diagnóstico oportuno (WHO/FAO 2004).

La incidencia global de las ETA es difícil de establecer. De acuerdo a World Health Organization (WHO), estimó que, en los países en vías de desarrollo fallecieron de 1.8 a 2.1 millones de personas por problemas diarreicos en el año 2000. Una gran proporción de estos casos se atribuyeron a la contaminación de los alimentos y agua potable por diversos agentes patógenos. En este mismo estudio, la diarrea fue la causa principal de muerte en infantes de 1 a 5 años de edad (WHO, 2001).

De los distintos agentes infecciosos involucrados en las ETA, las bacterias son los principales agentes causales. De acuerdo a WHO-Europa, de 1993 a 1998, de 20,478 brotes confirmados en el laboratorio, el 87% fueron de etiología bacteriana (Robertson *et al.*, 2000). Mientras que el Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (INPPAZ), de 1994 al 2004, de 4,623 brotes confirmados en América Latina, las bacterias fueron la causa primaria con un 55% de los brotes (INPPAZ, 2004). La diferencia en el número de brotes y casos registrados por el INNPAZ y WHO-Europa es el resultado directo del deficiente sistema de notificación y diagnóstico de América Latina. En ambos informes, la carne bovina y sus productos estuvieron involucrados como vehículos de transmisión de agentes

patógenos. En nuestro país, existe poca información respecto a la incidencia de *L. monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Y. enterocolitica* en carne bovina.

El objetivo del presente trabajo fue detectar la presencia de patógenos bacterianos entéricos como *L. monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Y. enterocolitica*, en cortes comerciales de carne bovina de origen nacional e importada, expedida en supermercados de las ciudades del Distrito Federal, Monterrey y Villahermosa, México; mediante la utilización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, polimerase chain reaction).

1.2. ANTECEDENTES

En la actualidad, los consumidores demandan alimentos seguros e inocuos. Esta demanda surgió a principios de la década de los 80's, debido a la existente preocupación de los consumidores por los frecuentes brotes de origen alimentario causado por diversos agentes bacterianos como *Escherichia coli* O157:H7 en carne molida, *Salmonella spp* no tifoidal en productos frescos y crudos, huevo, pollo y leche no pasteurizada; *L. monocytogenes* en alimentos terminados y productos lácteos; *Y. enterocolitica* en carne de cerdo y leche pasteurizada, y *Campylobacter jejuni* en pollo y leche cruda (Wilcock *et al.*, 2004; Hillers *et al.*, 2003). Los brotes causados por estas bacterias, entre otras, han propiciado que en las últimas dos décadas los agentes infecciosos sean considerados como nuevos, emergentes o re-emergentes en distintas partes del mundo (Altekruse *et al.*, 1997; Tauxe, 2002).

1.2.1. Calidad microbiológica de la carne bovina

La condición microbiológica final de la carne fresca antes de su consumo se encuentra en relación a su historial. El tipo y la cantidad de microorganismos existentes en este alimento es el resultado directo de diversas prácticas empleadas en toda la cadena de producción y transformación de la carne, es

decir, desde que el animal se encuentra en la cadena de producción (granja) hasta que el producto final es servido a la mesa del consumidor.

Durante las actividades realizadas en las etapas de pre-harvest, harvest y post-harvest existen diversas fuentes de contaminación que, indudablemente, pueden diseminar rápidamente distintos agentes patógenos de tipo bacteriano; no obstante, bajo ciertas condiciones pueden lograrse su disminución o limitar su multiplicación en la canal o producto final (Huffman, 2002). En el caso particular del tejido muscular bovino, sus condiciones intrínsecas (pH, oxido-reducción, aw, etc) y los factores extrínsecos presentes (temperatura, humedad relativa, etc), la convierten en un medio excelente para la adaptación y multiplicación de bacterias alteradoras y patógenas. Por ende, la carne y los productos cárnicos son vehículos potenciales en transmisión de bacterias como *L. monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Y. enterocolitica* en la carne bovina.

1.2.2. Fuentes de contaminación de la carne bovina

1.2.2.1. Contaminación exógena

La contaminación exógena es la principal fuente de distribución de microorganismos nocivos hacia las canales bovinas. Este tipo de contaminación proviene primordialmente de las superficies más expuestas al ambiente. El ganado previo a su sacrificio, posee una variable concentración bacteriana en sus superficies externas como son el pelo, piel y pezuñas debido a diversos factores como son el tipo de producción (extensivo o intensivo), las prácticas típicas de transporte, su permanencia en corrales y, principalmente, por la cantidad de capas de tierra y heces adheridas a dichas superficies (IFT, 2000; Beach *et al.*, 2002). La cantidad de microorganismos asociados con el pelo es alrededor de 10^7 organismos por cm^2 y en lodo adherido es de 10^7 por gramo. Se ha reportado que las heces son 100 veces más contaminadas de bacterias en comparación con la piel y del lodo adherido, encontrándose que para la cuenta estándar en placa y

coliformes es aproximadamente de 10^9 y 10^8 por gramo respectivamente (Doyle, 1997).

Aunado a lo anterior, la contaminación hacia la canal también proviene del tracto gastrointestinal, principalmente del rumen e intestino grueso; pues llevan una importante carga bacteriana (ICMSF, 1998). Esta claramente definido que para muchas bacterias patógenas transmitidas en la carne, el tracto gastrointestinal (TGI) de ganado clínicamente normal, es el principal reservorio.

La concentración bacteriana en estas fuentes (piel, TGI, etc.) inevitablemente, tienen contacto con la superficie de la canal durante el sacrificio, principalmente cuando el desollado e eviscerado fueron mal realizados (McEvoy *et al.*, 2003; Reid *et al.*, 2002).

Las condiciones sanitarias existentes de las diversas superficies de las instalaciones, equipo de procesamiento y utensilios de trabajo como cuchillos, sierras, mesas, ganchos, guantes de acero, mandiles, cintas transportadoras utilizadas en las diversas etapas de producción y transformación de la carne son fuentes de contaminación ineludibles. De igual manera, las deficientes prácticas higiénico-sanitarias de los operarios durante la jornada de trabajo y, por consecuencia, del excesivo manipuleo humano; representan puertas de entrada y diseminación de agentes patógenos (IFT, 2000).

Otras fuentes de contaminación reportadas son las provenientes de las condiciones ambientales presentes durante el procesamiento, transporte, almacenaje, distribución y punto de venta ya que el flujo de aire y humedad relativa favorecen la diseminación de patógenos bacterianos. Igualmente, la utilización de agua contaminada e insumos de dudosa calidad microbiológica representan una fuente más de contaminación. Asimismo se ha reportado la contaminación por contacto entre las mismas canales (IFT, 2000).

1.2.2.2. Contaminación endógena

Este tipo de contaminación se ha reportado, sin embargo su impacto no es significativo. El tejido músculo-esquelético de animales sanos, antes del sacrificio, es considerado estéril con excepción de los linfonodos, no obstante se ha reportado el aislamiento e identificación de bacterias en tejidos animales (Johnson *et al.*, 1988). Aunque ciertas bacterias, raramente, pueden estar presentes en el tejido muscular a niveles bajos, no son la principal fuente de contaminación como se ha explicado anteriormente.

1.2.2.3. Tipos bacterianos contaminantes en la canal bovina

Durante el proceso de producción y transformación de la carne, las fuentes de contaminación proveen y facilitan la diseminación de diversos tipos bacterianos hacia la superficie de la canal bovina. Se ha reportado la presencia de *Pseudomonas spp* (*P. fragi*, *P. fluorescens* y *P. lundensis*), el grupo *Acinetobacter/Moraxella*, *Enterobacter aerogenes*, *Micrococcus spp*, *Aeromonas spp*, *Alteromonas putrefaciens*, *Lactobacillus*, *Brochothrix thermosphacta*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter* y *Corynebacterium*. Estas bacterias son consideradas como microflora residente normal y, generalmente, son inocuas para el hombre (Doyle, 1997, ICMSF, 1998).

Las bacterias de interés en este estudio, han sido reportadas en canales bovinas. En un estudio realizado por Rivera-Betancourt *et al.*, (2004) reportaron la presencia de *L. monocytogenes* y *Salmonella spp* en 2 distintas plantas, con sistema de sacrificio y procesamiento integrado. Los resultados indicaron que las prácticas realizadas en cada planta, determinaron la prevalencia de cada patógeno en las canales. En un estudio de monitoreo de enero de 1998 a enero del 2000, Schlosser *et al.*, (2000), determinaron la incidencia de *Salmonella* en una planta de sacrificio. Durante este periodo, los autores aislaron un total de 364 muestras positivas, predominando 10 serotipos diferentes de *Salmonella*,

prevaleciendo, de mayor a menor porcentaje, *S. montevideo*, *S. typhimurium*, *S. muenster*, *S. anatum*, *S. copenhagen*, *S. mbandaka*, *S. meleagridis*, *S. kentucky*, *S. new-brunswick* y *S. derby*. Los resultados de este estudio fueron contundentes debido a que se conoció la ocurrencia de esta bacteria en esta etapa de producción.

1.3. Infraestructura de sacrificio y transformación primaria de la carne bovina en México

De acuerdo a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), en nuestro país, la infraestructura de sacrificio y transformación primaria se realiza bajo tres diferentes sistemas de establecimientos: 1) Plantas Tipo Inspección Federal (TIF), 2) rastros municipales o particulares y 3) rastros clandestinos o mataderos. Los tres sistemas de sacrificio se diferencian, principalmente, en el grado de equipamiento e infraestructura y de las medidas sanitarias e higiénico realizadas (SAGARPA, 2002).

El primer sistema (rastros y plantas procesadoras TIF) esta caracterizado por una infraestructura moderna, con un mayor equipamiento y con los más estrictos controles higiénicos y sanitarios; cuya supervisión recae en la SAGARPA. El sistema TIF cuenta con instalaciones adecuadas para que se conserve una calidad sanitaria aceptable en el producto, sea la canal o productos del mismo. Existen rampas de cemento, mangas adecuadas, rieles de conducción, cámaras de refrigeración y conservación, zonas de inspección ante mortem, diagramas de flujo de los procesos, manuales de limpieza y desinfección del equipo e utensilios, sacrificio humanitario, distribución de las canales bajo condiciones de refrigeración, con plantas de rendimiento y mantenimiento. El personal constantemente es capacitado y vestido con indumentaria adecuada para la labor de sacrificio.

La participación del sacrificio en rastros TIF en el total nacional es muy variada y depende de la especie que se trate (SAGARPA, 2002). En el caso del sacrificio de bovinos, en el año 2002, se describía la existencia de 39 rastros TIF especializados para el ganado bovino, representando el 45% del total del sacrificio en el país. El ganado sacrificado en estas plantas se destina para consumo nacional como de exportación (SAGARPA, 2002).

En los últimos años, la infraestructura de sacrificio TIF se ha visto complementada con la instalación de salas de corte y deshuese de carne, con lo que ha sido posible ofertar las piezas de la canal de mayor demanda en el mercado que abastecen permitiendo atender las demandas específicas de la industria cárnica. Una parte importante del abasto de carne en canal o cortes primarios para las ciudades proviene, principalmente, de los rastros TIF ubicados en las zonas de producción (SAGARPA, 2002).

El segundo escaño constituido principalmente por los rastros municipales y de algunos particulares. Entre la principal característica es el nivel tecnológico e higiénico-sanitario heterogéneo que presenta con respecto a los rastros TIF. La cobertura territorial de este tipo de infraestructura es la más extendida en el país, estimándose la existencia de 1,300 rastros municipales en la actualidad y la inspección corresponde, hasta la fecha, a las autoridades sanitarias del país (SAGARPA, 2002).

Este segundo sistema de sacrificio, en su mayoría, no cumple en su totalidad con las Normas Oficiales Mexicanas en referencia a las especificaciones zoosanitarias para la construcción y el equipamiento de los establecimientos destinados al sacrificio de animales e industrialización de productos cárnicos; en referencia especial al manejo adecuado de contaminantes como aguas residuales, residuos químicos y basura, del control de la fauna nociva, del establecimiento de programas de limpieza y desinfección de equipo e instalaciones, del sacrificio

humanitario de los animales y los métodos de conservación aplicados en la canal bovina(SAGARPA, 2002).

La tercera modalidad de sacrificio corresponde a los rastros clandestinos o mataderos y el denominado sacrificio *in situ*. Este sistema pertenece al aprovechamiento de animales, principalmente de especies menores, practicado desde la época precolombina. Las condiciones existentes del sacrificio y condiciones higiénico-sanitarias son deplorables (Villanueva, 1998).

La existencia de este tipo de sistema de sacrificio obedece a la falta de infraestructura de procesamiento en las pequeñas comunidades que, comúnmente, se encuentran alejadas de los canales comerciales y distribución, constituyéndose como la única forma de abasto de carne. Este tipo de procesamiento se realiza prácticamente en todo el territorio nacional e inclusive aún se le puede encontrar en las zonas suburbanas de las principales áreas metropolitanas del país. El abasto de carne proveniente de este sistema es destinado a carnicerías y tablajerías (SAGARPA, 2002).

Los tres sistemas de sacrificio mencionados proveen el abastecimiento de carne bovina en nuestro país. A pesar de los esfuerzos empleados por la industria cárnica nacional, el crecimiento y desarrollo ha estado limitado a varios aspectos y se evidencia por estudios realizados anteriormente por Aluja *et al.*, (1974) y Villanueva (1998), donde se constata el escaso progreso del sector cárnico en nuestro país. Los resultados de ambas investigaciones demuestran que las condiciones en referencia a la infraestructura y manejo siguen siendo prácticamente similares como se había descrito hace 24 años.

1.4. Calidad sanitaria de la carne bovina en los Estados Unidos de América (EUA)

En los EUA existen más de 35 regulaciones federales sobre los alimentos, entre los que se encuentra el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). Esta dependencia se encarga en la supervisión de toda la carne y aves de corral, además de los productos procesados. El USDA se encarga de la supervisión de los animales antes y después del sacrificio, de la recolección y análisis de muestras para su posterior detección de agentes infecciosos; de la inspección sanitaria y del cumplimiento de las normas de sanidad por las plantas de sacrificio y de procesamiento.

En el año de 1996, el USDA instauró el programa "Cero Tolerancia" para la calidad microbiológica en canales de bovinos y otras especies. Entre las características importantes de esta iniciativa se enunció: 1) la investigación, aprobación y aplicación de técnicas de descontaminación en canales de bovino u otra especie inmediatamente después del sacrificio, 2) la regulación de inspecciones y métodos de detección de contaminación bacteriana en las canales enfocadas a reducir la presencia de los patógenos y, 3) el establecimiento obligatorio en toda la industria cárnica que incluye plantas de sacrificio, frigoríficos, empacadoras y transformadoras de carne de programas preventivo como las Buenas Prácticas de Manufactura, las Buenas Prácticas de Higiene y sanidad, los Procedimientos Operacionales Estándar de Saneamiento (POES) y del sistema Análisis de riesgos y puntos críticos de control (HACCP, siglas en ingles) (USDA/FSIS, 1996).

En los EUA, existen 850 plantas operando bajo la supervisión federal y más de 2200 plantas bajo la inspección estatal. Cerca del 95% del total de los rastros se encuentra bajo inspección federal por lo que están sujetas a las norma de higiene y sanidad del USDA (NAAS/USDA, 2004).

A pesar de las iniciativas, la contaminación de la canal de bovino durante su obtención es inevitable. En un estudio realizado por Galland (1997), el autor describió de manera general el proceso de sacrificio utilizado en el ganado en los EUA. Galland reportó una variación considerable en la prevalencia de la

contaminación microbiana de las canales en distintas plantas de sacrificio debido, principalmente, a factores primarios, donde explicó, que la variación microbiológica estaba relacionada con la carga microbiana presente en el animal y la condición del mismo previo a su entrada al rastro. El autor mencionó que la carga microbiana final también es influida por las distintas prácticas de sanitización realizadas en cada planta de sacrificio, de los diversos métodos de descontaminación y conservación aplicados a la canal. Asimismo, estableció que las principales fuentes potenciales de contaminación se encontraban en distintas estaciones del procesamiento y de las prácticas de sacrificio en su momento. En otros estudios (Sofos *et al.*, 1999^a, Sofos *et al.*, 1999^b), encontraron una alta incidencia de *Salmonella* en canales bovinas en 7 distintas plantas de sacrificio en el país y en diferentes épocas del año. Lo realizado por Galland, Sofos y colaboradores se advierte que a pesar de las medidas de control y prevención creados, la calidad microbiológica de canales en los EUA es sumamente frágil.

1.5. Consumo de carne bovina en México

La carne y los productos cárnicos desempeñan una parte importante en la dieta de la población mexicana. De acuerdo a SAGARPA (2002), en nuestro país el consumo de carne de res se encuentra solamente por debajo del consumo de la carne de aves, principalmente pollo. El balance nutricional de la carne de res se encuentra entre un 16 a 22% de proteína del cual, su valor biológico es alto debido a que la proteína cárnica contiene 8 aminoácidos esenciales, siendo abundante en ácidos grasos saturados, vitaminas (principalmente B₁₂, niacina y B₂), hierro, fósforo y potasio; y pequeñas cantidades de calcio y magnesio.

El consumo de carne bovina se realiza bajo dos grandes sistemas: el primero, es el consumo directo de carne fresca donde el consumo per cápita fue de 13.1 kg en el año 2003, y el segundo, representado por los productos industrializados (CNOG, 2003). El consumo de carne de res es debido a la creciente demanda del consumidor por la proteína animal y el incremento general de la población. Esta

demanda creció más rápidamente en la clase media y superior de las grandes ciudades, donde en ingreso per cápita es mayor (Ruiz *et al.*, 2004).

1.6. Origen de la carne bovina consumida en México

De acuerdo con el USDA, desde 1998, nuestro país se convirtió en el segundo mercado para las exportaciones de carne bovina del país vecino. Los principales productos de carne bovina que México importa son carne en canal, cortes deshuesados y cortes sin deshuesar frescos, refrigerados o congelados. En el año del 2002, de 355, 733 toneladas de carne de res importada, 283, 372 provinieron de los Estados Unidos representando el 79.7% (Ruiz *et al.*, 2004).

1.7. Sistemas de comercialización de carne bovina en México

En la actualidad, la población adquiere carne fresca de distintos sistemas de comercialización como son los mercados públicos establecidos, los mercados sobre ruedas, los establecimientos (carnicerías) y las cadenas de autoservicio (FIRA, 1999).

Las cadenas de autoservicio son uno de los principales canales de comercialización de carne bovina. Desde 1997 su intervención en este aspecto era menos del 20%, sin embargo, se estima que actualmente su participación ha aumentado cerca del 40%. De acuerdo a un estudio realizado por los Fideicomisos Institucionales Relacionados con la Agricultura (FIRA, 1999) en 1999, existían en nuestro país 981 tiendas de autoservicio con cerca de 4.4 millones de m² de superficie de exposición y ventas, en donde se expende carne fresca y productos cárnicos directamente al público. En este mismo estudio, se desglosa la ubicación de las tiendas de autoservicio por regiones; destacando la región templada con el 39% de las unidades y el 45% de la superficie, debido a que incluye el centro y el occidente del país, y, donde se concentra la mayor parte de la población; le sigue en importancia la región árida-semiárida con 292 unidades, el trópico seco con

169 establecimientos y el trópico húmedo con el 14% de participación en tiendas y solamente el 11% de la superficie.

Las ubicaciones de las empresas mayoristas, tiendas de autoservicio y carnicerías, muestran que el mercado doméstico de la carne de bovino se encuentra prácticamente concentrado, siendo la región templada, el principal punto de comercialización y consumo, destacando el Distrito Federal y la zona con-urbada, en las cuales se comercializa el 70% y se consume el 40% de la oferta nacional. Asimismo, los volúmenes de carne distribuidos y vendidos al consumidor final a través de las tiendas de autoservicio son cada vez mayores, especialmente en las grandes ciudades (Ruiz *et al.*, 2004).

De acuerdo con Ruiz *et al* (2004), las tiendas de autoservicio manejan tanto carne de origen nacional (abastecida generalmente por plantas TIF) e importada.

1.8. Situación epidemiológica de *L. monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Y. enterocolitica* en México

La Secretaría de Salud (SSA) mediante la Dirección General de Epidemiología registró una tasa de incidencia de 4, 684 por cada 100, 000 habitantes por infecciones intestinales y una mortalidad de 4, 696 personas durante el año 2000 (SSA, 2002). En nuestro país, aunque, las cifras reportadas por la SSA demuestran una gran cantidad de casos de infecciones intestinales, lamentablemente, no se aplican estudios sistemáticos y de diagnóstico en laboratorio para la confirmación del agente bacteriano causal. No obstante, se estima que la participación de patógenos como *Salmonella spp* tienen un papel importante en las ETA y en el caso de otros patógenos como *L. monocytogenes* y *Y. enterocolitica* se carece de información sobre su incidencia real.

Estudios realizados en nuestro país confirman que la salmonelosis es el principal problema de salud pública. Gutiérrez *et al.*, (2000), señalaron la variación de los

serotipos en cepas de *Salmonella spp* aislados desde 1972 hasta 1999, a partir de diversas fuentes humanas (sangre y heces) y no humanas (alimentos, agua y ambientales). Los resultados indicaron que *S. typhimurium* y *S. enteritidis* fueron los serotipos más aislados en muestras humanas, mientras que en muestras no humanas, *S. derby* y *S. anatum* fueron los más representativos. En este mismo estudio, se confirmó el aumento gradual de *S. enteritidis* a partir de 1991.

La presencia de *Salmonella spp* en alimentos ha sido reportada en carne y productos cárnicos. Estrada *et al.*, (2003), encontraron que *S. enteritidis* fago tipo 8 y *S. agona* en tacos de carne vendidos en tianguis; asimismo, Heredia *et al.*, (2001) aislaron al agente en carne molida de res en un 11.4% del total del muestreo realizado. Castillo *et al.*, (1993) lo aislaron en pollo fresco y rostizado. Bello (1990) y Bello *et al.*, (1993), identificaron diversos serotipos de *Salmonella spp* en carne fresca y chorizos expedidos en vía pública en un porcentaje superior al 30%. Chávez *et al.*, (2001) comprobaron que la causa del brote alimentario ocurrido en un comedor hospitalario se debió a la contaminación de *Salmonella spp* en carne empanizada por un deficiente cocimiento.

En referencia a *L. monocytogenes*, este agente ha sido reportada principalmente en leche cruda y productos lácteos elaborados con leche sin pasteurizar (Luis-juan *et al.*, 1995). Vázquez *et al.*, (2001), recolectaron muestras de leche cruda en tanques de recolección y encontraron que el 13% estaban contaminadas con *L. monocytogenes* y que correspondían a los serotipos 4b y 1 que comúnmente se encuentran implicados en los brotes alimentarios. Iñiguez (2002) detectó al patógeno en quesos frescos elaborados con leche no pasteurizada en el norte del país. Aplicó técnicas microbiológicas oficiales y el método de la PCR encontrando un 10 y 23% de muestras positivas, respectivamente. Con respecto a carne, Heredia *et al.*, (2001), identificaron a *L. monocytogenes* en el 16% de sus muestras por métodos microbiológicos oficiales. De acuerdo a las publicaciones anteriores, *L. monocytogenes* es un microorganismo que esta plenamente

reconocida su presencia en los alimentos, que a pesar de lo anterior nunca se ha registrado un brote de listeriosis alimentario en México.

Con respecto a *Y. enterocolitica* es un patógeno probablemente poco estudiado en México. No obstante, se ha reportado con mucha frecuencia su presencia en casos de niños con diarrea en hospitales (Pedroza, 1981; Najera, 1988; Hernández, 1993). Con respecto a su presencia en los alimentos de nuestro país, Castañeda *et al.*, (2001), encontraron a *Y. enterocolitica* en tonsilas de cerdos (aparentemente sanos) para consumo humano e identificó al biotipo 1 como el de mayor porcentaje. Ramírez *et al.*, (2000), demostraron su presencia en cerdo y pollo crudo, en lenguas y salchichas precocidas, notando que los biotipos que aislaron (2, 3 y 4) son los que más frecuentemente originan infecciones.

1.9. Epidemiología de las ETA en los EUA

En los EUA existen varios centros de recolección e información estadística que reporta la incidencia anual aproximada de ETA en este país. La incidencia de enfermedades obligatorias es publicada principalmente por el Reporte Semanal de Morbilidad y Mortalidad (MMWR), Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), Sistema Nacional de Vigilancia de Enfermedades Notificables (NNDSS). En un estudio realizado por Mead *et al.*, (1999), al utilizar estas fuentes, estimaron que anualmente suceden en los EUA un total de 76 millones de casos de ETA, 323, 000 hospitalizaciones y 5, 000 muertes. También estimaron que aproximadamente de 250 a 350 millones de casos de gastroenteritis aguda acontecerán anualmente y que del 22 al 30% de estos casos serán causados por los alimentos.

La salmonelosis sigue siendo un problema substancial de salud pública y la principal causa de gastroenteritis en EUA (Tauxe, 1997). De acuerdo a la vigilancia epidemiológica existente en los EUA, Voetsch *et al.*, (2004) precisaron la carga de infecciones por *Salmonella spp* del periodo de 1996 a 1999 mediante una

vigilancia activa en la población. Del estudio se desprendió que la incidencia anual de la enfermedad fue aproximadamente 1.4 millones de personas con salmonelosis no tifoïdal, con 15, 000 hospitalizaciones y 400 muertes. En otro estudio realizado por Vugia *et al.*, (2004), analizaron datos y muestras clínicas recopilados de la población durante el mismo periodo y encontraron que el 70% de los casos fueron causados por 8 serotipos: *S. typhimurium*, *S. typhi*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg*, *S. dublin*, *S. paratyphi A*, *S. choleraesuis* y *S. schwarzengrund*.

El CDC/MMWR (2003) registró la incidencia de salmonelosis por grupos específicos de edad, siendo superior en niños menores de un año con 123 casos, seguido de infantes de 1 a 5 años con 50.6 casos y otros grupos con 10.8 casos por cada 100,000 habitantes. En este mismo estudio se desprendió que los infantes y la gente senil (mayor a 60 años) son los grupos más susceptibles de desarrollar la enfermedad a nivel gastrointestinal o de tipo sistémico.

Con relación a *L. monocytogenes*, este microorganismo emergió como un patógeno importante en las ETA cuando se determinó su responsabilidad en un brote registrado por el consumo de queso artesanal estilo mexicano en el año 2000. Desde entonces, se ha reportado su presencia en diversos alimentos como leche cruda, productos lácteos a base de leche no pasteurizada, alimentos preparados, semicocidos y listos para comer (Schlech, 2000). De acuerdo a Mead *et al.* (1999), la incidencia estimada anual de listeriosis será aproximadamente de 2, 500 a 3,000 casos nuevos y con un promedio de 500 muertes.

Con respecto a *Y. enterocolitica*, este agente provoca una gastroenteritis aguda persistente. El agente es transmitido en diversos alimentos, aunque la carne de cerdo y productos del mismo han sido confirmados como el principal reservorio de los serotipos patógenos (de Boer, 1995). Los procesos térmicos como la pasteurización y cocción la destruyen fácilmente, sin embargo, su responsabilidad en los brotes de origen alimentario, se debió, principalmente, a una recontaminación o contaminación cruzada del producto final.

Y. enterocolitica es responsable de aproximadamente de 78,000 casos de yersiniosis registrados a partir de los años 80'. Al parecer, su incidencia ha disminuido gradualmente en los últimos 5 años, donde los parámetros indican que para los infantes menores de 1 año, niños de 1 a 5 años y otros grupos fueron de 9.6, 1.4 y 0.2 casos, respectivamente, por cada 100, 000 habitantes (CDC/MMWR, 2003). La infección es más común en climas fríos y tiene una incidencia pico en marzo. A pesar de la disminución de casos de yersiniosis, esta enfermedad sigue siendo considerada una de las 27 enfermedades más importantes en la transmisión de las ETA en los EUA y en Europa.

1.10. Impacto económico de las ETA en los EUA

Las ETA no solo afectan la salud de la población sino también imponen una carga económica en el sector salud, reduciendo drásticamente la productividad económica de una nación. En los EUA el Servicio de Investigación Económica (ERS) es la principal fuente de información económica del USDA. Esta dependencia calcula principalmente el impacto económico de cuatro patógenos bacterianos: *Campylobacter spp*, *E. coli* enterohemorrágica (incluido el serotipo O157:H7), *Salmonella spp* y *L. monocytogenes*. De acuerdo al ERS, se estimó que los gastos por salmonelosis fue de 3.1 de dólares, mientras que por *L. monocytogenes* fue 2.3 billones de dólares, durante el año 2003 (ERS/USDA, 2004). Estos gastos son consecuencia de los costos médicos por hospitalización, medicamentos, cuidados intensivos, secuelas, tratamientos (agudos y crónicos), pensiones por muerte prematura, pago de seguros de vida, incapacidad del trabajador (corto a largo plazo), defunciones y pérdida de productividad.

1.11. Métodos de detección de patógenos bacterianos en alimentos

El análisis de los alimentos tiene la finalidad de detectar bacterias patógenas o indicadoras para determinar el grado de contaminación y la presencia o ausencia,

con el fin de asegurar la calidad sanitaria e inocuidad. Diversos métodos de detección son utilizados para cumplir con este objetivo.

En la industria alimentaria los distintos métodos proveen información adecuada de la presencia de patógenos en muestras frescas o en productos terminados, del proceso de manufacturación y del monitoreo de las practicas de limpieza e higiene en la empresa.

1.11.1. Métodos convencionales o microbiológicos estándar

En la actualidad, los análisis microbiológicos convencionales siguen siendo las pruebas estándar para el aislamiento y confirmación de diversos patógenos en la carne. Se utilizan medios específicos confiables para aislar y enumerar células viables que proporciona información cuantitativa y cualitativa de los microorganismos presentes en el alimento. Son métodos sensibles y baratos, sin embargo, requieren de varios días para obtener un resultado veraz pues depende de la habilidad del microorganismo para multiplicarse y formar colonias visibles en distintos medios selectivos y que además, se acompaña por la confirmación e identificación del agente por la utilización de pruebas serológicas y bioquímicas. Además, la preparación de los medios, la inoculación de las placas y el conteo de las unidades formadoras de colonias hace que sea aún más laborioso.

Una limitante importante por este método es que las células bacterianas viables no son siempre cultivables y, por ende, no son siempre detectadas en los medios; además, de que las propiedades fenotípicas por las cuales las bacterias son identificadas no siempre son expresadas y cuando se expresan pueden dificultar la interpretación y clasificación de la bacteria (de Boer y Beumer, 1999).

1.11.2. Inmunoensayo enzimático (ELISA)

En un ensayo heterogéneo, un antígeno determinado libre se trata con un antisuero correspondiente y la interacción se detecta mediante una actividad

marcadora o molécula fluorescente (fosfatasa alcalina, peroxidasa, y β -galactosidasa), que se une al anticuerpo en cuestión o a un segundo anticuerpo de revelado. En un ensayo típico de sándwich, el antígeno capturado es inmovilizado usualmente en tubos de poliestireno o en placas. El resultado puede ser detectado por técnicas colorimétricas o fluorométricas.

Este método es específico y sensible, sin embargo, la detección directa de patógenos en alimentos no es posible por lo que es necesario un enriquecimiento de 24 h, además de que en algunas ocasiones pueden existir reacciones cruzadas con otros patógenos. En el caso de *Y. enterocolitica* se ha reportado una reacción cruzada con *Brucella spp*, *Francisella tularensis*, *Salmonella* O:30, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* O:157 y *Morganella morganii*. En la actualidad existen una amplia variedad de kits comerciales para *Salmonella spp* y *L. monocytogenes* siendo confiables a partir de muestras de alimentos (de Boer and Beumer, 1999).

1.11.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Desde la invención de la PCR por Kary Mullisen en 1985, esta técnica molecular fue aplicada como una herramienta alternativa en la detección de bacterias patógenas en muestras de alimentos. La introducción de la PCR fue por las ventajas propias del método como son la especificidad, sensibilidad, rapidez, detección límite y selectividad (Olsen, 2000). En 1999, la Comisión Europea aprobó el proyecto de investigación para la estandarización y validación en el uso de la PCR como prueba diagnóstica en la detección de patógenos bacterianos a partir de distintas muestras de alimentos (Malorny *et al.*, 2003^a).

La PCR es una técnica molecular *in vitro* que consiste básicamente en la amplificación logarítmica de millones de copias de una región específica contenida en otra molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN). La amplificación de ADN por la PCR es llevada a cabo mediante el uso de dos oligonucleótidos. Estas son moléculas cortas de ADN de cadena sencilla, que se hibridan cada uno a una

cadena sencilla de ADN que es utilizado como molécula molde o template, y que definen y limitan la región que se amplificará a partir de dicho template de ADN. Durante la reacción de la PCR se sintetiza ADN, es decir, se polimerizan los desoxirribonucleótidos (dNTP's) añadidos mediante la acción de DNA polimerasa termoestable, que, específicamente actúa en el lugar donde se unieron los oligonucleótidos, que son complementarios a los dNTP's presentes en la cadena molde.

En la PCR suceden varios ciclos de polimerización (de 30 a 40). Al inicio de cualquier ciclo, las moléculas de ADN son de doble cadena, por lo que el primer paso es la desnaturalización del ADN, que permita a los oligonucleótidos hibridarse a la región que se desea amplificar y que a partir de ellos se inicie la síntesis de ADN. Las nuevas cadenas de ADN que se generan en el primer ciclo sirven de template en el segundo ciclo y así consecutivamente, dando lugar a la amplificación de la región deseada (Mc Pherson, 2000).

El cuadro 1 muestra las características de especificidad y sensibilidad de los distintos métodos de detección de patógenos en los alimentos.

| Cuadro 1. Métodos de detección de patógenos en alimentos | | | |
|---|--|----------------------------|----------------------------------|
| Método | Límite de detección UFC/gr o ml | Tiempo | Especificidad^c |
| Microbiológicos Oficiales | 1 | 3 a 7 días ^a | Bueno |
| Inmunológicos | 10 ⁵ | 1-2 h ^b | Moderado a bueno |
| Ensayos basados en ácidos nucleicos (PCR) | 10 ³ | 6 a 12 h ^b | Excelente |

^a Depende del microorganismo blanco.
^b Después de una etapa de enriquecimiento.
^c La posibilidad de detectar grupos específicos de microorganismos.

2. JUSTIFICACION

En la actualidad, diversos agentes de tipo bacteriano son transmitidos en los alimentos como es la carne de origen bovina. Lo anterior representa un problema trascendental en el área de Salud Pública debido a las consecuencias que provocan en la salud humana. La detección rápida, oportuna y confiable de los diversos patógenos bacterianos en cualquier etapa de la cadena cárnica, constituyen un paso importante para su control, monitoreo y prevención. El uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método que ha mostrado ser confiable en la detección de patógenos como son *L. monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Y. enterocolitica* que pueden estar presentes en cortes comerciales de carne fresca de origen bovino.

3. OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente trabajo fue conocer la calidad sanitaria en cortes comerciales de carne bovina nacional e importada expedida en supermercados, a través de la detección de *L. monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Y. enterocolitica* procedente de las ciudades del Distrito Federal, Monterrey y Villahermosa; México, mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. Diseño del experimento

Para la recolección de muestras de carne, se subdividió el país en tres regiones (norte, centro y sur), teniendo en cuenta que en México existen tres grandes zonas ganaderas principales. Dentro de cada zona ganadera, se seleccionaron las ciudades más importantes, que constituyen los principales puntos de distribución de carne bovina y, además, de la población total existente en cada una. De acuerdo a estos criterios, las tres ciudades seleccionadas fueron: Distrito Federal; Monterrey, Nuevo León y Villahermosa, Tabasco (SAGARPA, 2002).

El muestreo se restringió en puntos de venta dentro del mercado formal (expedido en cadenas de autoservicio), donde concurre la carne nacional e importada con clara distinción.

4.1.1. Características de la muestra de campo

La muestra de carne seleccionada fue el corte comercialmente conocido como milanesa de res, empacada en paquetes de 250 g aproximadamente, mantenidas a temperatura de refrigeración (4°C) y sin marcas comerciales. El propósito de no utilizar marcas es con el objetivo de lograr una mayor homogeneidad entre carne nacional e importada sin reparar en categorías.

La selección de este corte se justificó por su amplio consumo en la población mexicana y por su relativo acceso económico. De acuerdo a una encuesta citada por SAGARPA (2002), del total de hogares que gastan una parte de sus ingresos en la compra de carne, en general, cerca del 72% destina una parte de su gasto en la compra de carne de res y ternera, observándose la tendencia mayor ingreso-mayor gasto. Los cortes más comprados son los cortes conocidos como bistec y milanesa, seguido de otros como la pulpa, trozo y molida. Los cortes a los que se

les destinan menor cantidad de gasto incluyen lomo, filete, chuleta, costilla, cortes especiales y otras partes de res y ternera.

4.1.2. Muestreo

El número y tamaño de las muestras fueron determinados conforme a los criterios microbiológicos establecidos por la Comisión Internacional de Estandarización Microbiológica de Alimentos (ICMSF, siglas en ingles) y la presentación comercial del alimento. El muestreo para los paquetes de venta al detalle como es la carne fresca refrigerada y empacada impone el análisis de 5 paquetes (ICMSF, 2000). Cada paquete fue identificado con los siguientes datos: número de muestra, origen de la carne (nacional o importada), tienda y ciudad de procedencia.

Se recolectaron un total de 90 muestras de milanesa de res en las principales tiendas de autoservicio en las ciudades del Distrito Federal, Monterrey y Villahermosa, México, siendo 5 paquetes de milanesa de origen nacional y 5 de origen importado para cada tienda de autoservicio. (Cuadro 2).

| Ciudad | Nacional | Importada |
|--------------------|----------|-----------|
| Distrito Federal | 20 | 20 |
| Monterrey, NL | 15 | 15 |
| Villahermosa, Tab. | 10 | 10 |

4.1.3. Selección de puntos de venta

La selección de los puntos de venta que participaron en la investigación se realizó al azar. Se trabajó con las cadenas de autoservicio asociadas a la Asociación Nacional de Tiendas de Autoservicios y Departamentales, que son las de mayor presencia en nuestro país (ANTAD, 2002) y de Wal-Mart de México S.A. de C.V. (Wal-Mart de México, 2002). Se conformó un listado con el total de unidades en

cada una de las ciudades seleccionadas. Posteriormente, se asignó un número aleatorio a cada tienda de autoservicio, mismo que se utilizó para la elección de los establecimientos a visitar.

De acuerdo a la ANTAD, las principales cadenas de autoservicio existentes y con una mayor presencia en nuestro país, son los siguientes grupos: Grupo Gigante S.A. de C.V. con 206 unidades; Tiendas Comercial Mexicana S.A. de C.V. con 147 unidades; Tiendas Soriana SA de C.V. con 126 unidades; Grupo Chedraui S.A. de C.V. con 49 unidades y Grandes Superficies de México S.A. de C.V. con 17 unidades. Wal-Mart de México S.A. de C.V. tiene actualmente 91 unidades en el país.

4.2. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Para este estudio se adquirieron las cepas de referencia de *L. monocytogenes* LNA102/99 FDA/OMS y *Salmonella enterica* variedad *typhimurium* ATTC 14579 del Laboratorio Nacional de Salud Pública. En el caso de *Y. enterocolitica* la cepa de referencia ENCB-0752 se adquirió en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN). Estas cepas fueron utilizadas como control positivo durante el desarrollo del trabajo experimental. Las cepas adquiridas fueron preservadas y almacenadas a -80°C en viales con glicerol y caldo cerebro infusión (BHI) al 50%.

Previo a cada ensayo se corroboró la pureza y viabilidad de cada microorganismo de la siguiente manera: a partir de un cultivo de mantenimiento, se tomó una asada y se sembró en agar soya tripticasa (TSA), y se incubaron a 37°C durante 24 h. Posteriormente, una colonia fue transferida a un agar selectivo acorde al tipo de microorganismo. En el caso de *L. monocytogenes* se sembró en agar Polimixima-Acriflavina-Cloruro de litio-Ceftazidima-Esculina-Manitol (PALCAM), para *S. typhimurium* en agar Sulfito de Bismuto (SB) y para *Y. enterocolitica* se

utilizó agar Cefsulodina-Irgasan-Novobiocina (CIN). Las características de selección de cada colonia bacteriana se muestran en el Cuadro 3.

| Cuadro 3. Características de selección de colonias bacterianas | | |
|---|--|--------|
| Bacteria | Características fenotípicas | Medio |
| <i>L. monocytogenes</i> | Colonias verde-grisáceas con un halo negro. | PALCAM |
| <i>S. typhimurium</i> | Colonias negras o verdes brillantes | SB |
| <i>Y. enterocolitica</i> | Colonias con un centro color rojo oscuro y periferia clara | CIN |

4.3. Extracción de ADN bacteriano a partir de cultivos puros bacterianos

Una colonia típica (pura) de cada microorganismo fue sembrada individualmente en 10 ml de caldo soya tripticasa (TSB) y, fueron incubados a 37°C por 24 h a 150 rpm en agitación orbital. Finalizado el período de incubación a cada cultivo bacteriano se les aplicó el protocolo de extracción de ADN propuesto por Silhavy (1984) para cultivos puros bacterianos con algunas modificaciones.

El procedimiento fue el siguiente: los cultivos bacterianos fueron centrifugados durante 12 min a 4, 500 rpm a 4°C. A cada pastilla de trabajo obtenida se le adicionaron 500 µl de solución de lisis (Tris 50 mM pH 8, EDTA 50 mM, tritón X-100 5% y sacarosa 8%) y se mantuvieron a temperatura ambiente por 40 min. Terminado el tiempo, se agregaron 15 µl de lisozima a una concentración de 1.5 µg/ml y se mantuvieron a temperatura ambiente por 40 min. El volumen total se transfirió a un microtubo estéril nuevo (1.5 ml), e inmediatamente, fueron sometidas a ebullición por 60 s. Enseguida, a cada microtubo se le adicionaron 7.5 µl de RNAasa a una concentración de 20 µg/ml y 1.5 µl de proteinasa K a una concentración de 50 µg/ml. Las muestras fueron mantenidas a 37°C por 80 min y posteriormente a 50°C por 80 min. La proteinasa K fue inactivada a 65°C durante 40 min. A cada muestra se le agregaron 250 µl de NaCl₂ 2 M y, enseguida, fueron centrifugados a 14, 500 x g por 10 min.

El sobrenadante de cada muestra fue transferido a un microtubo estéril nuevo, el cual se le adicionó dos volúmenes iguales de etanol absoluto frío. Las muestras fueron mantenidas entre 12 a 14 h a -20°C . Terminado este periodo, las muestras fueron centrifugadas a $14,500 \times g$ por 10 min. Se decantó, y la pastilla se lavó dos veces con etanol frío al 70% a $10,000 \times g$ por 5 min. La pastilla se secó a 65°C por 5 min en un termoblock y, posteriormente, cada microtubo de muestra con ADN se diluyó en 50 μl de agua bidestilada estéril. Los viales con ADN fueron almacenados a -20°C (Figura 1).

Para verificar la pureza e integridad del ADN obtenido de cada microorganismo se colocó una mezcla de 5 μl de ADN de muestra en 2 μl de buffer de muestra (azul de bromofenol, xilencianol y glicerol) en un gel de agarosa al 1%. Los viales con ADN de *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* y *Y. enterocolitica* fueron conservados a -20°C hasta el momento de su utilización.

4.4. Selección de los oligonucleótidos

Los oligonucleótidos seleccionados han sido descritos previamente en la literatura. Su especificidad se encuentra basada en investigaciones anteriormente publicadas, tanto en cultivos puros como en diferentes matrices biológicas, incluida la carne. La secuencia de los oligonucleótidos empleados se describe en el Cuadro 4.

Para *L. monocytogenes* se utilizaron los oligonucleótidos Mar1 y Mar2 (Manzano *et al.*, 1997), los cuales están localizados dentro del gen *iap* (invasión-associated protein) en las posiciones 635-651 y 1071-1087 pares de bases (pb), respectivamente, dando como resultado un fragmento de amplificación de 453 pb. El gen *iap* codifica una proteína extracelular de 60 kDa que se encuentra asociada a la invasión de células eucariotas del hospedero principalmente no fagocíticas (Kuhn *et al.*, 1989).

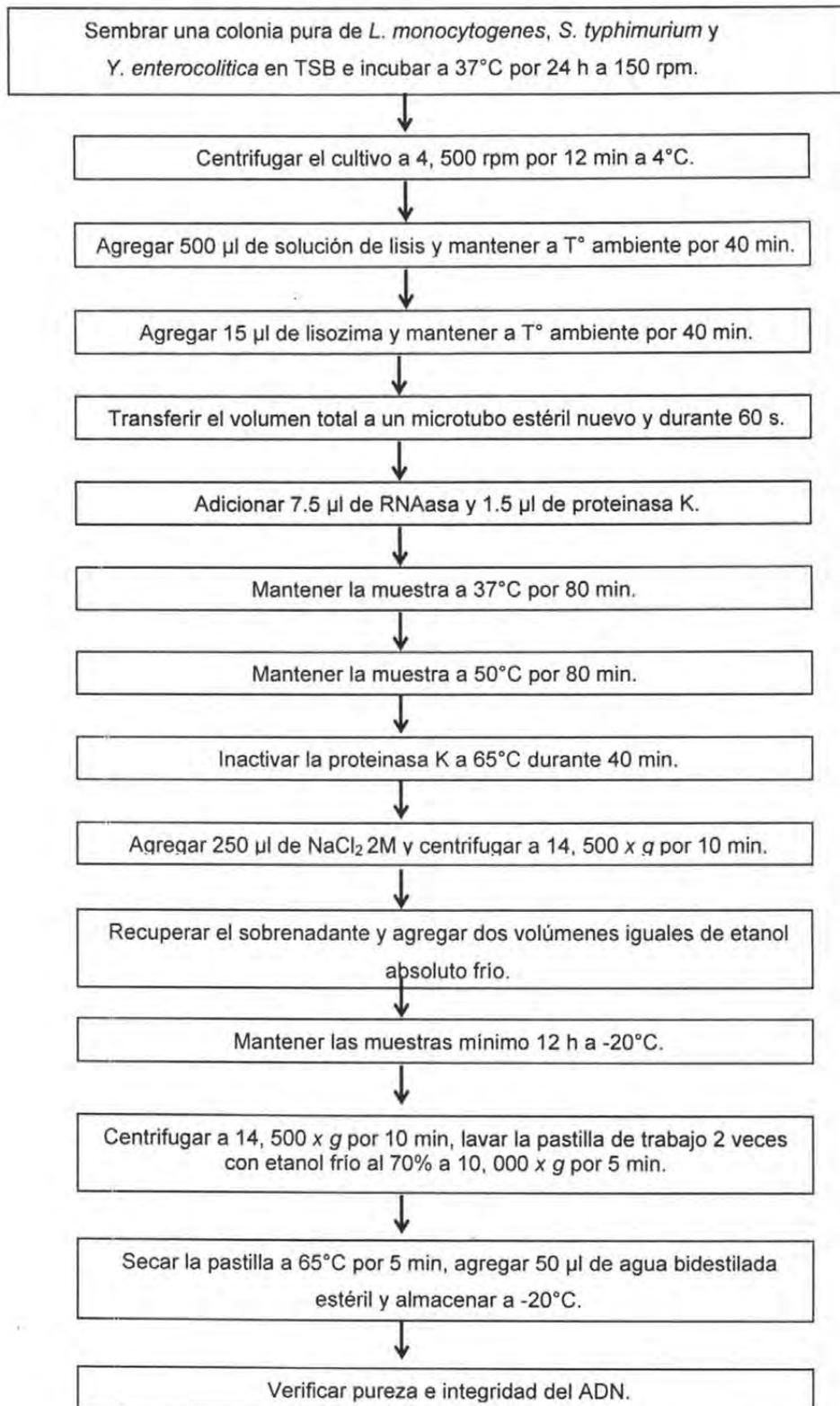


Figura 1. Diagrama de flujo para la extracción de ADN bacteriano.

Para *S. typhimurium* se emplearon los oligonucleótidos 139 y 141 descritos por Ranh *et al.*, para la amplificación del gene *invA* de *Salmonella spp* (1992). Los oligonucleótidos se encuentran localizados en las posiciones 287-312 y 571-550 respectivamente, dando un fragmento de amplificación de 284 pb. El gen *invA* pertenece a conjunto de genes (*inv*), del cual el gen *invA*, en particular, codifica una proteína de 685 aminoácidos con una función de invasión a células epiteliales del intestino (Galán *et al.*, 1992). Estos oligonucleótidos se encuentran validados internacionalmente (Malorny *et al.*, 2003^b).

Con respecto a *Y. enterocolitica*, los oligonucleótidos utilizados fueron citados por Fenwick *et al.*, (1991). El gen *ail* (attachment invasión locus) se encuentra exclusivamente en serotipos patógenos y codifica una proteína de membrana externa de 17 kDa. La función de *ail* es la adherencia e invasión de células epiteliales del hospedero, teniendo una mayor afinidad a las células situadas en la región del ileón (Miller *et al.*, 1989).

Cuadro 4. Oligonucleótidos utilizados en este estudio

| Agente | Gen | Secuencia | pb |
|--------------------------|-------------|---|-----|
| <i>L. monocytogenes</i> | <i>iap</i> | F. 5'-GGGCTTTATCCATAAAATA-3' R. 5'-TTGGAAGAACCTTGATTA-3' | 453 |
| <i>Salmonella spp</i> | <i>invA</i> | F. 5'- CAGTGGTGTCATATCATTGCC-3' R. 5'-GTAAGAAGGTGCTTATACATC-3' | 289 |
| <i>Y. enterocolitica</i> | <i>ail</i> | F. 5'-CTATTGGTTATGCGCAAAGC-3' R. 5'-TGCAAGTGGGTTGAATTGCA-3' | 354 |

4.5. Determinación de las condiciones de la PCR

Se efectuaron tres distintos ensayos en relación al límite de detección o mínima cantidad detectable. Lo anterior se realizó con el propósito de establecer las condiciones adecuadas de la PCR para las muestras de campo.

4.5.1. Límite de detección de la PCR empleando ADN puro bacteriano

Para la determinación del límite de detección en este tipo de ensayo, se utilizó ADN puro de *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* y *Y. enterocolitica*. El ADN de cada patógeno anteriormente obtenido (punto 4.3.) fueron cuantificados utilizando un fluorómetro. La determinación de la concentración de ADN mediante el fluorómetro es estimada por la utilización de un fluoróforo que absorbe a 365 nm y emite a 458 nm (Sambrook y Russell, 2001).

La concentración final de ADN obtenida para *L. monocytogenes* fue de 47.3 ng/μl, para *S. typhimurium* de 26.75 ng/μl y para *Y. enterocolitica* 20 ng/μl. A cada microtubo con ADN se les realizaron diluciones hasta obtener una concentración final de 0.26 ng/μl para *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* y 0.4 ng/μl para *Y. enterocolitica*. Posteriormente, se realizaron diluciones dobles seriadas para determinar la mínima cantidad detectable de ADN genómico. Establecido el límite de detección de ADN puro se determinó su equivalencia en número de genomas. El calculo se realizó mediante la siguiente formula: el tamaño total del genoma en pares de bases multiplicado por el peso molecular promedio de un par de base dividido entre el número de Avogrado (Sambrook y Russell, 2001).

4.5.1.1. Condiciones de la PCR

Se aplicó el siguiente protocolo: un volumen total de 20 μl por tubo de reacción contenían 2 μl de PCR buffer, 2 μl de dNTPs, 1.33 μl de MgCl₂ (concentración de 25 mM), 0.4 μl de cada primer, 5 μl de template de ADN y 1 U de Taq polimerasa. La mezcla fue sometida al siguiente programa de amplificación: un paso de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos subsecuentes de 30 s a 94°C (desnaturalización), 30 s de 56°C (alineamiento) y 30 s de 72°C (extensión); y una extensión final de 5 min a 72°C. Este programa fue aplicado para los tres patógenos, con la variante, que en el caso *L. monocytogenes* la temperatura de la etapa de alineamiento fue a 50°C.

Terminado el programa de amplificación, se tomaron 10 µl de productos de la PCR a los que se les adicionó 0.8 µl de buffer de muestra. La mezcla fue colocada en los pozos de un gel de agarosa al 2% con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio, dentro de una cámara de electroforesis con 300 ml de buffer TAE 1X (0.04 M Tris-acetato, 0.001 M EDTA, pH 8.0). El gel de agarosa fue llevado a un voltaje de 75 v.

Las bandas de ADN fueron visualizadas y fotografiadas en un transiluminador de luz ultravioleta (UV). En cada ensayo de PCR se colocó el marcador de peso molecular (pBR322 digerido con *MspI*), agua bidestilada estéril como control negativo y ADN genómico extraído de cada patógeno como control positivo.

4.5.2. Límite de detección de UFC por la PCR empleando cultivos puros bacterianos

Para la determinación del límite de detección de unidades formadoras de colonias (UFC) por la técnica de la PCR, se realizaron diluciones décuples seriadas a partir de cultivos bacterianos y sembrados en placas de TSA. Antes de comenzar el ensayo, se verificó la pureza y viabilidad de cada microorganismo como se explica anteriormente (punto 4.2.). Una colonia típica pura de cada microorganismo fue sembrada individualmente en 10 ml de caldo Luria-Bertani (LB), y se incubaron a 37°C por 24 h a 150 rpm. Finalizado el periodo de incubación, se tomaron 500 µl de cada inóculo y se sembraron en 9.5 ml de LB, para ser nuevamente incubadas a 37°C durante 4 h a 150 rpm. El propósito de la realización de cultivos continuos fue para obtener al inóculo bacteriano en fase logarítmica.

Posterior a la incubación, se cuantificó la concentración del inóculo final en un espectrofotómetro a una densidad óptica (OD₆₀₀ nm). Las lecturas obtenidas fueron 0.515, 0.511 y 0.517 para *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* y *Y. enterocolitica* respectivamente. Realizada las lecturas de los cultivos bacterianos, se realizaron diluciones decimales seriadas (hasta 10⁻¹⁰). Se tomaron 100 µl de

cada cultivo final y se colocaron individualmente en microtubos que contenían 900 µl de solución salina fisiológica al 0.85%. Los microtubos de cada dilución fueron identificados. Concluida las diluciones, se tomaron de cada una, 100 µl que fueron sembrados en TSA y que, posteriormente, fueron incubadas a 37°C por 24 h. Las diluciones y la siembra se realizaron en una campana de extracción de flujo laminar.

Terminado el periodo de incubación, se verificó la correcta relación entre el número de UFC y sus diluciones correspondientes. Confirmado que el procedimiento fue realizado correctamente, se aplicó el protocolo descrito por Millar *et al.*, (2000), con algunas modificaciones, para extraer ADN de células bacterianas por lisis. El protocolo fue el siguiente: las diluciones originales se sometieron a una etapa de centrifugación de 14, 500 x *g* por 15 min, el sobrenadante se desechó, la pastilla de trabajo se seco a temperatura ambiente durante 30 min y posteriormente se resuspendió en 100 µl de agua bidestilada estéril. Inmediatamente, se aplicó un tratamiento térmico (94°C) por 10 min y una segunda fase de centrifugación de 14, 500 x *g* por 8 min. Del volumen final total (100 µl), se tomaron 10 µl que fueron utilizados como template de ADN para la PCR (Figura 2).

4.5.2.1. Condiciones de la PCR

Se aplicó el siguiente protocolo: un volumen total de 50 µl por tubo de reacción contenían 3 µl de 1X PCR buffer, 3 µl de dNTPs, 1.5 µl MgCl₂ (concentración 25 mM), 1 µl de cada primer, 10 µl de template de ADN y 2 U de Taq polimerasa. La mezcla fue sometida al siguiente programa de amplificación: un paso de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos subsecuentes de 40 s a 94°C (desnaturalización), 45 s de 56°C (alineamiento) y 60 s de 72°C (extensión);

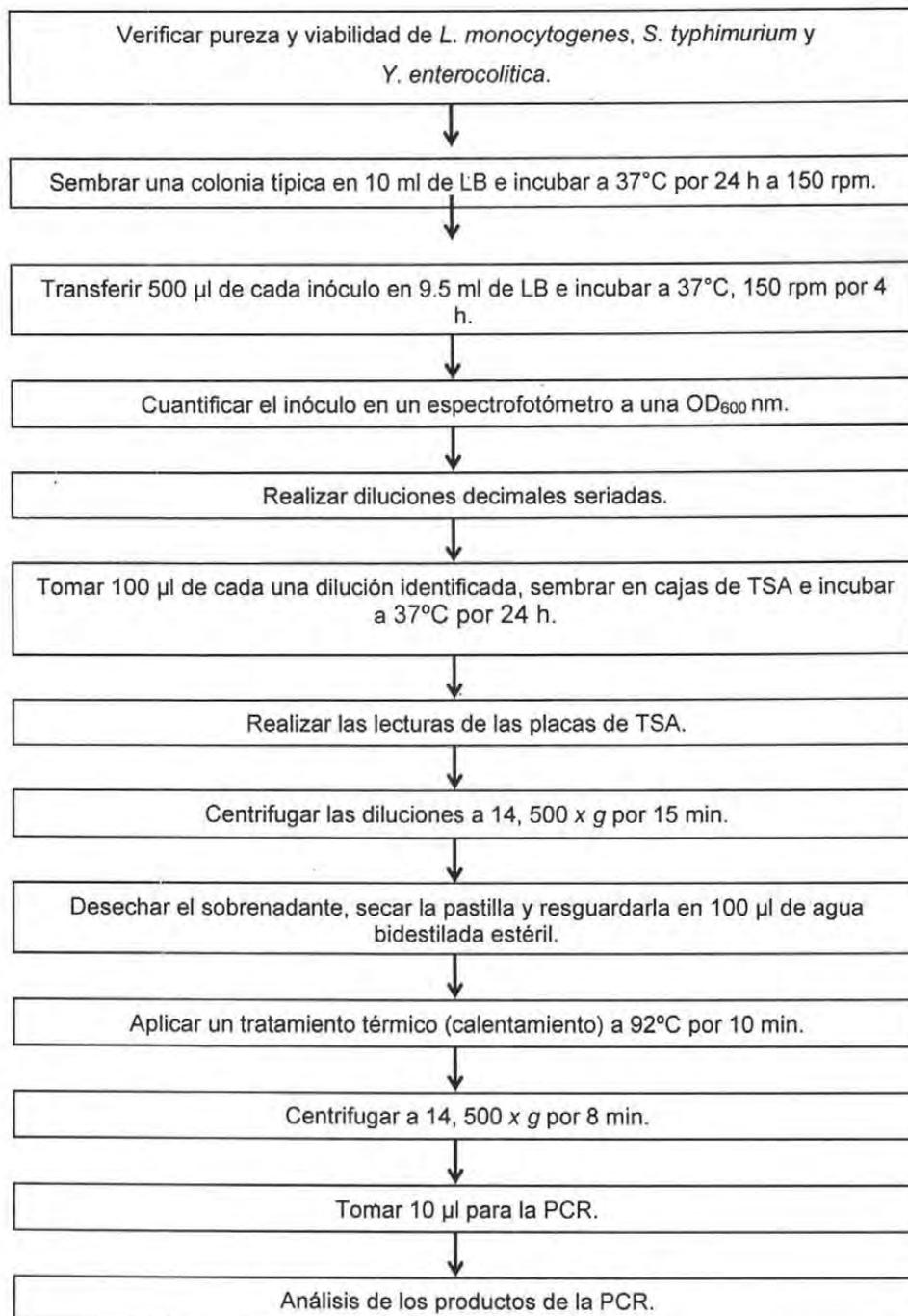


Figura 2. Diagrama de flujo para la determinación de la detección límite de UFC por la PCR empleando cultivos puros bacterianos.

y una extensión final de 5 min a 72°C. Este programa fue aplicado para los tres patógenos, con la diferencia, que en el caso *L. monocytogenes*, la temperatura en la etapa de alineamiento fue a 50°C.

Terminado el programa de amplificación, se tomaron 10 µl de productos de la PCR y se les adicionó 0.8 µl de buffer de muestra. La mezcla fue colocada en los pozos de un gel de agarosa al 2% con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio, dentro de una cámara de electroforesis con 300 ml de buffer TAE 1X. El gel fue llevado a un voltaje de 75 v.

Finalmente, las bandas fueron visualizadas y fotografiadas en un transiluminador de luz UV. En cada ensayo de PCR se colocó marcador de peso molecular (pBR322 *MspI*), agua estéril bidestilada como control negativo y ADN genómico extraído de cada patógeno como control positivo.

4.5.3. Límite de detección de UFC por la PCR empleando cultivos con carne bovina inoculada artificialmente con *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* y *Y. enterocolitica*

Para la determinación del límite de detección de UFC por la técnica de la PCR, se realizaron diluciones decimales seriadas (hasta 10^{-10}) a partir de cultivos de carne inoculados artificialmente con cada patógeno y sembrados en cajas de petri con medio selectivo acorde a cada microorganismo.

Para la detección individual de *S. typhimurium* y *L. monocytogenes*, de una misma muestra de campo, se tomaron aleatoriamente 25 g de carne con tijeras y pinzas estériles, que fueron depositados en 225 ml de caldos de enriquecimiento selectivos estériles correspondiente a cada bacteria, y que inmediatamente fueron homogenizados durante 3 min en una licuadora estéril. En el caso de *Y. enterocolitica* se utilizaron 10 g de carne que fueron depositados en 90 ml de caldo de enriquecimiento selectivo estéril. Los medios utilizados se encuentran indicados

para su empleo en muestras de alimentos y son compatibles para la PCR (Gasánov *et al.*, 2005; Lantz *et al.*, 1998). Los caldos de enriquecimiento selectivos fueron LEB para *L. monocytogenes*, caldo lactosado para *S. typhimurium* (CL) y YSB para *Y. enterocolitica*. Posteriormente, a cada homogenizado (dilución primaria) se le inoculó una colonia típica pura de *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* y *Y. enterocolitica*.

Debe mencionarse la formulación de los medios selectivos de enriquecimiento empleados están diseñados para disminuir el crecimiento de la flora competitiva, aumentar la presencia de la bacteria blanco que regularmente se encuentra en bajas cantidades en el alimento, así como aumentar la probabilidad de detección de células viables (Fukushima *et al.*, 1986; Gasánov *et al.*, 2005).

Posteriormente, a cada dilución primaria se le aplicó un periodo y tiempo de incubación determinado (fase de enriquecimiento). De acuerdo a la técnica descrita en la Norma Oficial Mexicana para *Salmonella spp* se empleó a 35°C por 24 h (NOM-SSA-143-1994) y para *L. monocytogenes* a 30°C durante 48 h (NOM-114-SSA1-1995). Con respecto a *Y. enterocolitica*, la temperatura de incubación empleada fue a 37°C durante 24 h. Este protocolo de incubación en el caso de *Y. enterocolitica* se aplicó debido a que el gen *ail* se encuentra regulado transcripcionalmente por la temperatura y la fase de crecimiento, donde el pico máximo de expresión del gen se expresa tanto *in vitro* como *in vivo* a la temperatura del hospedero que es a 37°C (Bliska *et al.*, 1992). En el Cuadro 5 se especifica las condiciones de incubación para cada patógeno.

| Cuadro 5. Condiciones de incubación | | | |
|--|-------|------------------|------------|
| Agente | Medio | Temperatura (°C) | Tiempo (h) |
| <i>L. monocytogenes</i> | LEB | 30 | 48 |
| <i>Salmonella spp</i> | CL | 35 | 24 |
| <i>Y. enterocolitica</i> | YSB | 37 | 24 |

Finalizado el periodo de incubación, se tomaron 100 µl de cada dilución primaria y, como en el punto anterior, se agregaron individualmente en microtubos con 900 µl de solución salina fisiológica al 0.85% para efectuar las diluciones decimales seriadas (hasta 10^{-10}). Los microtubos de cada dilución fueron identificados. Terminada las diluciones, se tomaron 100 µl de cada una y fueron sembrados en medios selectivos acorde al tipo de microorganismo (punto 4.2.). Las cajas selectivas fueron identificadas e incubadas a 37°C por 24 h. Las diluciones y la siembra se realizaron en una campana de extracción de flujo laminar.

Terminado el periodo de incubación, se verificó la correcta relación entre el número de UFC y sus diluciones correspondientes. Confirmado que el procedimiento fue realizado correctamente, se aplicó el protocolo descrito anteriormente (Millar *et al.*, 2000), con algunas modificaciones, para extraer el ADN de células bacterianas por lisis. Los microtubos con las diluciones originales fueron centrifugados a 14, 500 x g por 20 min, la pastilla de trabajo se mantuvo con 100 µl del mismo sobrenadante e inmediatamente, se les aplicó un tratamiento por calor (94°C) por 25 min. Terminado el proceso, fueron nuevamente centrifugados a 14, 500 x g por 10 min. Del volumen total final (100 µl), se tomaron 10 µl de cada microtubo que fueron utilizados como template de ADN para la PCR (Figura 3).

4.5.3.1. Condiciones de la PCR

Se aplicó el siguiente protocolo: un volumen total de 50 µl por tubo de reacción contenían 4 µl de Buffer, 4 µl de dNTP's, 4 µl de MgCl₂ (concentración 25 mM), 2.5 µl oligonucleótidos, 5 U de Taq polimerasa y 10 µl de ADN. Se adicionó 2.5 µl de Albúmina Sérica Bovina y 2.5 µl tritón X-100. La mezcla fue sometida al siguiente programa de amplificación: un paso de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos subsecuentes de 60 s a 94°C (desnaturalización), 60 s a 56°C (alineamiento) y 80 s de 72°C (extensión) y, finalmente, una extensión final

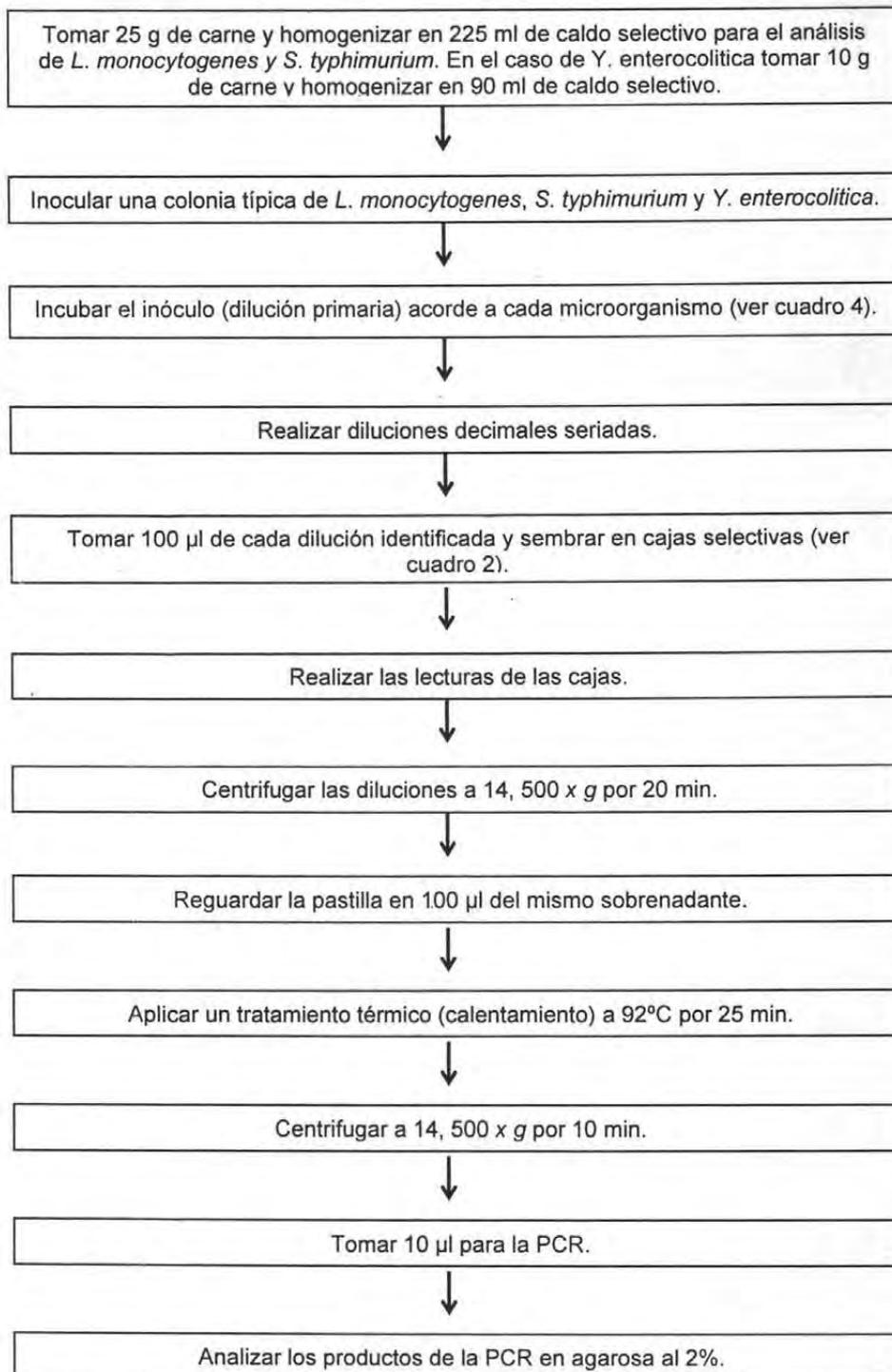


Figura 3. Diagrama de flujo para la determinación de detección límite de UFC por la PCR empleando cultivos con carne inoculados con *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* y *Y. enterocolitica*.

de 8 min a 72°C. Este programa fue aplicado para los tres patógenos, con la variante, que en el caso *L. monocytogenes*, la temperatura en la etapa de alineamiento fue a 50°C.

Terminado el programa de amplificación, se tomaron 10 µl de productos de la PCR y se les adicionó 0.8 µl de buffer de muestra. La mezcla fue colocada en los pozos de un gel de agarosa al 2% con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio, que se encontraba en una cámara de electroforesis que contenía 300 ml de buffer TAE 1X. El gel fue llevado a un voltaje de 75 v.

Finalmente, las bandas fueron visualizadas y fotografiadas en un transiluminador de luz UV. En cada ensayo de PCR se colocó marcador de peso molecular (pBR322 *MspI*), agua estéril bidestilada como control negativo y ADN genómico extraído de cada patógeno como control positivo.

4.6. Adquisición y procesamiento de muestras de milanesa de res en punto de venta

Durante el periodo de septiembre a diciembre del 2003 se recolectaron 90 muestras de milanesa de res en las cadenas de autoservicio. Se recolectaron y procesaron primeramente las muestras de la ciudad del D.F., posteriormente las muestras de Monterrey, N.L., y por último las muestras de Villahermosa, Tab. Las muestras fueron adquiridas mínimo 12 horas de anticipación previo a su procesamiento, y transportadas bajo condiciones de refrigeración (4°C) al laboratorio de Medicina Preventiva y Salud Pública de la FMVZ de la UNAM, para efectuar la etapa de enriquecimiento como se describió en el punto 4.5.3. Las muestras fueron identificadas correctamente como se menciona anteriormente

Terminada la etapa de enriquecimiento, se tomó 1 ml de cada dilución primaria y se transfirió a un microtubo estéril nuevo. A las muestras se les aplicaron tratamiento que consistió, básicamente, en dos etapas de centrifugación. La

primera de 14, 500 x g por 15 s, donde el sobrenadante fue transferido a un microtubo estéril nuevo e inmediatamente se les aplicaron una segunda centrifugación de 14, 500 x g por 90 s. Las pastillas de trabajo obtenidas se secaron a temperatura ambiente por 30 min e inmediatamente les fueron aplicados el proceso de extracción de ADN anteriormente descrito (punto 4.3.). Concluida la extracción, los microtubos que contenían los ácidos nucleicos de las muestras fueron identificados, cuantificados mediante fluorómetro y almacenados a -20 °C. La concentración final del ADN de todas las muestras se ajustaron a 30 ng/μl.

Para verificar la pureza e integridad del ADN obtenido por el protocolo de extracción, se colocó una mezcla de 5 μl de ADN de muestra en 2 μl de buffer de muestra. Posteriormente, de cada microtubo se tomaron 5 μl de ADN que fueron utilizados como templete en la amplificación de los genes blancos.

Las condiciones de amplificación para la PCR empleadas en el análisis de las muestras de campo fueron las mismas que se emplearon en el punto anterior (4.5.3.1). Terminado el programa de amplificación, se tomaron 10 μl de productos de la PCR y se les adicionó 0.8 μl de buffer de muestra. La mezcla fue colocada en los pozos de un gel de agarosa al 2% con 0.5 μg/ml de bromuro de etidio, dentro de una cámara de electroforesis con 300 ml de buffer TAE 1X. El gel fue llevado a un voltaje de 75 v.

Finalmente, las bandas fueron visualizadas y fotografiadas en un transiluminador de luz UV. En cada ensayo de PCR se colocó el marcador de peso molecular (pBR322 *MspI*), agua estéril bidestilada como control negativo y ADN genómico extraído de cada patógeno como control positivo (Figura 4).

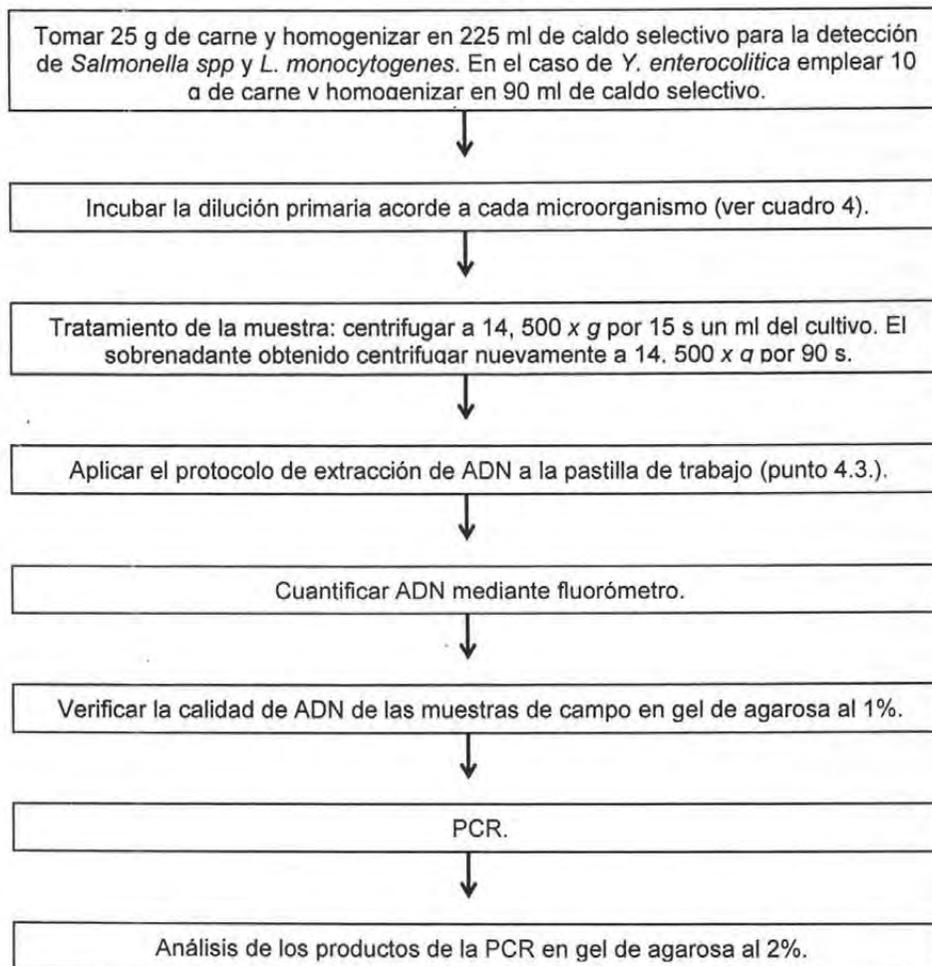


Figura 4. Diagrama de flujo para el análisis de detección de *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* y *Y. enterocolitica* a partir de cortes comerciales (milanesa de res) procedente de supermercados.

5. RESULTADOS

El objetivo de los tres ensayos del límite de detección o mínima cantidad detectable se realizaron para determinar las condiciones adecuadas de la PCR (desnaturalización, alineamiento y extensión) para cada agente bacteriano y, posteriormente, aplicarlas las muestras de campo.

5.1. Límite de detección de la PCR empleando ADN puro bacteriano

Antes de la realización de las diluciones, se verificó la integridad del ADN puro de *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* y *Y. enterocolitica* extraído por el protocolo empleado en este estudio (Figura 5). Posteriormente, el ADN de cada patógeno fue cuantificado mediante un fluorómetro y, posteriormente, se realizaron diluciones dobles seriadas para determinar su límite de detección por la PCR.

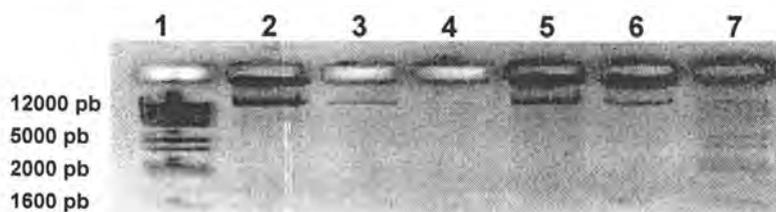


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% donde muestra DNA puro extraído de cultivos puros bacterianos. Carril 1 y 7: marcador de peso Lambda 1kb, carril 2: ADN de *L. monocytogenes*, carril 3-4: ADN de *S. typhimurium* y carril 5-6: ADN de *Y. enterocolitica*.

5.1.1. Límite de detección de la PCR empleando ADN puro de *L. monocytogenes*

La mínima cantidad detectable de ADN para *L. monocytogenes* fue de 0.625 fg/ μ l equivalente a 0.2 genomas o bacterias (Figura 6).

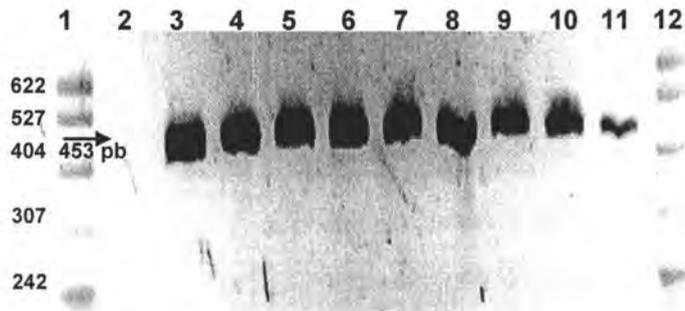


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde muestra el límite de detección de ADN puro de *L. monocytogenes*. Carril 1 y 12: Marcador de peso molecular: pBR322 *MspI*, carril 2: Control negativo, carril 3: 1.314 ng/μl, carril 4: 0.657 ng/μl, carril 5: 0.328 ng/μl, carril 6: 0.164 ng/μl, carril 7: 0.82 pg/μl, P8: 0.41 pg/μl, carril 9: 0.205 pg/μl, P10: 1.25 fg/μl y carril 11: 0.625 fg/μl.

5.1.2. Límite de detección de la PCR empleando ADN puro de *Salmonella spp*

La mínima cantidad detectable de ADN para *S. typhimurium* fue de 2.08984 fg/μl equivalente a 0.4 genomas o bacterias (Figura 7).



Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde muestra el límite de detección de ADN puro de *Salmonella spp*. Carril 1 y 10: Marcador de peso molecular: pBR322 *MspI*, carril 2: 1.3375 ng/μl, carril 3: 0.66875 ng/μl, carril 4: 0.334325 ng/μl, carril 5: 0.1671875 ng/μl, carril 6: 0.835427 pg/μl, carril 7: 0.417948 pg/μl, P8: 2.08984 fg/μl, carril 9: control negativo.

5.1.3. Límite de detección de la PCR empleando ADN puro de *Y. enterocolitica*

La mínima cantidad detectable de ADN para *Y. enterocolitica* fue de 0.78125 fg/μl equivalente a 0.16 genomas o bacterias (Figura 8).

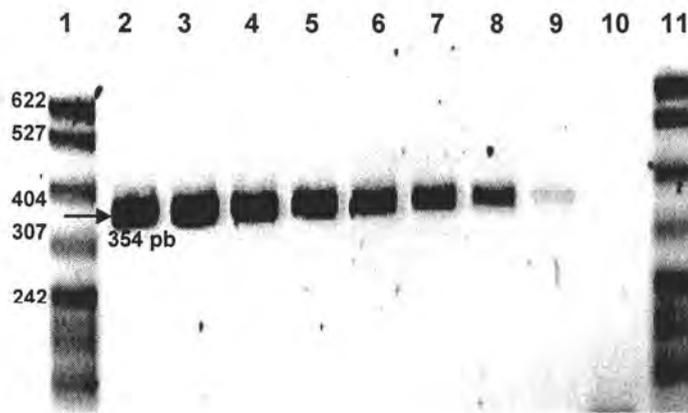


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde muestra el límite de detección de ADN puro de *Y. enterocolitica*. Carril 1 y 11: Marcador de peso molecular: pBR322 *MspI*, carril 2: 2.0 ng/μl, carril 3: 1.0 ng/μl, carril 4: 0.5 ng/μl, carril 5: 0.25 ng/μl, carril 6: 1.25 pg/μl, carril 7: 0.625 pg/μl, P8: 0.15625 pg/μl, carril 9: 0.78125 fg/μl, carril 10: control negativo.

5.2. Límite de detección de UFC por la PCR empleando cultivos puros bacterianos

5.2.1. Límite de detección de UFC por la PCR empleando cultivos puros de *L. monocytogenes*

La mínima cantidad detectable de UFC para *L. monocytogenes* fue de 0.3 UFC/ml partiendo de una concentración inicial de 10^8 UFC/ml (Figura 9).

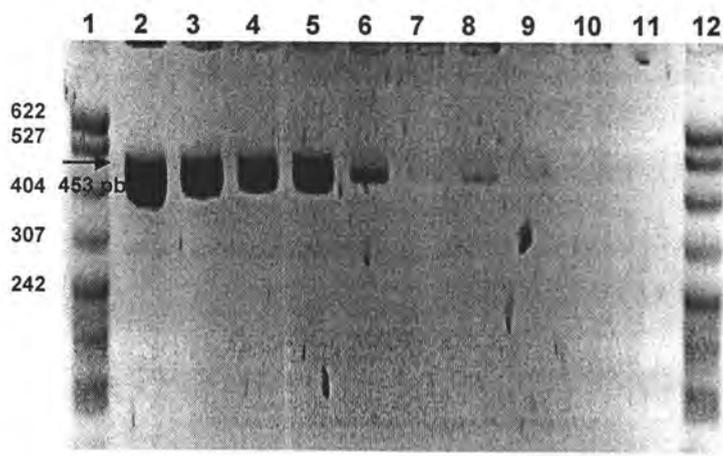


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde muestra el límite de detección de UFC empleando cultivos puros de *L. monocytogenes* partiendo de una concentración inicial de 10^8 UFC/ml. Carril 1 y 12: Marcador de peso molecular: pBR322 *MspI*, carril 2: 10^8 , carril 3: 10^7 , carril 4: 10^6 , carril 5: 10^5 , carril 6: 10^4 , carril 7: 10^3 , carril 8: 30 UFC/ml, carril 9: 3 UFC/ml, carril 10: 0.3 UFC/ml, carril 11: control negativo.

5.2.2. Límite de detección de UFC por la PCR empleando cultivos puros de *Salmonella spp*

La mínima cantidad detectable de UFC para *Salmonella spp* fue de 0.005 UFC/ml partiendo de una concentración inicial de 10^9 (Figura 10).

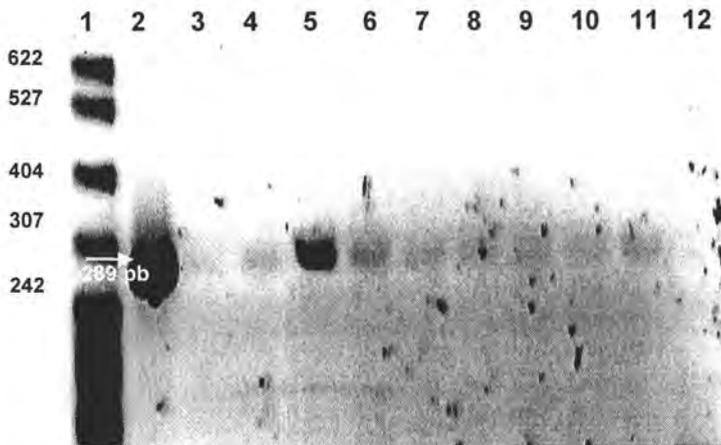


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde muestra el límite de detección de UFC empleando cultivos puros de *S. typhimurium* partiendo de una concentración inicial de 10^9 UFC/ml. Carril 1: Marcador de peso molecular: pBR322 *MspI*, carril 2: 10^9 , carril 3: 10^8 , carril 4: 10^7 , carril 5: 10^6 , carril 6: 10^5 , carril 7: 50 UFC/ml, carril 8: 5 UFC/ml, carril 9: 0.5 UFC/ml, carril 10: 0.05 UFC/ml, carril 11: 0.005 UFC/ml, carril 12: control negativo.

5.2.3. Límite de detección de UFC por la PCR empleando cultivos puros de *Y. enterocolitica*

La mínima cantidad detectable de UFC para *Y. enterocolitica* fue 0.2 UFC/ml partiendo de una concentración original de 10^9 (Figura 11).

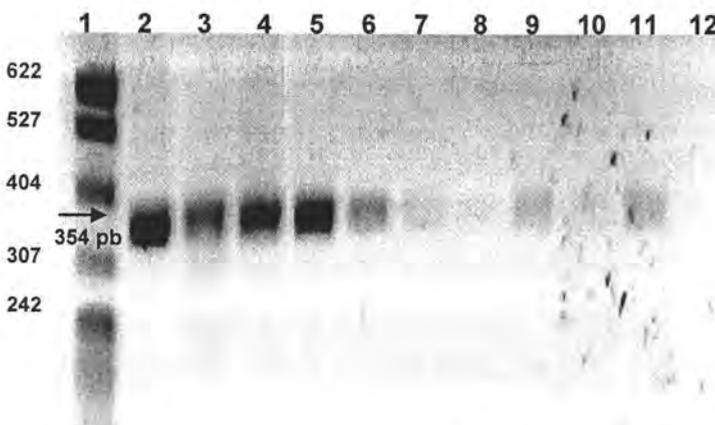


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde muestra el límite de detección de UFC empleando cultivos puros de *Y. enterocolitica* partiendo de una concentración inicial de 10^9 UFC/ml. Carril 1: Marcador de peso molecular: pBR322 *MspI*, carril 2: 10^9 , carril 3: 10^8 , carril 4: 10^7 , carril 5: 10^6 , carril 6: 10^5 , carril 7: 10^4 , carril 8: 200 UFC/ml, carril 9: 20 UFC/ml, carril 10: 2 UFC/ml, carril 11: 0.2 UFC/ml, carril 12: control negativo.

5.3. Límite de detección de UFC por la PCR empleando cultivos con carne bovina inoculada artificialmente con *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* y *Y. enterocolitica*

5.3.1. Límite de detección de UFC por la PCR empleando cultivos con carne bovina inoculada artificialmente con *L. monocytogenes*

La mínima cantidad detectable de UFC para *L. monocytogenes* fue de 30 UFC/g, partiendo de una concentración original de 10^7 (Figura 12).

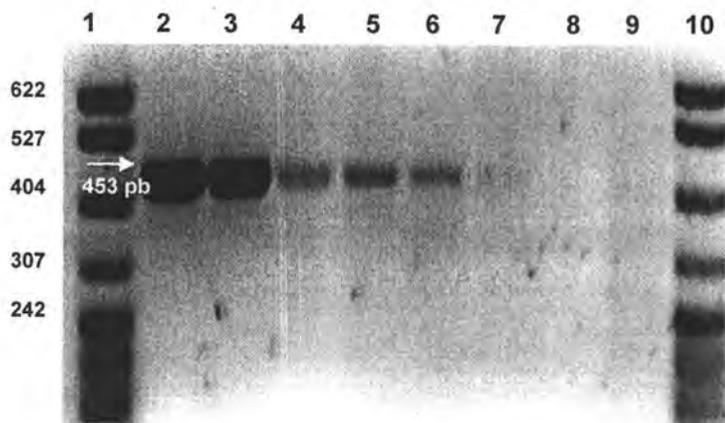


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde muestra el límite de detección de UFC empleando cultivos con carne bovina inoculada artificialmente con *L. monocytogenes* partiendo de una concentración inicial de 10^7 UFC/ml. Carril 1 y 10: Marcador de peso molecular: pBR322 *MspI*, carril 2: 10^7 , carril 3: 10^6 , carril 4: 10^5 , carril 5: 10^4 , carril 6: 10^3 UFC/ml, carril 7: 30 UFC/ml, carril 8: 3 UFC/ml, carril 9: control negativo.

5.3.2. Límite de detección de UFC por la PCR empleando cultivos con carne bovina inoculada artificialmente con *Salmonella spp*

La mínima cantidad detectable de UFC para *S. typhimurium* fue 10 UFC/g a partir de una concentración original de 10^5 (Figura 13).

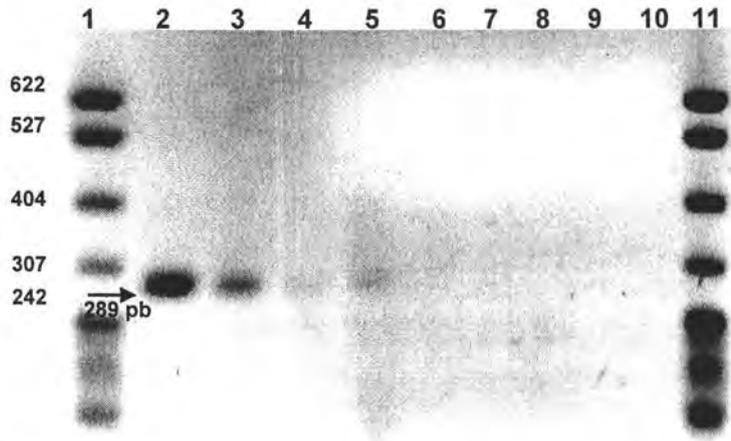


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde muestra el límite de detección de UFC empleando cultivos con carne bovina inoculada artificialmente con *S. typhimurium* partiendo de una concentración inicial de 10^5 UFC/ml. Carril 1 y 11: Marcador de peso molecular: pBR322 *MspI*, carril 2: 10^5 , carril 3: 10^4 , carril 4: 10^3 , carril 5: 10 UFC/ml, carril 6: 1 UFC/ml, carril 7: 0.1 UFC/ml, carril 8: 0.01 UFC/ml, carril 9: 0.001 UFC/ml, carril 10: control negativo.

5.3.3. Límite de detección de UFC por la PCR empleando cultivos con carne bovina inoculada artificialmente con *Y. enterocolitica*

La mínima cantidad detectable para *Y. enterocolitica* fue de 18 UFC/g, partiendo de una concentración original de 10^6 (Figura 14).

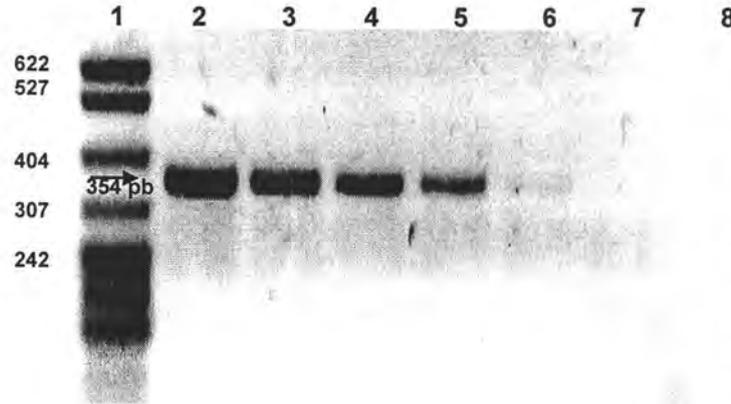


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde muestra el límite de detección de UFC empleando cultivos con carne bovina inoculada artificialmente con *Y. enterocolitica* partiendo de una concentración inicial de 10^6 UFC/ml. Carril 1: Marcador de peso molecular (MPM): pBR322 *MspI*, carril 2: 10^6 , carril 3: 10^5 , carril 4: 10^4 , carril 5: 10^3 , carril 6: 18 UFC/ml, carril 7: 2 UFC/ml, carril 8: control negativo.

5.4. Detección de *L. monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Y. enterocolitica* en muestras de milanesa de res en punto de venta

Antes del análisis por la PCR de las muestras de campo se verificó la calidad e integridad del ADN extraído de las muestras de milanesa de res por el protocolo de extracción aplicado en este estudio (Figura 15).

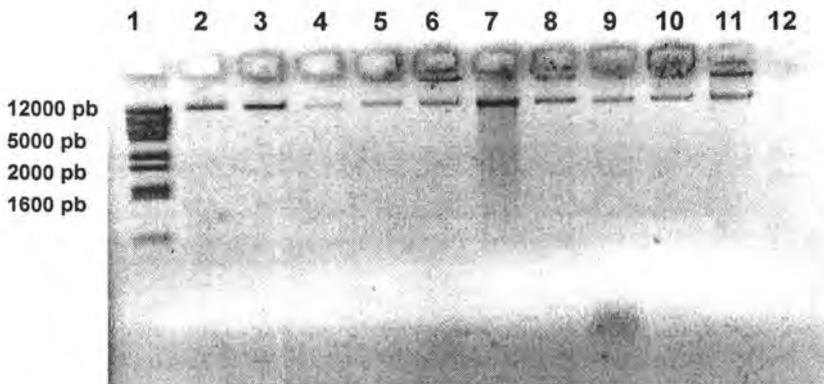


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1% donde muestra ADN extraído de las muestras de campo (milanesa de res). Carril: marcador de peso Lambda 1kb, carril 2 al 11: ADN de muestras de carne.

5.4.1. Detección de *L. monocytogenes* en muestras de milanesa de res en punto de venta

De 90 muestras totales de milanesa de res analizadas en el estudio, 25 muestras fueron positivas en la amplificación de 453 pb correspondientes al gen *iap* de *L. monocytogenes* (Figura 16-A y 16-B).

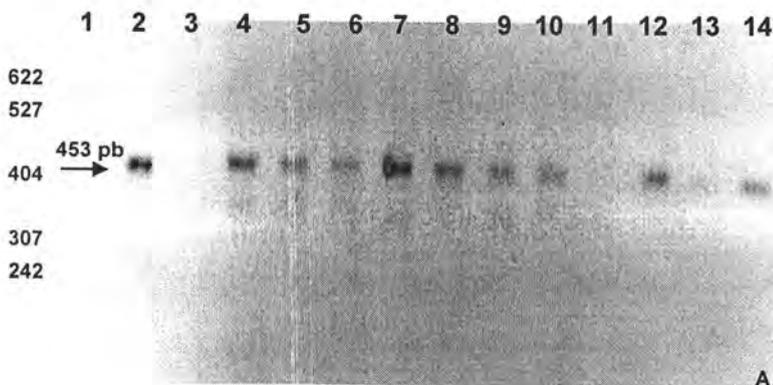


Figura 16-A. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde muestra los resultados positivos a *L. monocytogenes* en milanesa de res mediante la PCR. Carril 1: Marcador de peso molecular: pBR322 *MspI*, carril 2: control positivo, carril 3: control negativo, carril 4-14: muestras positivas.

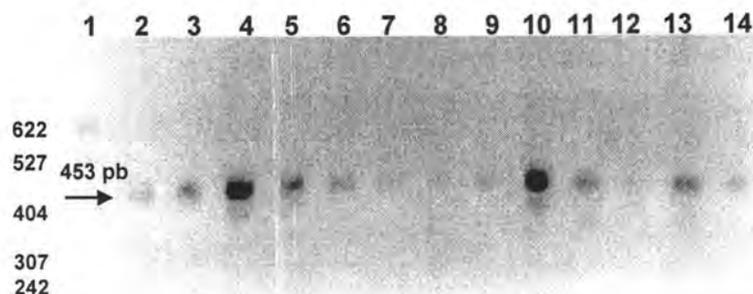


Figura 16-B. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde muestra los resultados positivos a *L. monocytogenes* en milanesa de res mediante la PCR. Carril 1: Marcador de peso molecular: pBR322 *MspI*, carril 2-14: muestras positivas.

B

Las 25 muestras positivas representan el 27.78% del total del muestreo. Con respecto al origen (nacional o importada), 17 fueron de origen nacional y 8 de origen importado, correspondiente al 17.78 y 37.78% de positividad, respectivamente (Cuadro 6).

Cuadro 6. Porcentaje de positividad de *L. monocytogenes* en muestras de milanesa de res en punto de venta

| | Importada | | Nacional | |
|--|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Muestras Positivas | Muestras Negativas | Muestras Positivas | Muestras Negativas |
| México, D.F. | 7 | 13 | 4 | 16 |
| Monterrey, NL. | 0 | 15 | 8 | 7 |
| Villahermosa, Tab. | 1 | 9 | 5 | 5 |
| % total por origen | 17.78 | 82.22 | 37.78 | 62.22 |
| % total del muestreo | 8.89 | 91.21 | 18.89 | 71.11 |
| Número de muestras por origen: 45 nacionales y 45 importadas | | | | |
| % Total de muestras positivas: 27.78% | | | | |
| Número de muestras totales: 90 | | | | |

Los porcentajes de positividad para *L. monocytogenes* con respecto a cada ciudad se exponen en el Cuadro 7.

| Cuadro 7. Porcentaje de positividad de <i>L. monocytogenes</i> por ciudad | | | | |
|--|-----------|----------|--------------|-------------|
| % Positividad | | | | |
| | Importada | Nacional | Total | n= muestras |
| México D.F. | 17.5 | 10 | 27.5 | 40 |
| Monterrey, NL. | 0 | 26.67 | 26.67 | 30 |
| Villahermosa, Tab. | 5 | 25 | 30 | 20 |

5.4.2. Detección de *Salmonella spp* en muestras de milanesa de res en punto de venta

De un total de 90 muestras de milanesa analizadas mediante la PCR, 8 muestras fueron positivas a *Salmonella spp* al amplificar 289 pb correspondiente al gen *invA* (Figura 17).

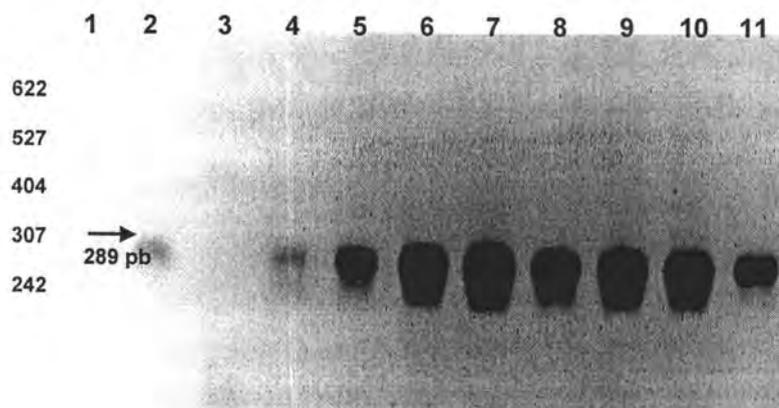


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde muestra los resultados positivos a *Salmonella spp* en milanesa de res mediante la PCR. Carril 1: Marcador de peso molecular: pBR322 *MspI*, carril 2: control positivo, carril 3: control negativo, carril 4-11: muestras positivas.

El porcentaje de positividad corresponde al 8.89% en el total del muestreo. Con respecto al origen (nacional o importada), todas las muestras positivas fueron de origen nacional representando el 17.78% (Cuadro 8).

Cuadro 8. Porcentaje de positividad de *Salmonella spp.* en muestras de milanesa de res en punto de venta

| | Importada | | Nacional | |
|--|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Muestras Positivas | Muestras Negativas | Muestras Positivas | Muestras Negativas |
| México, D.F. | 0 | 20 | 1 | 19 |
| Monterrey, NL. | 0 | 15 | 1 | 14 |
| Villahermosa, Tab. | 0 | 10 | 6 | 4 |
| % total por origen | 0 | 100 | 17.78 | 82.22 |
| % total del muestreo | 0 | 100 | 8.89 | 91.11 |
| % Total de muestras positivas: 17.78% | | | | |
| Número de muestras por origen: 45 nacionales y 45 importadas | | | | |
| Número de muestras totales: 90 | | | | |

Los porcentajes de positividad para *Salmonella spp* con respecto a cada ciudad se exponen en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Porcentaje de positividad de *Salmonella spp* por ciudad

| | % Positividad | | | |
|--------------------|---------------|----------|-------------|-------------|
| | Importada | Nacional | Total | n= muestras |
| México D.F. | 0 | 2.5 | 2.5 | 40 |
| Monterrey, NL. | 0 | 3.33 | 3.33 | 30 |
| Villahermosa, Tab. | 0 | 30 | 30 | 20 |

5.4.3. Detección de *Y. enterocolitica* en muestras de milanesa de res en punto de venta.

De 90 muestras de milanesa de res, se detectó al patógeno en 26 muestras al amplificarse un producto de 354 pb correspondientes en la amplificación del gen *ail* (Figura 18-A y 18-B).

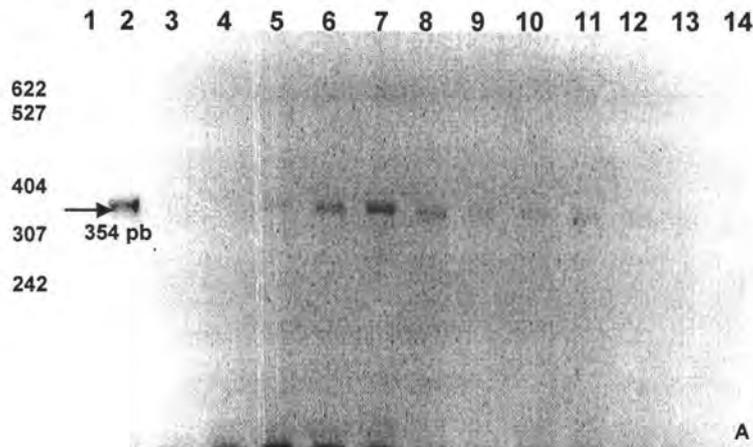


Figura 18-A. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde muestra los resultados positivos a *Y. enterocolitica* en milanesa de res mediante la PCR. Carril 1: Marcador de peso molecular: pBR322 *MspI*, carril 2: control positivo, carril 3: control negativo, carril 4-14: muestras positivas.

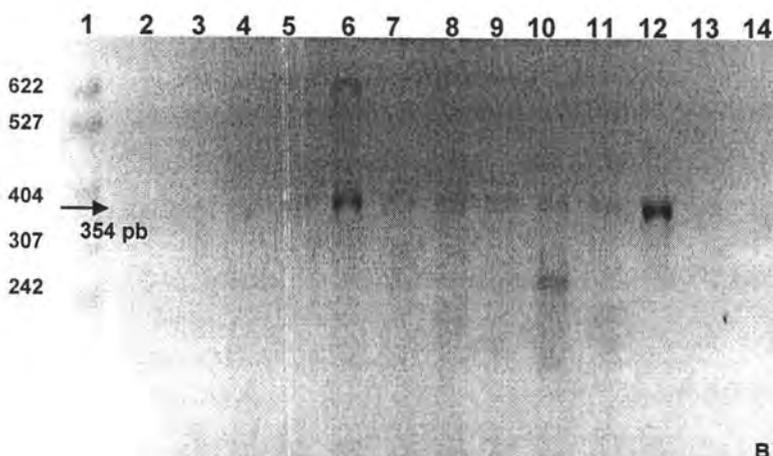


Figura 18-B. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde muestra los resultados positivos a *Y. enterocolitica* en milanesa de res mediante la PCR. Carril 1: Marcador de peso molecular: pBR322 *MspI*, carril 2 al 14: muestras positivas.

Las 26 muestras positivas representan un porcentaje del 28.89% del muestro total. Con respecto al origen (nacional e importada), 15 muestras positivas fueron de origen nacional y 11 muestras de origen importado, correspondiente al 51.92 y 48.08%, respectivamente (Cuadro 10).

Cuadro 10. Porcentaje de positividad de *Y. enterocolitica* en muestras de milanesa de res en punto de venta

| | Importada | | Nacional | |
|--|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Muestras Positivas | Muestras Negativas | Muestras Positivas | Muestras Negativas |
| México, D.F. | 5 | 15 | 11 | 9 |
| Monterrey, NL. | 0 | 15 | 2 | 13 |
| Villahermosa, Tab. | 6 | 4 | 2 | 8 |
| % total por origen | 24.44 | 75.56 | 33.33 | 66.67 |
| % total del muestreo | 12.22 | 87.78 | 16.67 | 33.33 |
| % Total de muestras positivas: 28.89% | | | | |
| Número de muestras por origen: 45 nacionales y 45 importadas | | | | |
| Número de muestras totales: 90 | | | | |

Los porcentajes de positividad para *Y. enterocolitica* con respecto a cada ciudad se exponen en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Porcentaje de positividad de *Y. enterocolitica* por ciudad

| | % Positividad | | | |
|--------------------|---------------|----------|-------------|-------------|
| | Importada | Nacional | Total | n= muestras |
| México D.F. | 12.5 | 27.5 | 40 | 40 |
| Monterrey, NL. | 0 | 6.67 | 6.67 | 30 |
| Villahermosa, Tab. | 30 | 10 | 40 | 20 |

6. DISCUSIÓN

En la actualidad la emergencia de agentes infecciosos bacterianos de origen alimentario es concernida, en mayor parte, por la globalización en la producción y comercio internacional de los alimentos, donde diversos patógenos pueden desplazarse a nuevos nichos dentro de la cadena alimentaria. Desde el inicio de la década de los 90's se han reconocido nuevas formas de adaptación y sobrevivencia bacteriana dentro de la cadena alimentaria (Tauxe, 2002).

Los agentes bacterianos transmitidos en los alimentos representan un importante capítulo en la inocuidad alimentaria mundial. Agentes como *L. monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Y. enterocolitica* pueden contaminar diversos puntos clave en las diferentes etapas de procesamiento, distribución, almacenaje y punto de venta en la industria de la carne. Los tres patógenos analizados en este estudio son responsables de numerosos brotes y casos infecciosos provocados por la ingesta de carne y productos cárnicos contaminados, agua de consumo y otros alimentos. En la actualidad el desarrollo e implementación de métodos moleculares como es la PCR es utilizada para la detección de patógenos bacterianos de origen alimentario y poder asegurar la calidad e inocuidad microbiológica de las fuentes de alimentos.

El ensayo de la PCR desarrollado en este estudio demostró la presencia de *L. monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Y. enterocolitica* en carne bovina procedente de supermercados de las ciudades del Distrito Federal, Monterrey y Villahermosa, México. El porcentaje de ocurrencia o positividad en el total del muestreo en este estudio fue del 27.78% para *L. monocytogenes*, 8.89% para *Salmonella spp* y 28.89% para *Y. enterocolitica*.

Pocos estudios han sido publicados a nivel mundial referente a la detección de *L. monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Y. enterocolitica* en cortes comerciales de carne bovina en punto de venta (en supermercados) mediante la aplicación de la PCR. En el caso de *L. monocytogenes*, el porcentaje de detección del presente estudio,

fue similar a los registrados por Manzano *et al.*, (1997^a), donde los autores detectaron al patógeno en un 25% en carne picada por un método de extracción de ADN a base de proteinasa K. Sin embargo, en un estudio realizado por Peng y Shelef (2001), solamente detectaron a la bacteria en un 15% del total de su muestreo en carne molida de res. Cabe mencionar que, en ambas investigaciones, utilizaron una etapa de enriquecimiento.

Con referencia a estudios publicados en México, Gonzáles *et al.*, (2003), detectaron, mediante la PCR, a *L. monocytogenes* en un 35% del muestreo en un corte comercial de carne de res (New York) expedida en Monterrey, NL, siendo el porcentaje mayor al obtenido en este estudio (26.67%).

Con relación a *Salmonella spp*, nuestros resultados indican un porcentaje de contaminación similar a los obtenidos por Fratamico (2003), y por Peng y Shelef (2001). Los autores detectaron a esta enterobacteria en un 6.5 y 10% en carne molida de res en punto de venta, respectivamente. En ambas investigaciones fue necesaria una etapa de enriquecimiento.

En México, Ríos *et al.*, (2003), detectaron mediante la PCR, a *Salmonella spp* en un 10% del total del muestreo de un corte comercial de carne de res (New York), expedida en Monterrey, NL, siendo el porcentaje mayor al obtenido en este estudio (3.3%).

Con respecto a *Y. enterocolitica*, su detección mediante la PCR en muestras de carne bovina es escasa debido a que el agente es más comúnmente investigado en muestras de carne, lengua y productos de origen porcino. Estudios epidemiológicos demuestran la correlación entre el desarrollo de la yersiniosis y el consumo de estos productos. No obstante, en un estudio realizado por Vishnubhatla *et al.*, (2001) encontraron al agente en un 31% del total del muestreo en carne molida de res; mientras, que Fredriksson-Ahomaa *et al.*, (1999) la detectaron en un 25% en carne picada a nivel de venta en distintas áreas de

Helsinki, Finlandia. Los porcentajes de positividad de estos estudios fueron similares al hallado en este estudio.

Los resultados de este estudio exponen que el porcentaje de positividad de *L. monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Y. enterocolitica* fueron distintos en las tres ciudades. Se encontró un porcentaje de ocurrencia mayor al 30% de los tres patógenos bacterianos en la región sur (Cd. de Villahermosa, Tab.), en comparación con las otras ciudades. En las muestras analizadas procedentes de la Cd. de Monterrey, NL., *L. monocytogenes* registró un porcentaje mayor en relación con las dos enterobacterias. Con respecto a la Cd. del D.F., *Salmonella spp* registró un porcentaje de positividad menor al 5%. Los resultados de este estudio son significativos, pero no representativos de la región e inclusive para cada ciudad.

Con referencia al origen de la muestra (nacional e importada), señalan un porcentaje mayor de contaminación de los tres patógenos en carne nacional *versus* importada. Lo anterior se fundamenta con el historial microbiológico, que en el caso de la carne importada, las medidas de descontaminación en las canales bovinas, probablemente, influyan en el porcentaje de positividad. Desde 1996, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y el Servicio de Inspección e Inocuidad Alimentaria (FSIS) propusieron reformas para la industria en la carne bovina, con el objeto de reducir la contaminación y presencia de patógenos. Las reformas implicaban la aplicación obligatoria del HACCP, la realización de pruebas de monitoreo y detección de patógenos como *Salmonella spp* y *E. coli* O157:H7 en canales de res y productos cárnicos crudos (USDA-FSIS, 1996). De acuerdo a estudios reportados en los EUA, la contaminación más evidente de la canal proviene durante el desollado y eviscerado durante el proceso de sacrificio del animal, por lo que la aproximación a la reducción de la concentración microbiana en las canales bovinas incluye, principalmente, la aplicación de algún método de descontaminación de tipo físico, químico o la combinación de ambos. La descontaminación es ampliamente utilizada en las

plantas de sacrificio en los EUA y en algunas países de Europa, más no así en México (Bacon *et al.*, 2000). La reducción microbiana en las canales bovinas ha sido ampliamente investigada, reportándose hasta una disminución de 2 a 3 log en la carga microbiana final (Sofos y Smith, 1998; Bolder, 1997).

La contaminación de la carne bovina por patógenos bacterianos es o no representativa después del momento del sacrificio, sin embargo, las subsecuentes etapas de distribución, manejo y conservación pueden aumentar el grado de contaminación. En este estudio, el porcentaje de positividad por *L. monocytogenes* y *Y. enterocolitica* fueron superiores con respecto al encontrado para *Salmonella spp* en las muestras comerciales de milanesa de res. El porcentaje de contaminación por *L. monocytogenes* y *Y. enterocolitica* se encuentra relacionado a una característica peculiar de ambos patógenos: son capaces de mantenerse viables a temperatura de refrigeración e incluso de congelación. Esta característica psicrófila resalta aún más su importancia como patógenos en la inocuidad alimentaria, ya que su permanencia durante toda la cadena de frío ha sido reportada (Kounev, 1987; Farber *et al.*, 1994).

Asociado a lo anterior, el porcentaje de positividad esta relacionado con la contaminación cruzada existente en el punto de venta. Este tipo de contaminación es una de las principales vías por la cual *L. monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Y. enterocolitica* logran diseminarse en la carne fresca. Los tres patógenos pueden adherirse y sobrevivir en distintas superficies de instalaciones y equipo como son el acero inoxidable, fibra de vidrio y plásticos que son empleados durante el corte y empaque de la carne fresca. Chmielewski y Frank (2003) reportaron que la adherencia óptima de *L. monocytogenes* y *Y. enterocolitica* se establecía dentro de un rango de pH de 7 a 8 y una temperatura de 10 a 21 C° en distintas superficies.

En el caso particular de *L. monocytogenes*, el porcentaje de ocurrencia esta relacionada con la característica de que el agente se encuentra ampliamente

distribuido en el ambiente, en varias especies animales y en diferentes alimentos (Farber y Peterkin, 1991). Se ha documentado que el ingreso de este agente bacteriano al área de trabajo ocurre principalmente por las manos de los operadores (Kerr *et al.*, 1993). La contaminación cruzada se ha reportado en este agente mediante el contacto con el equipo de producción, herramientas y superficies de trabajo donde la bacteria se instala regularmente (Reija y Den Aantrekker, 2004). Allan *et al.*, (2004), comprobaron que esta bacteria Gram positiva puede sobrevivir en distintas superficies utilizadas durante el procesamiento y manipuleo de la carne. Asimismo, se ha reportado su persistencia por largos periodos en diversas superficies como acero inoxidable, plásticos y madera, entre otros, a pesar de los programas de limpieza y desinfección aplicados (Holah *et al.*, 2002; Somers y Wong, 2004). En otros estudios se ha reportado la sobrevivencia de otras bacterias como *Salmonella spp* y *C. jejuni* en superficies de acero inoxidable, manteniéndose por largo tiempo, siendo una importante fuente de contaminación cruzada (Kusumaningrum *et al.*, 2003).

El ensayo de la PCR desarrollado en este estudio mostró un límite de detección de 30 ufc/g de alimento para *L. monocytogenes*, 10 UFC/g para *S. typhimurium* y 20 UFC/g para *Y. enterocolitica*. Los límites de detección hallados en este estudio se encuentran íntimamente relacionados con los tres métodos de tratamiento aplicados a la muestra previa a su análisis por la PCR. De acuerdo a Rådström *et al.* (2004), la eficiencia y eficacia del tratamiento de la muestra influye directamente en la amplificación durante la PCR. En otro estudio, Lantz *et al.*, (1994), reportaron que la variación en el límite de detección es debido principalmente a otros factores como son el tipo y matriz de la muestra, el método de extracción del ADN aplicado y en la concentración y clase de inhibidores presentes en la muestra, que, en el caso de la matriz de la carne, contiene una alta concentración de inhibidores de la PCR como son diferentes iones, colágeno, lípidos, glucógeno y mioglobina (Wilson, 1997).

Se han reportado varios límites de detección de UFC para *L. monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Y. enterocolitica* a partir de distintas matrices de alimentos. En una revisión realizada por Scheu *et al.*, (1998) exponen que el límite de detección se encuentra en un rango de 1 a 10 células o UFC/g o ml a partir de cultivos puros, mientras que en muestras de alimentos disminuye considerablemente. Lo anterior se refleja en los resultados en este estudio, donde, la mínima cantidad detectable en los ensayos con cultivos puros fueron superiores *versus* cultivos inoculados artificialmente. La variación en los límites de detección es debido a los factores antes mencionados, sin embargo, la presencia de inhibidores presentes en el alimento o adquiridos durante el tratamiento de la muestra son los dos principales factores.

Es necesario mencionar que en este estudio se aplicó una etapa de enriquecimiento selectivo con la finalidad de disminuir la presencia de los inhibidores presentes en la matriz de la carne (Herman, 1997), aumentar la probabilidad de detección de ADN de células bacterianas viables y disminuir la detección de ADN de células bacterianas muertas y células viables no cultivables; evitando así, obtener resultados falsos positivos. Sin embargo, a pesar de la etapa de enriquecimiento selectivo, se ha reportado que ADN de células muertas puede persistir (Josephson *et al.*, 1993, Dupray *et al.*, 1997; McKillip *et al.*, 2004), y, consecuentemente, lograr una posible amplificación durante la PCR.

El ensayo de la PCR desarrollado en este estudio puede ser utilizado como una herramienta de detección de *L. monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Y. enterocolitica* en conjunción con los métodos microbiológicos oficiales durante el análisis microbiológico de carnes frescas de origen bovino, permitiendo optimizar el número de muestras examinadas durante el proceso de comercialización y monitores microbiológico en esta etapa (punto de venta). Debe señalarse que a pesar de que este ensayo obtuvo un resultado (presencia o ausencia) a las 48 h en el caso de las dos enterobacterias y de 72 h para *L. monocytogenes*, este

tiempo es aún significativamente corto en comparación con los métodos microbiológicos estándar que son aproximadamente de 7 días.

La detección de *L. monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Y. enterocolitica* en cortes de milanesa de res provenientes de supermercados, indican que este alimento podría ser un vehículo potencial en la transmisión de estos tres patógenos debido a la probable existencia de la dosis mínima infectante de cada patógeno; sugiriendo un riesgo en la salud de la población general y, particularmente, a grupos de alto riesgo como niños, ancianos, inmunosuprimidos y embarazadas. Asimismo, estos resultados indican la revisión necesaria del correcto funcionamiento de los programas preventivos como son las Buenas Prácticas de Higiene y Sanidad, de los Procedimientos de Operación Estándar de Sanitización (POES) y del Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (HACCP) realizados por la empresa

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

7. CONCLUSIONES

El ensayo de la PCR desarrollado en este estudio fue capaz de detectar a bajas concentraciones de UFC para *L. monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Y. enterocolitica* en muestras comerciales de carne bovina (milanesa de res) expedida en punto de venta, por lo que nuestros resultados obtenidos son confiables en la determinación de la ausencia o presencia de estos tres patógenos bacterianos para el análisis de muestras contaminadas naturalmente. La obtención de un resultado por nuestro ensayo de la PCR fueron de 48 h para las dos enterobacterias y 72 h para *L. monocytogenes*. Este tiempo es significativamente corto en comparación con los métodos microbiológicos oficiales que son aproximadamente de 7 días. En la industria de los alimentos, al utilizar la PCR en conjunción con los métodos microbiológicos oficiales permiten optimizar el proceso de comercialización y monitoreo de la inocuidad microbiológica de la carne, además de conseguir conocimiento de la frecuencia de *L. monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Y. enterocolitica* en punto de venta, dado que la legislación sanitaria nacional e incluso internacional especifican, que en el caso de *L. monocytogenes* y *Salmonella spp*, su ausencia en 25 g de alimentos. Los resultados de este estudio sugieren un riesgo potencial en materia de salud pública e indican la revisión de los programas preventivos, de las prácticas de higiene y sanidad realizados en la empresa. Los datos obtenidos en este estudio son fundamentales para la estandarización del ensayo de la PCR en la detección de *L. monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Y. enterocolitica* en cortes comerciales de carne de origen bovino así como del desarrollo de un PCR múltiplex.

8. REFERENCIAS

1. Allan JT, Yan Z, Kornacki JL. Surface material, temperature, and soil effects on the survival of selected foodborne pathogens in the presence of condensate. *J Food Prot* 2004;67:2666-70.
2. Altekruze SF, Cohen ML, Swerdlow DL. Emerging foodborne diseases. *Emerg infec Dis* 1997;3:285-93.
3. Aluja AS, Paasch LM, Mendez D, Uruchurtu AM. Higiene, sacrificio y desperdicio en algunos rastros del país. *Vet. Mex* 1974;5:105-14.
4. Asociación Nacional de Tiendas de Autoservicio y Departamentales. ANTAD. 2002. Disponible en: http://www.antad.org.mx/f_asociados.html.
5. Bacon RT, Belk KE, Sofos JN, Clayton RP, Reagan JO, Smith GC. Microbial populations on animal hides and beef carcasses at different stages of slaughter in plants employing multiple-sequential interventions for decontamination. *J Food Prot* 2000;63:1080-86.
6. Beach JC, Murano EA, Acuff GR. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in beef cattle from transport to slaughter. *J Food Prot* 2002;65:1687-93.
7. Bello PL. Serotypes of *Salmonella* identified in chorizos for sale in Acapulco, Guerrero, México. *Rev Latinoam Microbiol* 1993;35:377-81.
8. Bello PL, Ortiz DM, Pérez ME, Castro DV. *Salmonella* in raw meat: a study in towns of the state of Guerrero. *Salud Pub Mex* 1990;32:74-79.
9. Bliska JB, Falkow S. Bacterial resistance to complement killing mediated by the *ail* protein of *Yersinia enterocolitica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3561-65.
10. Bolder NM. Decontamination of meat and poultry carcasses. *Trends Food Sci Tech* 1997;8:221-27.
11. Castañeda PE, Díaz AE, Hernández AL, Jaramillo AJ. Identification and typing of *Yersinia enterocolitica* biotypes and serotypes isolated. *Rev Saude Pública* 2000;35:380-84.
12. Castillo AA, Salas UM, Márquez PM, Osorio HM. Incidence of *Campylobacter spp* and *Salmonella spp* in raw and roasted chicken in Guadalajara, México. *Rev Latinoam Microbiol* 1993;35:371-75.
13. Chávez DM, Higuera IA, Huertas JM, Báez MR, Morales DJ, Arteaga CF, Rangel FS, Ponce DS. Brote por *Salmonella enteritidis* en trabajadores de un hospital. *Salud Pub Mex* 2001;43:211-16.
14. Chmielewski RAN, Frank JF. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2003;2:22-32.
15. Centers for Disease Control and Prevention. CDC. US Foodborne Disease Outbreaks. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Foodborne Illnesses -Selected Sites- United States. *MMWR. Morbid Mortal Wkly Rep.* 2003. 52: 340-343. Disponible en: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5215a4.htm>.
16. Confederación Nacional de Organizaciones Ganaderas. CNOG. Información Económica Pecuaria No 12. México 2003.
17. de Boer E. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from foods. *Contrib Microbiol Immunol* 1995;13:71-72.

18. de Boer E, Beumer RR. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *Int J Food Microbiol* 1999;50:119-30.
19. Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ eds. *Microbiología en alimentos. Fundamentos y Fronteras*. ASM Press, Washington, DC. 1997.
20. Dupray E, Caprais MP, Derrien A, Fach P. *Salmonella* DNA persistence in natural seawaters using PCR analysis. *J Appl Microbiol* 1997;82:507.
21. Estrada GT, López SC, Zamarripa AB, Thompson MR, Gutiérrez CL, Mancera MA, Escobar GA. Prevalence of *Escherichia coli* and *Salmonella spp* in street-vended food of open markets (tianguis) and general hygienic and trading practices in México City. *Epidemiol Infect* 2004;132:1181-84.
22. Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev* 1991;55:476-511.
23. Farber JM, Daley E. Presence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally-contaminated meats. *Int J Food Microbiol* 1994;22:33-42.
24. Fenwick SG, Murray A. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by polymerase chain reaction. *The Lancet* 1991;23:496-97.
25. Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura en el Banco de México. FIRA. Oportunidades de desarrollo de la industria de la carne de bovino en México. Marzo 1999. [Series on line], Disponible: <http://www.fira.gob.mx/Publicaciones/Boletines.asp>.
26. Food Safety and Inspection Service (FSIS). Pathogen Reduction; Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems; Final Rule. Washington, DC. 1996.
27. Fratamico PM. Comparison of culture, polymerase chain reaction (PCR), TaqMan *Salmonella*, and Transia Card *Salmonella* assays for detection of *Salmonella spp*. in naturally-contaminated ground chicken, ground turkey, and ground beef. *Mol Cell Prob* 2003;17:215-21.
28. Fredriksson-Ahomaa M; Hielm S, Korkeala H. High Prevalence of *yadA*-Positive *Yersinia enterocolitica* in Pig Tongues and Minced Meat at the Retail Level in Finland. *J Food Prot* 1999;62:123-27.
29. Fukushima H, Gomyoda M. Inhibition of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 by natural microflora of pork. *Appl Environ Microbiol* 1986;51:990-94.
30. Galán JE, Ginocchio C, Costeas P. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *InvA* to members of a new protein family. *J Bacteriol* 1992;74:4338-49.
31. Galland JC. Risks and prevention of contamination of beef carcasses during the slaughter process in the United States of America. *Rev Sci Tech* 1997;16:395-404.
32. Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM. Methods for the isolation and identification of *Listeria spp* and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiol Rev* 2005. In Press.
33. González K, Martínez VI, Mata TV, Espinosa MA, Álvarez OG, Morales LA. Detección molecular de *Listeria monocytogenes* en carne de res. *Revista Salud Pública y Nutrición*. 2004.
34. Gutiérrez CL, Montiel VE, Aguilera PP, González AM. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Salud Pub Mex* 2000;42:490-95.
35. Herman L. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* by PCR. *Food Microbiol* 1997;14:103-10.

36. Heredia N; Santos G, Rojas G; Salazar L. Microbiological Condition of Ground Meat Retailed in Monterrey, México. *J Food Prot* 2001;64:1249-51.
37. Hernández AN. Frecuencia de *Campylobacter jejuni* y *Yersinia enterocolitica* como agentes etiopatogénicos de gastroenteritis aguda en pacientes pediátricos del HR 20 de noviembre ISSSTE (Tesis Licenciatura). México: FES-Z, UNAM, 1993.
38. Hillers VN, Medeiros L, Kendall P, Chen G, DiMascola S. Consumer food-handling behaviors associated with prevention of 13 foodborne illnesses. *J Food Prot* 2003;66:1893-99.
39. Holah JT, Taylor JH, Dawson DJ, Hall KE. Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol* 2002; supplement 1, 92:111-20.
40. Huffman RD. Current and future technologies for the decontamination of carcasses and fresh meat. *Meat science* 2002;62:285-294.
41. Institute of Food Technologists. IFT. Expert Report on Emerging Microbiological Food Safety Issues: Implications for Control in the 21st Century. Report section: Microbial Ecology and Foodborne Disease. Atlanta, Georgia. 20 February 2000.
42. Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis. INPPAZ. World Health Organization/Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO/WHO. 2do Foro Mundial de Autoridades de Reglamentación sobre Inocuidad de los Alimentos. Cooperación internacional para el monitoreo de la contaminación de alimentos y la vigilancia de enfermedades transmitidas por alimentos. Estudio de caso en la Región AMOR. 12-14 octubre 2004, Bangkok, Tailandia.
43. International Commission on Microbial Specifications for Foods. ICMSF. Microorganismos de los alimentos 6. Ecología microbiana de los productos alimentarios. Acribia, España, 1998.
44. International Commission on Microbial Specifications for Foods. ICMSF. Microorganismos de los alimentos 2. Métodos de muestreo para análisis microbiológicos: principios y aplicaciones especificadas. 2ª ed. Acribia, España, 2000.
45. Iñiguez PC. Detección y prevalencia de *Listeria monocytogenes* en queso fresco por la Reacción en Cadena de la Polimerasa y método oficial (Tesis de Maestría). Sonora, México: Univ de Sonora, 2002.
46. Johnson JL, Doyle MP, Cassens RG, Schoeni JL. Fate of *Listeria monocytogenes* in tissues of experimentally infected cattle and in hard salami. *Appl Environ Microbiol* 1988;54:497.
47. Josephson KL, Gerba CP, Pepper IL. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:3513-15.
48. Kerr KG, Birkenhead D, Seale K, Major J, Hawkey PM. Prevalence of *Listeria spp* on the hands of food workers. *J Food Prot* 1993;56:525-27.
49. Kounev Z. Resistance of *Yersinia enterocolitica* in deep frozen meat. *Food Industry Science* 1987;3:35-38.
50. Kuhn M, Goebel W. Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infect Immun* 1989;57:55-61.
51. Kusumaningrum HD, Riboldi G, Hazeleger WC, Beumer RR. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *Int J Food Microbiol* 2003;85:227-36.

52. Lantz PG, Hahr-Hagerdal B, Rådström P. Sample preparation methods in PCR-based detection of food pathogens. *Trends Food Sci Tech* 1994;5:384-89.
53. Lantz PG, Knutsson R, Blixt Y, Al Soud WA, Borch E, Radstrom P. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in enrichment media and pork by a multiplex PCR: a study of sample preparation and PCR-inhibitory components. *Int J Food Microbiol* 1998;45:93-105.
54. Luis-juan MA, Alaniz A, Vázquez ME, Rosas BT. Prevalence of *L. monocytogenes* in raw milk in Guadalajara, Jalisco. *J Food Prot* 1995;58:1139-41.
55. Malorny B, Hoorfar J, Hugas M, Heuvelink A, Fach P, Ellerbroek L, Bunge C, Dorn C, Helmuth R. Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method. *Int J Food Microbiol* 2003^a;89:241-49.
56. Malorny B, Tassios PT, Rådström P, Cook N, Wagner M, Hoorfar J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol* 2003^b;83:39-48.
57. Manzano M, Cocolin L, Cantoni C, Comi G. A simple and fast PCR protocolo to detec *Listeria monocytogenes* from meat. *J Sci Food Agric* 1997;74:25-30.
58. McEvoy JM, Doherty AM, Sheridan JJ, Blair IS, McDowell DA. The prevalence of *Salmonella spp* in bovine faecal, rumen and carcass samples at a commercial abattoir. *J Appl Microbiol* 2003;94:693-700.
59. McKillip J, Drake M. Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food. *J Food Prot* 2004;67:823-32.
60. McPherson MJ, Moller SG. PCR. Bios Scientific Publishers Limited. 2000. USA. 1-65.
61. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999;5:607-25.
62. Millar BC, Jiru X, Moore JE, Earle JAP. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *J Microbiol Methods* 2000;42:139-47.
63. Miller VL, Farmer JJ 3rd, Hill WE, Falkow S. The *ail* locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes commonly associated with disease. *Infect Immun* 1989;57:121-31.
64. Najera GMC. Aislamiento de *Yersinia enterocolitica* a partir de muestras obtenidas de niños con diarrea (Tesis Licenciatura). México: FQ-UNAM, 1988.
65. National Agricultural Statistics Service (NASS). United States of Department of Agriculture (USDA). 2004.
66. Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos.
67. Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1995. Bienes y Servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*.
68. Olsen JE. DNA-based methods for detection of food-borne bacterial pathogens. *Food Res Int* 2000;33:257-66.
69. Pedroza B JL. Importancia de *Campylobacter fetus* subespecie *jejuni* y *Yersinia enterocolitica* como agentes causantes de diarrea aguda en niños en la ciudad de México (Tesis Licenciatura). México: FES-C, UNAM, 1981.
70. Peng H, Shelef LA. Automated simultaneous detection of low levels of listeriae and salmonellae in foods. *Int J Food Microbiol* 2001;63:225-33.

71. Rådström P, Knursson R, Wolffs P, Lövenklev M, Löfström C. Pre-PCR Processing: Strategies to Generate PCR-Compatible Samples. *Mol Biotech* 2004;26:133-46.
72. Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio C, Curtiss R, Gyles CL. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol Cell Prob* 1992;6:271-79.
73. Ramírez EI, Vázquez-SC, Rodas SO, Pedroche FF. Isolation of *Yersinia* from raw meat (pork and chicken) and precooked meat (porcine tongues and sausages) collected from commercial establishments in México City. *J Food Prot* 2000;63:542-44.
74. Reid CA, Small A, Avery SM, Buncic S. Presence of food-borne pathogens on cattle hides. *Food control* 2002;13:411-15.
75. Reija MW, Den Aantrekker ED. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *Int J Food Microbiol* 2004;91:1-11.
76. Ríos LJ, Martínez VI, Mata TV, Espinoza MA, Álvarez OG, Morales LA. Uso de la prueba molecular de PCR para la detección de *Salmonella spp* en carne de bovino. *Rev Salud Púb Nutr* 2004.
77. Rivera-Betancourt M, Shackelford SD, Arthur TM, Westmoreland KE, Bellinger G, Rossman M, Reagan JO, Koochmaraie M. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in two geographically distant commercial beef processing plants in the United States. *J Food Prot* 2004;67:295-302.
78. Robertson A, Tirado C, Lobstein T, Jermini M, Knai C, Jensen JH, Ferro-Luzzi A, James WPT. Food and health in Europe: a new basis for action. WHO Regional Publications, European Series, No. 96. [Series on line], Disponible en: <http://www.euro.who.int/document/E82161.pdf>.
79. Ruiz FA. Impacto Del TLCAN en la cadena de valor de bovinos para carne. Universidad Autónoma Chapingo. Enero, 2004.
80. Sambrook, Russell DW. Molecular Cloning. A laboratory manual 1. 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA, 2001.
81. Schlech WF. Foodborne listeriosis. *Clin Infect Dis* 2000;31:770-75
82. Schlosser W, Hogue A, Ebel E, Rose B, Umholtz R, Ferris K, James W. Analysis of Salmonella serotypes from selected carcasses and raw ground products sampled prior to implementation of the Pathogen Reduction; Hazard Analysis and Critical Control Point Final Rule in the US. *Int J Food Microbiol* 2000;58:107-11.
83. Schlundt J. New directions in foodborne disease prevention. *Int J Food Microbiol* 2002;78:3-17.
84. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. SAGARPA. Situación actual de la producción de carne de bovino en México. *Claridades Agropecuarias*. 2002;109:3-32.
85. Secretaria de Salud. SSA. Dirección General de Epidemiología. Información Estadística 2002. Disponible en: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/infoepi/index.htm>.
86. Scheu PM, Berghof K, Stahl U. Detection of pathogenic and spoilage micro-organisms in food with the polymerase chain reaction. *Food Microbiol* 1998;15:13-31.
87. Silhavy TJ, Berman ML, Enquist LW. Experiments with gene fusion. Cold Spring Harbor laboratory, New York, USA 1984.

88. Sofos JN, Smith GC. Nonacid meat decontamination technologies: model studies and commercial applications. *Int J Food Microbiol* 1998;44:171-88.
89. Sofos JN, Kochevar SL, Reagan JO, Smith GC. Incidence of *Salmonella* on beef carcasses relating to the U.S. meat and poultry inspection regulations. *J Food Prot* 1999^a;62:467-73.
90. Sofos JN, Kochevar SL, Bellinger GR, Buege DR, Hancock DD, Ingham SC, Morgan JB, Reagan JO, Smith GC. Sources and extent of microbiological contamination of beef carcasses in seven United States slaughtering plants. *J Food Prot* 1999^b;62:140-45.
91. Somers EB, Wong AC. Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. *J Food Prot* 2004;67:2218-29.
92. Tauxe RV. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerg Inf Dis* 1997;3:425-434.
93. Tauxe RV. Emerging foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol* 2002;78:31-4.
94. United States of Department of Agriculture (USDA). Food Safety and Inspection Service (FSIS). Pathogen Reduction; Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems; Final Rule. Washington, DC. 1996.
95. Vázquez SC, Rodas SO, Quiñones RE. Occurrence of *Listeria* species in raw milk in farms on the outskirts of México City. *Food Microbiol* 2001;18:177-81.
96. Villanueva MV. Memorias Comisión de Ganadería: Foro sobre rastro, clandestinaje, contaminación y recría del ganado lechero. Comisión de ecología y medio ambiente. Noviembre 1998. [Series on line]. Disponible en: <http://www.cddhcu.gob.mx/camdip/comlvii/comeco/foro3/presenta.htm>.
97. Vishnubhatla A; Oberst RD; Fung DY; Wonglumsom W; Hays MP; Nagaraja TG. Evaluation of a 5-Nuclease (TaqMan) Assay for the Detection of Virulent Strains of *Yersinia enterocolitica* in Raw Meat and Tofu Samples. *J Food Prot* 2001;64:355-60.
98. Voetsch AC, Van Gilder TJ, Angulo FJ, Farley MM, Shallow S, Marcus R, Cieslak PR, Deneen VC, Tauxe RV. FoodNet estimate of the burden of illness caused by non-typhoidal *Salmonella* infections in the United States. *Clin Infect Dis* 2004;38:127-34.
99. Vugia DJ, Samuel M, Farley MM, Marcus R, Shiferaw B, Shallow S, Smith K, Angulo FJ. Invasive *Salmonella* infections in the United States, FoodNet, 1996-1999: incidence, serotype distribution, and outcome. *Clin Infect Dis* 2004;38:149-56.
100. Walmart de México, 2002. Disponible en: <http://www.walmartmexico.com.mx>.
101. Wilcock A, Pun M, Khanona J, Aun M. Consumer attitudes, knowledge and behaviour: a review of food safety issues. *Trends Food Sci Tech* 2004;15:56-66.
102. Wilson IA. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification: minireview. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:3741-51.
103. World Health Organization 2001. Annex table 2 deaths by cause, sex and mortality stratum in WHO regions. Estimates 2000. The World Health Report 2001. WHO. Geneva.
104. World Health Organization/Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO/WHO. 2do Foro Mundial de Autoridades de Reglamentación sobre Inocuidad de los Alimentos. 12-14 octubre 2004. Bangkok, Tailandia.