

Avalúo Microbiológico de Peligros y Comparación de la Carne Molida de  
Venta al Detal de Procesadores Locales de Puerto Rico y los Importados de  
Estados Unidos

Por:  
Norman Noriel Arroyo Llantín

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

Maestro en Ciencias  
en  
Ciencia y Tecnología de Alimentos

Universidad de Puerto Rico  
Recinto Universitario de Mayagüez  
2008

Aprobado por:

-----  
Lynette E. Orellana, PhD.  
Presidenta, Comité Graduado

-----  
Día

-----  
Aixa Rivera, MS.  
Miembro, Comité Graduado

-----  
Día

-----  
Américo Casas, MS.  
Miembro, Comité Graduado

-----  
Día

-----  
Anand D. Sharma, PhD  
Representante de Estudios Graduados

-----  
Día

-----  
Edna Negrón, PhD.  
Directora del Departamento

-----  
Día

## **Abstract**

Foodborne diseases are a threat to public health. The presence of bacteria such as *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in ground beef are a major concern in retail establishments. In this study a microbiological risk assessment was conducted for pathogenic and spoilage bacteria on retail ground beef from local processors in Puerto Rico and that imported from the United States. Chromogenic media reactions were used for isolation and identification of pathogenic and spoilage bacteria. Total aerobic counts were obtained by plating samples onto Plate Count Agar (PCA). There was no trace of pathogenic bacteria such as *Staphylococcus aureus* and *E. coli* O157:H7 in the 24 ground beef samples analyzed. Statistically there were no significant differences between ground beef from local processors and imported from the U.S. for the aerobic plate count (5.1670 log cfu/gr and 5.2971 log cfu/gr Puerto Rico and U.S., respectively) and *Enterococcus* (5.2302 log cfu/gr and 5.2665 log cfu/gr Puerto Rico and E.U., respectively). However, significant differences ( $P \geq 0.05$ ) were found between retail establishment and each visit. To prevent the presence of these disease causing and spoilage bacteria, retailers should follow good manufacturing practices, good hygiene and handling practices, and the Food Safety Inspection Service (FSIS) Food Code.

## Resumen

Las enfermedades transmitidas por alimentos son una amenaza a la salud pública de los consumidores. La presencia de bacterias como *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* en alimentos, como la carne molida, es una preocupación en lugares de venta al detal. En este estudio se llevo a cabo un avalúo de peligros microbiológicos para bacterias patogénicas y bacterias causantes de deterioro en la carne molida de procesadores locales (Puerto Rico) y la importada de los Estados Unidos. Para la identificación de estas bacterias patogénicas y bacterias que causan deterioro se utilizaron agares cromogénicos. Para el conteo total aeróbico se utilizó el método de recuento de plato total (PCA, por sus siglas en inglés). No se detectó la presencia de las bacterias patogénicas *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* en las 24 muestras de carne molida analizadas. Los resultados estadísticos no encontraron diferencias significativas entre la carne molida procedente de procesadores locales (Puerto Rico) y la importada de los Estados Unidos para el recuento de plato total (5.1670 log cfu/gr y 5.2971 log cfu/gr Puerto Rico y E.U., respectivamente) y *Enterococcus* (5.2302 log cfu/gr y 5.2665 log cfu/gr Puerto Rico y E.U., respectivamente) al comparar el origen de la carne. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas ( $P \geq 0.05$ ) al evaluar entre las visitas y entre cada uno de los establecimientos de venta de carne molida. Para prevenir la presencia de bacterias responsables de enfermedades transmitidas por alimentos y bacteria responsables de deterioro se debe seguir las buenas prácticas de manufactura, buena higiene personal y de manejo de alimento, en conjunto con las guías que nos provee el Código del Alimentos del Servicio de Inspección y Seguridad de Alimentos

Derechos del Autor Reservados ©

Norman N. Arroyo Llantín

2008

## **Reconocimientos**

Le doy gracias a Dios por su misericordia y por la oportunidad que me dio para completar mis estudios de maestría. Quiero agradecer a mis padres: Norman y Elsie, a mis hermanos Hansel y Ellison por su apoyo y su amor. Gracias a la excelente facultad de profesores y personal de apoyo del programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Su dedicación, paciencia y conocimiento me han hecho un mejor profesional. Gracias a la Dra. Lynette Orellana por sus correcciones al documento. Gracias a los profesores Aixa Rivera y Américo Casas por sus correcciones y su apoyo en el área de carnes. Finalmente agradezco al Dr. Ernesto Riquelme por su ayuda y apoyo en el análisis estadístico de la data.

## Tabla de Contenido

	<b>Página</b>
Lista de Tablas.....	vii
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Gráficas.....	ix
I. Introducción.....	1
II. Revisión de Literatura.....	4
III. Objetivos.....	13
IV. Materiales y Métodos.....	14
a. Establecimientos de Venta, Muestras de Carne y Parámetros de muestreo.....	14
b. Transporte de Muestra.....	14
c. Cepas de Bacterias y Medios de Cultivo.....	15
d. Análisis Estadístico .....	18
V. Resultados y Discusión.....	20
VI. Conclusiones.....	30
VII. Referencia.....	32
VIII. Apéndice.....	36

## Lista de Tablas

<b>Tablas</b>	<b>Página</b>
Tabla 1. Variables Experimentales.....	19
Tabla 2. Interacción entre la muestra y el establecimiento de venta para la bacteria <i>Enterococcus</i> .....	36
Tabla 3. Interacción entre la muestra, el establecimiento de venta y el origen para la bacteria <i>Enterococcus</i> .....	36
Tabla 4. Interacción entre la muestra, el establecimiento de venta, el origen y visita para la bacteria <i>Enterococcus</i> .....	36
Tabla 5. Interacción entre la muestra y el establecimiento de venta en conteo aeróbico total.....	36
Tabla 6. Interacción entre la muestra, el establecimiento de venta y el origen en conteo aeróbico total.....	36
Tabla 7. Interacción entre la muestra, el establecimiento de venta, el origen y visita en conteo aeróbico total .....	37

## Lista de Figuras

<b>Figuras</b>	<b>Página</b>
Figura 1. Colonias blancas en Recuento Aeróbico Total.....	15
Figura 2. Colonia azul turquesa en Agar Orientación.....	16
Figura 3. Aislamiento e Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> en alimentos.....	17
Figura 4. Aislamiento e Identificación de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 en alimentos.....	17
Figura 5. <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> O157:H7 en agar cromogénico.....	18



## Lista de Gráficas

<b>Gráficas</b>	<b>Página</b>
Gráfica 1. Crecimiento de <i>Enterococcus</i> en la carne molida local e importada de los Estados Unidos.....	23
Gráfica 2. Recuento total de <i>Enterococcus</i> en carne molida local.....	24
Gráfica 3. Recuento total de <i>Enterococcus</i> en carne molida importada de los Estados Unidos.....	25
Gráfica 4. Crecimiento de Aeróbicos Totales en la carne molida local e importada de los Estados Unidos .....	28
Gráfica 5. Recuento total de aeróbicos en carne molida local.....	28
Gráfica 6. Recuento total de aeróbicos en carne molida importada de los Estados Unidos.....	29

## I. Introducción

El crecimiento poblacional ha impactado de gran manera a la industria de alimentos. Como consecuencia hemos visto un aumento en la producción de alimentos y en el desarrollo de tecnología para cubrir la demanda de los mismos. Todo esto sin olvidar la necesidad de proveer al consumidor un producto de alta calidad e inocuo para el consumo humano. Un error en algún paso de producción, “desde la finca hasta la mesa” puede traer al consumidor consecuencias fatales. Para el año 1999, Mead y sus colaboradores estimaron que hay aproximadamente 76 millones de personas que se enfermaron por el consumo de alimentos anualmente en los Estados Unidos, de estas 325,000 requieren hospitalización y 5,000 mueren.

La contaminación no intencional de los alimentos puede ocurrir debido a tres factores: contaminación química como la presencia de detergentes y plaguicidas, contaminación física proveniente de metales, madera y vidrio y contaminación biológica causada por microorganismos. La contaminación de alimentos debido a la presencia de microorganismos puede causar enfermedades fatales al consumidor. Estos microorganismos pueden encontrarse en el aire, agua, suelo en contacto directo y/o indirecto con el alimento, o pueden ser parte de la microflora microbiana endógena de plantas y animales. Además, cualquier ser humano en contacto directo con ese alimento puede contaminar el producto. Bacterias patogénicas de gran importancia que pueden causar enfermedades encontradas en los alimentos son *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*.

La carne es un alimento básico en la dieta. Podemos definir carne como todo tejido animal compuesto principalmente de tejido muscular, conectivo y adiposo que sea

apto para el consumo humano. Esto incluye todo producto procesado o manufacturado de estos tejidos. La carne molida es un producto de tejido animal pasado por una trituradora de carne formando partes más pequeñas. Todo tejido muscular animal es alto en proteínas de alto valor biológico siendo fuente de los amino ácidos esenciales. Su contenido de grasa puede variar de animal en animal dependiendo de la especie, raza, su procedencia anatómica, el método de manejo y cocido. Por estas mismas razones, la carne molida provee también un ambiente ideal para el crecimiento microbiano. Además, la carne molida podría contener un mayor número de bacterias que el corte entero de carne debido a un área superficial mayor, a la contaminación cruzada y a la contaminación proveniente de utensilios y maquinaria no limpiados y higienizados adecuadamente.

De acuerdo al Servicio de Inspección y Seguridad de Alimentos (FSIS, por sus siglas en inglés) del Departamento de Agricultura de EEUU la contaminación con bacterias patogénicas a través de la carne molida es de gran preocupación. Bacterias como *Escherichia coli* O157:H7 puede colonizar el intestino del animal y ser transmitida a la carne durante el procesamiento del animal.

*Staphylococcus aureus* es una bacteria de gran preocupación a la industria de los alimentos ya que produce una entero toxina termo estable fatal a la salud humana. *S. aureus* es parte de la microflora normal de los humanos por lo tanto se reconoce que los brotes causados en humanos se debe al mal manejo de alimentos y utensilios, abuso de temperatura, pero se cree que la fuente primaria de contaminación es a través de los manejadores de alimentos (McClure, 2002).

Además, de bacterias patogénicas, la carne molida contiene una microflora normal de bacterias que causan deterioro. Estas se incluyen en recuentos aeróbicos totales y

bacterias del grupo *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Proteus*). Recuentos altos de estas bacterias provocan un deterioro rápido de la carne molida por consecuente una vida útil corta. En este estudio la bacteria *Enterococcus* fue la analizada ya que fue la única recuperada de los agares cromogénicos de orientación.

El propósito de esta investigación fue obtener un perfil microbiológico de la carne molida producida localmente y compararla con la importada de los Estados Unidos. Esta evaluación microbiológica nos brinda información para establecer estudios bases sobre la cantidad y tipo de bacteria que pueden encontrarse en la carne molida. Además, proyectos de investigación como éste pueden servir de base para que la industria de carne tome las medidas necesarias para el control de estas bacterias en el producto.

Este estudio incluye la evaluación de bacterias patogénicas (*Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus*) y bacterias causantes de deterioro provenientes del grupo *Enterobactereaceae* en la carne molida de procesadores locales e importada de los Estados Unidos. Además, se realizó un recuento total aeróbico para estimar un índice de calidad en las muestras analizadas

## II. Revisión de Literatura

La carne molida es un producto cárnico proveniente principalmente de tejido muscular que incluye, además, tejidos blandos (adiposo, epitelial, nervioso) picado finamente por una máquina trituradora de carne (Hedrick *et al.*, 1994). Generalmente, la carne molida procede del pecho, pecho centro, pecho punta y falda del ganado vacuno. Al ser la mayoría proveniente de tejido muscular provee proteínas y lípidos necesarios en la dieta humana.

Según publicado por Casas y Cianzo (2005) para el año 2003 la industria de carne en Puerto Rico contribuyó un 17.5% al ingreso bruto agrícola y un 4% fue atribuido a la producción y venta carne de res. En Puerto Rico se consumen al menos 150 millones de libras de carne de res fresca y congelada al año. La demanda constante de este producto podría ser una excelente noticia para la industria de ganado bovino en Puerto Rico, pero la realidad es que sólo unas 20 millones de libras provienen de procesadores locales. Esta participación desproporcionada en el mercado se debe a la inestabilidad que la importación descontrolada de carne de res fresca y congelada provoca en el mercado local afectando la demanda y el precio del producto local.

Por otra parte, la industria de carne de res de Puerto Rico ha desatendido por años los aspectos relacionados al mercado consumidor y carece de información sobre la calidad de la carne producida. La industria no cuenta con un sistema de clasificación que informe al consumidor sobre la calidad del producto y permita tomar dediciones adecuadas al momento de comprar la carne de res producida localmente (Casas y Cianzio, 2005). Agencias públicas y organizaciones privadas asociadas a la industria de alimentos están trabajando juntos para desarrollar alternativas diferentes para impulsar

esta industria. Una de las medidas es implementar sistemas costo efectivos de alimentación para el ganado vacuno. Estos se basan en el uso de forrajes como su componente principal en la dieta del ganado vacuno. Otra alternativa es desarrollar criterios de calidad que puedan ser utilizados como criterio de decisión al momento de comprar carne producida localmente. Para lograr estos objetivos podemos enfatizar las diferencias en las características nutricionales y la inocuidad entre el producto local y el importado.

La carne de res producida en Puerto Rico ha mostrado tener un valor nutricional superior que la carne importada de los Estados Unidos (Casas *et al.*, 2005). Investigaciones realizadas muestran que la carne de res producida en Puerto Rico contiene cantidades menores de grasa y colesterol al ser comparada con la carne de res importada; mientras que sus niveles de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés) son mayores que en la importada (Casas *et al.*, 2005). Este perfil es posible debido al sistema de alimentación utilizada en Puerto Rico en donde la dieta del ganado incluye un mínimo de concentrados.

La industria de carne de res en Puerto Rico carece de información base que determine las características microbiológicas del producto y como consecuencia inocuidad de la misma. Usualmente lo que se ve en la etiqueta del producto es información general de que puede contener bacterias e instrucciones simples de cómo cocinarlo a cierta temperatura de manera apropiada. Por esta razón, es necesario determinar el perfil microbiológico para conocer que clase y tipo de bacterias se encuentra en la carne molida. Esta información puede ser utilizada como una hábil

herramienta de mercadeo y en el caso de ser necesario que la industria lo pueda utilizar para proveer al consumidor un producto de alta calidad e inocuo.

La Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez, realizó estudios que buscaban evaluar el impacto microbiológico en carne de res del país empacados bajo diferentes condiciones: empaque al vacío y empaque comercial (PVC) para la carne de res. Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en el crecimiento de microorganismos (*Pseudomonas spp.*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterobacter spp.* y *Escherichia coli*) debido al tipo de empaque utilizado (Rodríguez, 2007). De acuerdo a Rodríguez (2007) la bacteria patogénica *Escherichia coli* O157:H7 no fue recuperada en la carne de res producida localmente.

Sin embargo, se conoce que los alimentos no son tejidos estériles. La carne molida contiene especies de bacterias no patogénicas. Esto incluye hasta un  $10^6$  de aeróbicos totales,  $10^2$  de coliformes por gramo y  $10^2$  de *E. coli* por gramo de muestra (Jay, 1992). Recuentos altos de microorganismos en la carne son resultado del sobre procesamiento y manejo, incremento en el área superficial, exposición a condiciones aeróbicas y contaminación cruzada de maquinaria, cuchillos y utensilios no sanitizados (Burgess *et al.*, 2005; Jay, 1992).

Los microorganismos facultativos causantes de deterioro en carnes incluye aquellos pertenecientes al grupo *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Proteus*) los cuales están ampliamente distribuidos en la naturaleza. El deterioro de alimentos envuelve la combinación de procesos microbiales, químicos y bioquímicos en conjunto con factores intrínsecos y extrínsecos del alimento (Jay, 2000). Algunas cepas pertenecientes al grupo de *Enterobacteriaceae* son parte de la

microflora normal del intestino de muchos animales, incluyendo los rumiantes, por lo tanto es inevitable de que éstas entren en el producto final (Baylis, 2006). La carne procesada en el matadero bajo condiciones higiénicas está normalmente contaminada con bajos niveles de microorganismos del grupo *Enterobacteriaceae*. La incidencia de *Enterobacteriaceae* es normalmente baja, pero niveles aceptables han sido definidos por la legislación 2001/471/EC (European Commission, por sus siglas en inglés); los límites aceptables de *Enterobacteriaceae* en canales son  $<1.5 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$ , marginal entre 1.5 a  $2.5 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$  y no aceptable  $>2.5 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$  (Baylis, 2006; Anon, 2001).

De acuerdo al Servicio de Inspección y Seguridad de Alimentos *Escherichia coli* O157:H7 puede ser encontrada en carne molida de res. Esto se debe a que la bacteria puede colonizar el intestino de los rumiantes y pasar al tejido muscular durante la matanza. *Escherichia coli* O157:H7 ha sido identificada como una cepa más resistente que la bacteria no patogénica *E. coli* por que puede llegar a producir una enterotoxina dañina para los humanos (Ebel *et al.*, 2004; Hussein y Bollinger, 2005). *Escherichia coli* O157:H7 es reconocida mundialmente como causante del síndrome urémico hemolítico que puede llegar a causar fallo renal y muerte. Generalmente las enfermedades transmitidas a través de alimentos con *Escherichia coli* O157:H7 se deben al consumo de alimentos no cocidos adecuadamente, haciendo la reducción de esta bacteria una prioridad para la industria de la carne (Keene *et al.*, 1997).

En el 1994 *E. coli* O157:H7 fue declarado como un adulterante en la carne molida por el Servicio de Inocuidad e Inspección de Alimentos (FSIS, 2007). En ese mismo año en octubre 17, el Departamento de Agricultura de los E.U. y el Servicio de Inspección y Seguridad de Alimentos (USDA-FSIS) establecieron un programa para realizar pruebas



en carne molida. El objetivo de este programa es motivar a la industria para tomar las medidas necesarias y reducir la presencia del patógeno en la carne molida. El Servicio de Inspección y Seguridad de Alimentos anunció que durante los primeros meses del año 2003, 0.32% de muestras de carne molida fueron positivas para *Escherichia coli* O157:H7; esto representa una baja de un 0.78% con lo reportado para el año 2002 (Hume, 2003). Del año 2004 al 2006 se ha mantenido constante con un 0.17% (FSIS, 2007). Sin embargo numerosos brotes y recogidos de alimentos son reportados diariamente en la página cibernética de esta agencia. Por ejemplo, el 16 de mayo de 2008- JSM Meat Holdings Company, Inc., una firma en Chicago, Illinois., retira voluntariamente del mercado una cantidad indeterminada cantidad de productos de carne de res que se pretendía usar en productos molidos que podrían estar contaminados con *E. coli* O157:H7, además en mayo 8 de 2008 Palama Holdings, LLC, una firma en Hawaii retira voluntariamente aproximadamente 68,670 libras de carne molidas por posible contaminación con *E. coli* O157:H7 según informado por el USDA-FSIS (FSIS, 2007).

Estudios realizados por Khan y colaboradores (2002) encontraron la presencia de *E. coli* O157:H7 en 55 muestras de carne de res cruda en Calcuta, India. De acuerdo al estudio la presencia de esta bacteria indica malas prácticas de higiene en el matadero de Calcuta. En otras investigaciones realizadas por Holika y colaboradores (2006) probaron su método de rápida detección para *E.coli* O157:H7. Utilizaron un doble enriquecimiento de nucleasa 5' en reacción en cadena de polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). El ensayo determinó la presencia de *E.coli* O157:H7 en un periodo de 8 horas.

*Staphylococcus aureus* es un microorganismo que usualmente no se encuentra de forma natural en los alimentos. *S. aureus* es parte de la microflora normal de los humanos

(manos, uñas, piel y cavidad nasal) por lo tanto se reconoce que los brotes causados por contaminación de *Staphylococcus aureus* en humanos se debe al mal manejo de alimentos y utensilios, abuso de temperatura, pero se cree que la fuente primaria de contaminación es a través de los manejadores de alimentos (McClure, 2002). Se ha establecido que una dosis de infección tan bajo como 1.0 microgramo en el alimento es suficiente para que esta bacteria produzca los síntomas de la condición (Bergdoll, 1989). Los síntomas mas comunes son nausea, vómitos, dolor abdominal y postración. Los niveles de toxicidad son logrados cuando la población de *S. aureus* excede 100,000 unidades formadora de colonias por gramo (Bergdoll, 1989). Según estadísticas reportadas, alrededor de 185,000 personas se enferman anualmente en los Estados Unidos debido a la contaminación de alimentos por *S. aureus* (Naugle *et al.*, 2005). Según estudios realizados por Van Loo y colaboradores (2007) en Holanda se recuperó la bacteria en 34 de las 76 muestras de carne de res y de cerdo comprada en los establecimientos de venta al detal. La inoculación directa a los platos fueron negativas, pero al enriquecer las muestras se recuperó la bacteria *S. aureus* en 34 de la muestras. El estudio demostró la importancia de la bacteria como peligro potencial para los que manejan alimentos aunque esta se encuentre en dosis bajas.

Un método útil para indicar el número de microorganismos en un producto es por medio del recuento aeróbico total. Procedimientos detallados para determinar el recuento aeróbico total ha sido desarrollado por la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC, por sus siglas en inglés). El método convencional de recuento en platos para examinar alimentos congelados, refrigerados, pre-cocidos o completamente cocidos se basa en los métodos oficiales de la AOAC que consiste en diluir muestra en agua

peptonada, esparcido en platos con agar de recuento total y seleccionar platos con un rango de recuento de 25-250 colonias (BAM, 2001). Este método puede ser utilizado para evaluar las condiciones sanitarias de un producto alimentario.

Los agares cromogénicos son medios de cultivo selectivos y diferenciales que permiten la rápida detección de microorganismos por color. El medio de cultivo “*Staphylococcus* BBL™ CHROMagar™ *Staph aureus*” es utilizado para la identificación, enumeración y aislamiento de la bacteria *S. aureus*. La adición de sustratos cromogénicos en este medio facilita la diferenciación de *S. aureus* (colonias rosa pálido) de otros microorganismos (AOAC, 1975). De acuerdo a Carricajo y colaboradores (2001) el uso de este agar cromogénico provee una sensibilidad del 98% para *S. aureus* validando el uso de este medio. El medio “BBL™ CHROMagar™ O157” fue desarrollado para el aislamiento e identificación *E. coli* O157:H7 en alimentos (colonia color rosa oscuro). Este es un medio selectivo y diferencial que permite la diferenciación de *E. coli* no patógena por medio de reacciones cromogénicas específicas. Además, inhibe el crecimiento de otros microorganismos gram negativos, excepto *E. coli* O157:H7. Ambos agares cromogénicos cumplen con las especificaciones del fabricante de acuerdo a la Asociación Oficial de Químicos Analíticos.

La agencia federal de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) publica el Código de Alimentos como un modelo que asiste a la jurisdicción para el control de alimentos en todos los niveles del gobierno, proveyéndole unas bases legales y científicas para regular los establecimientos de venta y la industria de alimentos (Food Code, 2005). El capítulo 2 el Código de Alimentos habla en referente a como la gerencia debe manejar el personal de apoyo. Este personal debe proveer información importante sobre la salud,

higiene personal de los empleados (lavado de manos), limpieza e higienización de equipos y utensilios, monitoreo de temperaturas, entre otros, como medidas importantes para reducir las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). El capítulo 3 del mismo documento hace referencia a las limitaciones de crecimiento microbiano (tiempo de exposición de alimentos, temperaturas de cocción, temperatura de congelación) que deben seguirse para minimizar la incidencia de microorganismos en los alimentos. En el capítulo 4 se ofrece información detallada acerca de limpieza e higienización de equipos y utensilios. El propósito de las regulaciones del Código de Alimentos es velar por que los establecimientos de venta de alimentos sigan unos protocolos establecidos de manejo de alimentos, que protejan al consumidor de consecuencias fatales por contaminación a través de los alimentos.

Además del Código de alimentos el Código de Regulaciones Federales publica las Buenas Prácticas de Manufactura (21 CFR 110). Estas regulaciones incluyen reglamentos sobre el personal, operaciones de higiene, equipos y utensilios. Concerniente al personal, la gerencia de la planta tiene que tomar todas las medidas y precauciones razonables para asegurar lo siguiente: primero, un adecuado control de enfermedades que incluye la exclusión de operaciones de manejo de alimentos, equipos y/o material de empaque de cualquier persona que por examen médico o por observación del supervisor muestre tener una enfermedad y/o lesión abierta y por lo tanto existe la posibilidad razonable de que alimentos, superficies de contacto con alimentos y/o material de empaque de alimentos puedan ser contaminados. Segundo, todas las personas trabajando en contacto directo con alimentos tienen que someterse a prácticas higiénicas mientras trabajan para proteger los alimentos de cualquier tipo de contaminación. Estas prácticas higiénicas incluyen

mantener una limpieza personal adecuada, lavándose las manos completamente y desinfectándolas, si es necesario para evitar la contaminación de alimentos con microorganismos indeseables en un lavamanos adecuado antes del comenzar a trabajar, después de dejar la estación de trabajo, y en cualquier ocasión cuando las manos se ensucien o se contaminen. Finalmente el personal es responsable de identificar fallas de higiene o contaminación de alimentos, por lo tanto deben de tener una formación educativa o experiencia, o combinación de ambas, para proveer el nivel de competencia necesario para la producción de alimentos limpios y seguros. Además, todo el equipo y utensilios de la planta tienen que ser diseñados de tal manera que puedan ser adecuadamente limpiados y mantenidos (CFR, 2001).

El criterio de la Buenas Practicas de Manufactura son aplicados para determinar si un alimento es adulterado y/o han sido manufacturados en tales condiciones que son incapaces de ser alimentos aptos para el consumo humano (CFR, 2001).

### III. Objetivos

#### Objetivo General

- Establecer un perfil microbiológico de la carne molida producida localmente y compararla con la importada de los Estados Unidos.

#### Objetivos Específicos

- Identificar la presencia las bacterias patogénicas *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* para establecer un avalúo de peligros.
- Cuantificar la presencia de las bacterias pertenecientes al grupo *Enterobactereaceae* y recuento total de aeróbicos como indicador de calidad.

## **IV. Materiales y Métodos**

### **a. Establecimientos de Venta, Muestras de Carne y Parámetros de Muestreo**

Las muestras fueron compradas en seis establecimientos de venta seleccionados aleatoriamente de una lista de establecimientos localizados en Mayagüez, Hormigueros, San Germán y Sabana Grande. Los establecimientos fueron visitados en dos ocasiones y en cada ocasión se compraba una muestra de carne molida proveniente de Puerto Rico y Estados Unidos. Un total de 24 muestras de carne molida, doce muestras de cada origen fueron analizadas en este estudio.

Colocarle fecha al producto no es requerido por las regulaciones federales pero usualmente los establecimientos de venta le colocan en la etiqueta dicha fecha (“sell by”). Para controlar la variable concerniente al largo de vida del producto solamente fueron seleccionadas muestras con fecha de venta  $\pm 1$  día.

### **b. Transporte de Muestra**

Al momento de comprar las muestras estas eran colocadas en una nevera con hielo. El tiempo de transporte aproximado era de 45 minutos. Todas las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Alimentos del Programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos del Recinto Universitarios de Mayagüez.

### c. Cepas Bacterianas y Medios de Cultivo

La investigación cuantificó bacterias facultativas que causan deterioro del grupo *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Proteus*). Además, se cuantificó la presencia de las bacterias patogénicas *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus*.

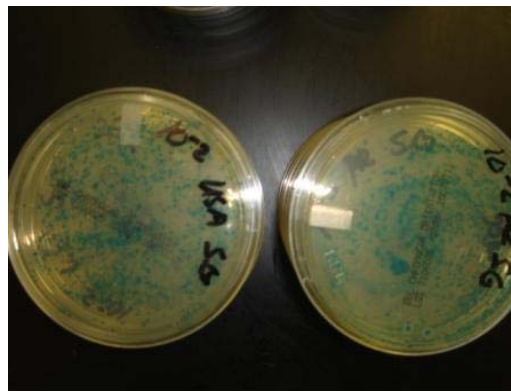
Todas las muestras fueron manejadas asépticamente utilizando las guías del BAM (Bacteriological Analytical Manual, por sus siglas en inglés). Veinticinco gramos de carne molida fueron diluidas y homogenizadas en 225ml de agua peptonada al 0.1% por dos minutos. Diluciones seriadas entre  $10^{-1}$  y  $10^{-6}$  fueron preparadas. El recuento total de microorganismos aeróbicos fue realizado utilizando el procedimiento de vertido en plato con agar de recuento total. Una vez inoculados los platos, estos fueron incubados a  $\pm 35^{\circ}\text{C}$  por 24 horas en condiciones aeróbicas. Colonias color blancas fueron cuantificadas platos con bacterias entre 25 -225 colonias por plato (Figura 1).



**Figura 1. Colonias blancas en Recuento Aeróbico Total**

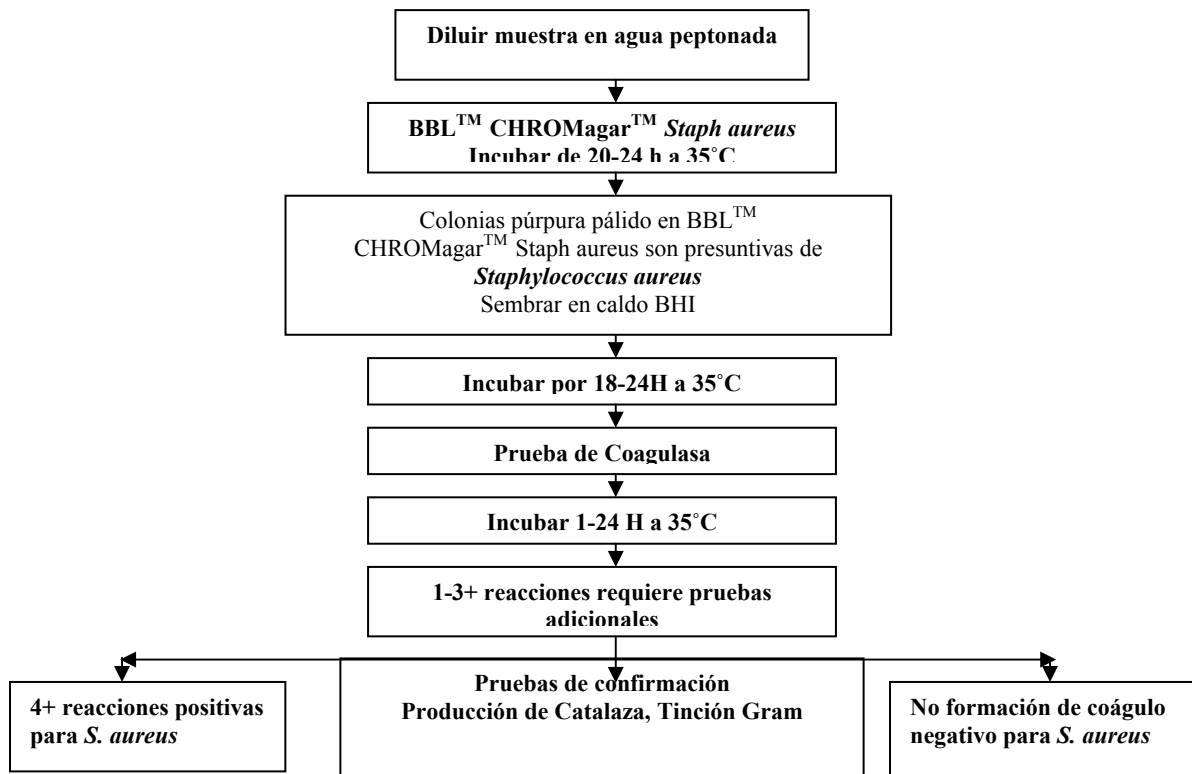


El recuento de bacterias del grupo *Enterobacteriaceae* spp. fue realizado utilizando agar cromogénico de orientación, un medio selectivo y diferencial. Los platos fueron incubados a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 horas en condiciones aeróbicas y en oscuridad para proteger los sustratos cromogénicos. El medio permite la identificación de bacterias aeróbicas facultativas por color incluyendo *Escherichia coli* (rojo), *Enterococcus* (azul turquesa), *Klebsiella* (azul metálico) y *Proteus* (halo marrón) (Figura 2).

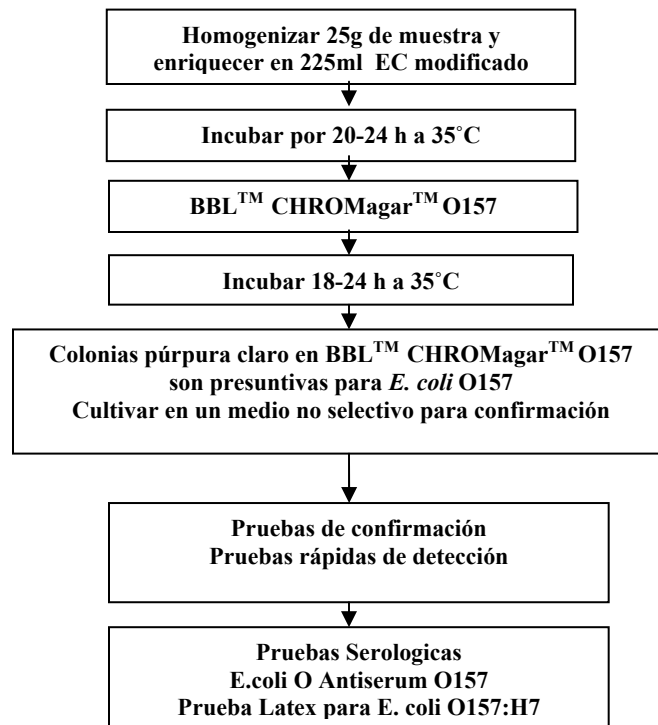


**Figura 2. Colonia azul turquesa en Agar Orientación**

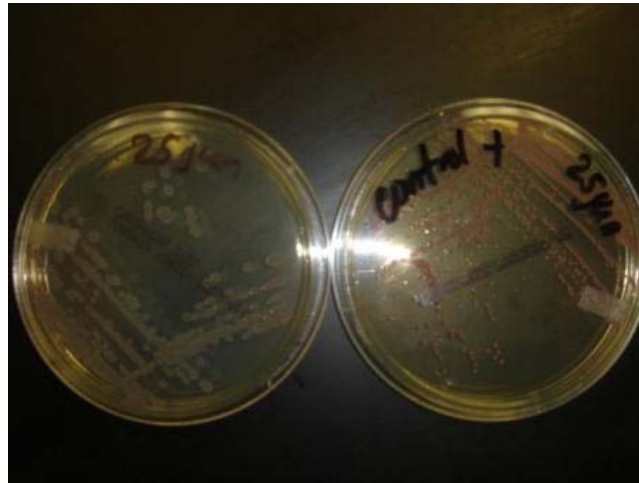
Los medio de cultivo “*Staphylococcus* BBL™ CHROMagar™ Staph aureus” y “BBL™ CHROMagar™ O157”, (formulaciones tienen aprobación de AOAC™) fueron utilizados para la identificación de la bacteria *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* O157:H7 respectivamente. Las muestras utilizadas para la identificación de *Escherichia coli* O157:H7 fueron enriquecidas por 20-24 horas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  en caldo de EC modificado conteniendo novobiocin (antibiótico) antes de verter en platos de CHROMagar™ O157. El aislamiento e identificación de *S. aureus* y *Escherichia coli* O157:H7 se llevó a cabo según presentado en la figura 3, figura 4 y figura 5.



**Figura 3. Aislamiento e Identificación de *Staphylococcus aureus* en alimentos**



**Figura 4. Aislamiento e Identificación de *Escherichia coli* O157:H7 en alimentos**



**Figura 5. *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* O157:H7 en agar cromogénico**

#### **d. Análisis Estadístico**

Los recuentos bacterianos obtenidos fueron evaluados estadísticamente utilizando un análisis de varianza con un arreglo de parcelas divididas, siendo el establecimiento la parcela principal, el origen la sub-parcela y los grupos de bacterias la sub-sub-parcela. La data fue analizada utilizando el programa SAS (Statistical Análisis System) version 9.1 (2005) con un nivel de significancia del 95% para determinar las diferencias significativas entre el origen de la carne molida y los cuatro grupos de bacterias.

El modelo estadístico utilizado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + C_k + (AB)_{ij} + (AC)_{ik} + (BC)_{jk} + (ABC)_{ijk} + \epsilon_{ijkl}$$

Donde:

$Y_{ijk}$ : Variable de respuesta

$\mu$ : Media general

$A_i$ : Efecto del  $i$ -ésimo lugar de origen de la carne ( $i = 1,2$ )

$B_j$ : Efecto del  $j$ -ésimo establecimiento ( $j = 1,2,3,4,5$ )

$C_k$ : Efecto del  $k$ -ésimo muestreo o visita ( $k = 1,2$ )

(AB)<sub>ij</sub>: Efecto de la interacción del i-ésimo lugar de origen de la carne con el j-ésimo establecimiento

(AC)<sub>ik</sub>: Efecto de la interacción del i-ésimo lugar de origen de la carne con el k-ésimo muestreo o visita

(BC)<sub>jk</sub>: Efecto de la interacción del j-ésimo establecimiento con el k-ésimo muestreo o visita

(ABC)<sub>ijk</sub>: Efecto de la interacción del i-ésimo lugar de origen de la carne con el j-ésimo establecimiento y con el k-ésimo muestreo o visita

$e_{ijkl}$ : Error experimental aleatorio con media = 0 y varianza =  $\sigma^2$

Las cuatro variables y 24 muestras fueron analizadas con un arreglo factorial de 2 X 6 X 2. Estas variables incluyen:

<b>Tabla 1. Variables Experimentales</b>		
<b>Variable</b>	<b>Descripción</b>	<b>Factorial</b>
<b>Tipo de Carne</b>	Carne Molida	
<b>Origen de la Carne</b>	Puerto Rico versus E.U.	2
<b>Establecimientos de Venta</b>	Seleccionadas aleatoriamente	6
<b>Visita al establecimiento</b>	Dos veces cada uno	2

## V. Resultados y Discusión

La carne de res requiere mucho cuidado durante operaciones de matanza. Bacterias patogénicas como *E.coli* O157:H7 pueden colonizar los intestinos del animal y contaminar la carne muscular durante la matanza. Además, *E. coli* O157:H7 puede sobrevivir en temperaturas normales de refrigerado y congelación de alimentos. Una vez esta bacteria invade los alimentos, se puede continuar multiplicando lentamente a temperaturas tan bajas como 44 °F (6.66 °C) (FSIS, 2007). Por esta razón, en este estudio fueron evaluadas veinticuatro muestras de carne molida de procesadores locales e importados de los Estados Unidos. Todas las cepas bacterianas evaluadas fueron comparadas con un control para validar el uso apropiado de los medios.

La bacteria *Escherichia coli* O157:H7 no fue recuperada en ninguna de las 24 muestras de carne molida analizadas. Estudios realizados por Rodríguez (2007) y Oquendo (2006) no encontraron presencia de este patógeno en la carne de res de Puerto Rico. Por el contrario, en Estados Unidos se reportan a menudo en la página cibernética del Servicio de Inspección y Seguridad de Alimentos retiros por posible contaminación por esta bacteria. Hasta el momento en Puerto Rico no se han reportado retiros de carne molida por posible contaminación. Aunque la bacteria no fue recuperada en ninguna de las 24 muestras, ésta sigue siendo de alto riesgo para la salud humana y ha causado muchas muertes en los pasados años en los Estados Unidos. De acuerdo a Mead y colaboradores (1999) *Escherichia coli* O157:H7 ha causado alrededor de 62,458 enfermedades, 1,843 hospitalizaciones y 52 muertes en los Estados Unidos anualmente.

El 18 de agosto de 1998 el Departamento de Agricultura y el Servicio de Inspección y Seguridad de Alimentos anunció planes para realizar un avalúo de peligros

desde la finca hasta la mesa para *Escherichia coli* O157:H7 en carne de res con un enfoque en carne molida. Algunos de los objetivos de este plan son: identificar la ocurrencia y los niveles del patógeno en los puntos a lo largo de la producción y la contribución de estos puntos al número de enfermedades causada a los humanos, documentar los métodos de avalúo de peligros y la evidencia para los avalúos futuros y comparar estos resultados con estimaciones nacionales de enfermedades derivadas de datos epidemiológicos (FSIS, 2001). La base de datos del estudio mostró la presencia de *Escherichia coli* O157 en aproximadamente 3% de las canales bajo condiciones de refrigeración. Además obtuvieron un 89% de posible contaminación con *Escherichia coli* O157 en la moledora. Estimados preliminares de contaminación de la moledora (cargas que consisten en 4.000 - 30.000 libras de carne de res molida) es que el 90% está contaminada con una carga  $< 3 \log$  CFU/gr de *Escherichia coli* O157 (FSIS, 2001). Aunque estos valores no son aceptables, debido a la cero tolerancia de la bacteria, este estudio enfoca las posibles rutas de contaminación a lo largo de la cadena de producción.

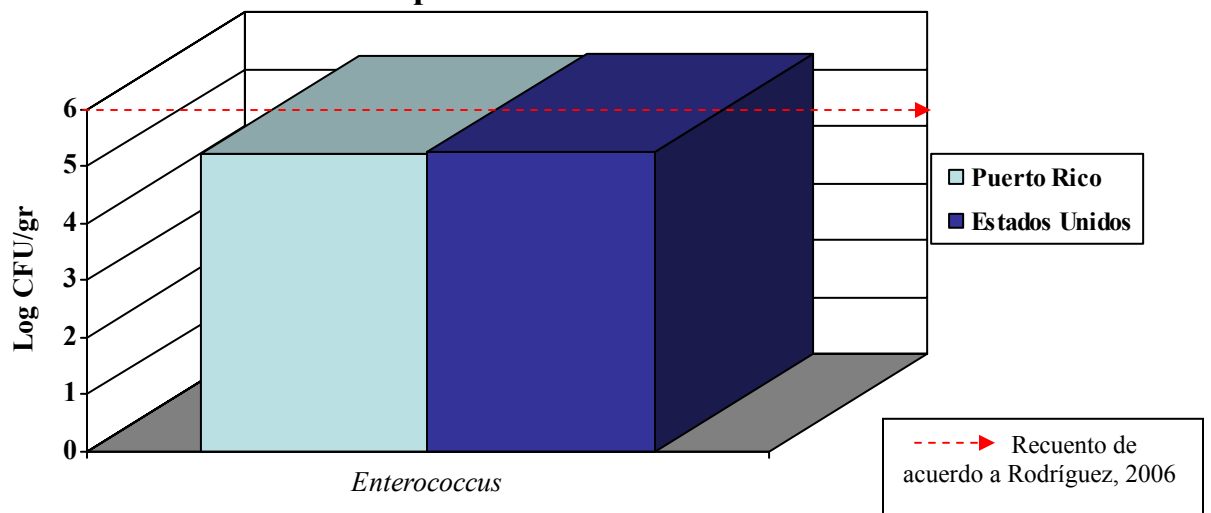
Al día de hoy aproximadamente 1,400 establecimientos que producen carne de res son inspeccionados por inspectores federales sujeto al mandato 9 CFR 319.15 que se encarga de tomar muestras para *Escherichia coli* O157:H7 por métodos convencionales (FSIS, 2008). El FSIS continúa evaluando su política sobre *Escherichia coli* O157:H7 y su programa de muestreo para mejorar los métodos y la rápida detección de este patógeno antes de que llegue al consumidor (FSIS, 2007). Los resultados obtenidos en esta investigación y estudios realizados por Oquendo (2006) y Rodríguez (2007) validan la eficiencia de estas regulaciones y las inspecciones federales en reducir la posible contaminación con este patógeno.

La bacteria patogénica *Staphylococcus aureus* no fue recuperada en ninguna de las 24 muestras de carne molida analizadas utilizando el agar cromogénico. En algunas muestras bacterias presuntivas fueron encontradas pero al realizar pruebas bioquímicas adicionales incluyendo la prueba de aglutinación de latex y la prueba catalasa se confirmó que no era la bacteria buscada. *Staphylococcus aureus* es parte de la microflora normal en los humanos. De acuerdo a Mead y colaboradores (1999) se estiman que esta bacteria es responsable de alrededor de 186,060 enfermedades, 1,753 hospitalizaciones y 2 muertes en los Estados Unidos al año. Se ha estimado que entre un 20-50% de la población humana es portador de *Staphylococcus aureus* en sus fosas nasales (Bergdoll, 1989; Kluytmans *et al.*, 1996) y en ocasiones puede llegar a los alimentos debido a las malas prácticas de manejo. Las enfermedades transmitidas por alimentos debido a la presencia de *Staphylococcus aureus* a sido relacionado con los manejadores de alimentos (Eisenberg, 1975; Jones *et al.*, 2002). La investigación realizada por Eisenberg (1975) muestra contaminación por *Staphylococcus aureus* en la comida servida en un vuelo aéreo debido al mal manejo del alimento. Además Jones y colaboradores (2002) publican un artículo de un caso de un brote por contaminación por *S. aureus* debido a un mal manejo del alimento. Un método efectivo para reducir significativamente el riesgo de desarrollar una infección causada por este patógeno es la limpieza efectiva de las fosas nasales según estudios clínicos de Kluytmans y colaboradores (1996) y Yano y colaboradores (2000). La ausencia de esta bacteria en el muestreo realizado puede ser debido a buenas prácticas de higiene por parte de los empleados de los establecimientos de venta. Siguiendo las Buenas Practicas de Manufactura concerniente al lavado de manos adecuado y desinfectándolas si es necesario en un lavamanos antes de comenzar a

trabajar, después de dejar la estación de trabajo, y en cualquier ocasión cuando las manos se ensucien o se contaminen reduce la posibilidad de este patógeno (21 CFR 110, 2001). Además, con una limpieza e higienización adecuada de maquinaria y utensilios y evitando la contaminación cruzada se reduce la probabilidad de que este patógeno pase a la carne molida.

La grafica 1 muestra las medias de los recuentos totales de *Enterococcus* de los productores locales e importados de los Estados Unidos ya que fue la única bacteria recuperada del agar cromogénico. Estadísticamente no hubo diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) en el recuento bacteriano de las muestras debido al origen de la carne. *Enterococcus* mostró un recuento de 5.2302 log CFU/gr en la carne molida local y un 5.2665 log CFU/gr para la carne molida importada.

**Gráfica 1. Crecimiento de *Enterococcus* en la carne molida local e importada de los Estados Unidos**

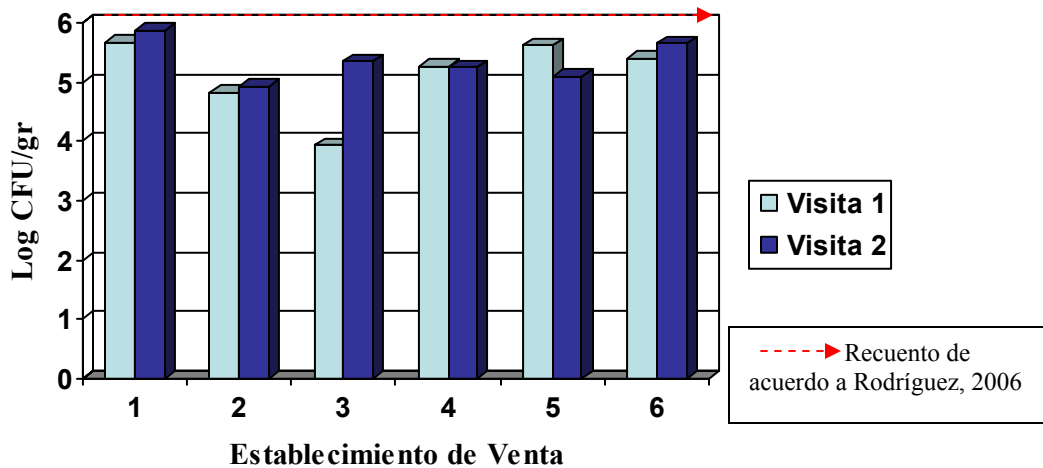


Las gráficas 2 y 3 muestran los recuentos de *Enterococcus* para cada establecimiento y visita. Bajo estas condiciones diferencias significativas ( $P \geq 0.05$ ) fueron encontradas al comparar cada establecimiento de venta de las muestras producidas

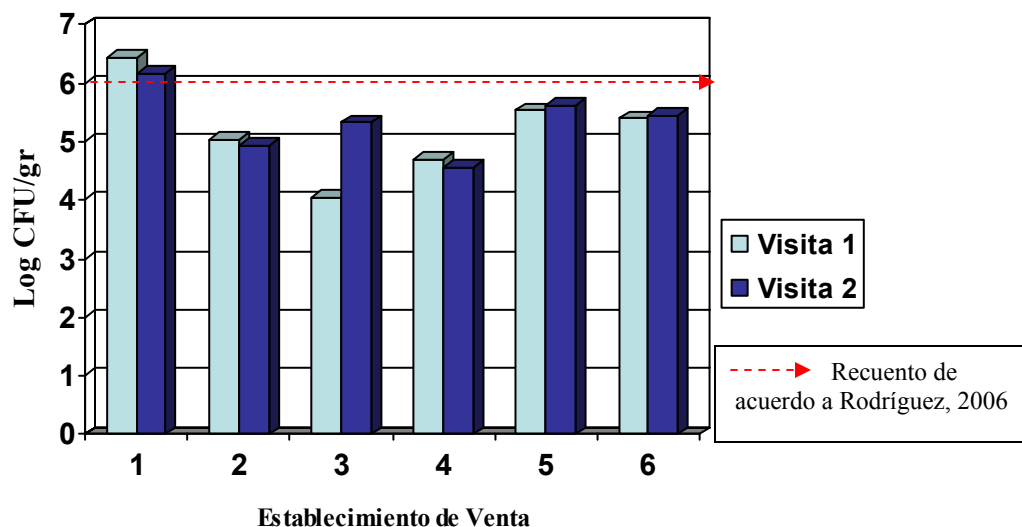


localmente con las importadas. Además, se encontró diferencia significativa al comparar la visita 1 y la visita 2. Un punto muy importante son las interacciones de las variables estudiadas. Al evaluar por separado la variable origen no se encontraron diferencias significativas pero cuando esta variable interacciona con las variables visitas y establecimiento para las cuales si se encontró diferencias significativas la variable de origen se vuelve significativo (Tabla 2, 3 y 4 del apéndice). Estos resultados nos muestran las diferencias que pueden tener en el perfil microbiológico de los alimentos las buenas prácticas de manufactura, higiene personal y manejo de los establecimientos de venta. Algunas prácticas que pueden estar influenciando esta variación entre establecimiento y visita son: inadecuado lavado de manos, falta de limpieza e higiene de equipos y utensilios y falta de una temperatura de almacenamiento adecuada. Siguiendo las buenas prácticas de manufactura en todos estos factores es posible disminuir estos niveles de recuentos bacterianos.

**Gráfica 2. Recuento total de *Enterococcus* en la carne molida local**



**Gráfica 3. Recuento total de *Enterococcus* en la carne molida importada de los Estados Unidos**



Los microorganismos facultativos causantes de deterioro en carne incluye al grupo *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, ***Enterococcus***, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Proteus*). Algunas manifestaciones del crecimiento de estas bacterias en el alimento son la producción de olores desagradables en la carne, generalmente asociados al rompimiento de amino ácidos liberando productos como sulfato de hidrogeno (H<sub>2</sub>S) y ammonia (NH<sub>3</sub>) contribuyendo el rápido deterioro de la carne molida y reduciendo su largo de vida (Jay, 2000). En un estudio de 1,030 muestras de carne molida y hamburguesas de establecimientos de venta en la Republica de Irlanda se obtuvieron recuentos de *Enterobacteriaceae* entre los rangos de 0.52 log<sub>10</sub> a 6.98 log<sub>10</sub> cfu/gr (con una media de 2.20 a 4.64 log<sub>10</sub> cfu/g) (Baylis, 2006., Crowley *et al.*, 2005). Nuestros resultados se encontraron dentro de esos mismos rangos pero la media es muy superior a la reportada. Recuentos altos de esta bacteria se debe a malas prácticas de higiene personal, contaminación cruzada de utensilios y manejos y cortes excesivos de los empleados. Buenos controles en temperatura de refrigeración puede ser uno de los mejores factores para retrasar el crecimiento de estas bacterias (Baylis, 2006). Además de

implementar una buena refrigeración al producto se debe prevenir la incorporación de esta bacteria implementando buenos procedimientos de limpieza e higienización en todos los pasos de la producción.

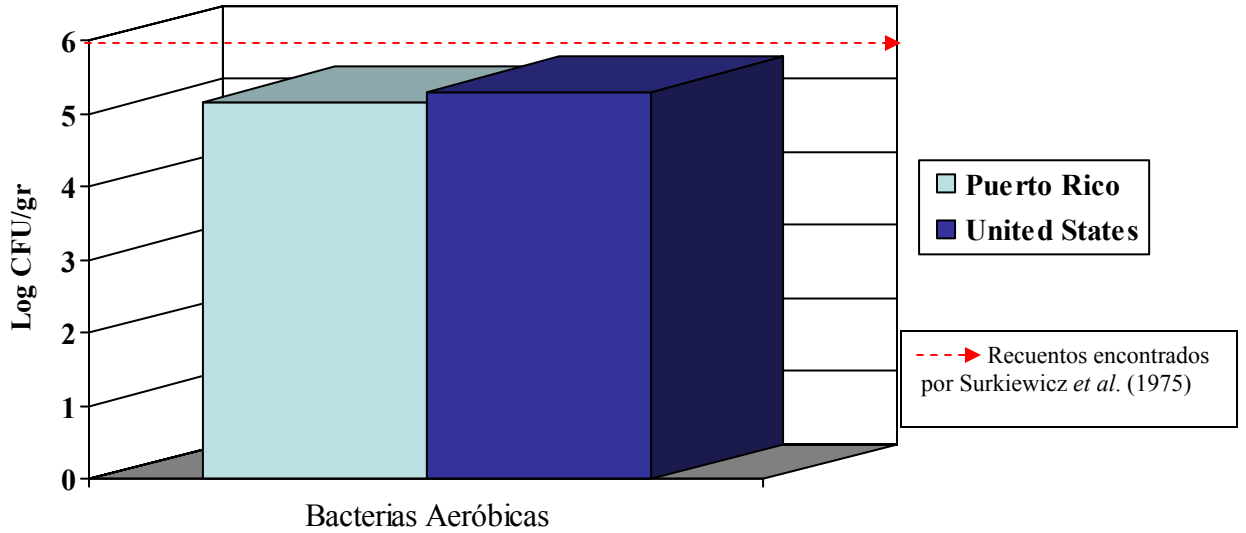
El medio de cultivo recuento de platos fue utilizado para la evaluación de microorganismos aeróbicos totales. La gráfica 4 muestra el crecimiento de aeróbicos totales en la carne molida local y importada de los Estados Unidos con una media de 5.1670 y 5.2971 log CFU/gr respectivamente. Estadísticamente no hubo diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) en el recuento bacteriano de las muestras debido al origen de la carne para las bacterias analizadas.

En el estudio se encontraron diferencias significativas al comparar cada establecimiento de venta y visita (Gráfica 5 y 6) (Tabla 5, 6 y 7 del apéndice). Las muestras de ambos orígenes obtuvieron recuentos menores de  $10^6$  por gramo similares a los recuentos encontrados por Surkiewicz y colaboradores (1975) con la excepción de los establecimientos 5 y 6 de la carne importada en la segunda visita. Al igual con lo obtenido en *Enterococcus* la variable origen no fue significativo pero cambia a significativo cuando está interaccionando con las variable de visita y establecimiento de venta. Por lo tanto, la preservación de la carne molida va a depender de las buenas prácticas de higiene personal, higienización, refrigeración adecuada, además de mantener constante los factores intrínsecos de la carne molida (pH, potencial oxidación-reducción, actividad de agua, contenido nutricional, contenido de humedad) y los factores extrínsecos (temperatura de almacenamiento, humedad relativa, presencia y concentración de gases). Ya que todo alimento posee una flora microbiana natural, es

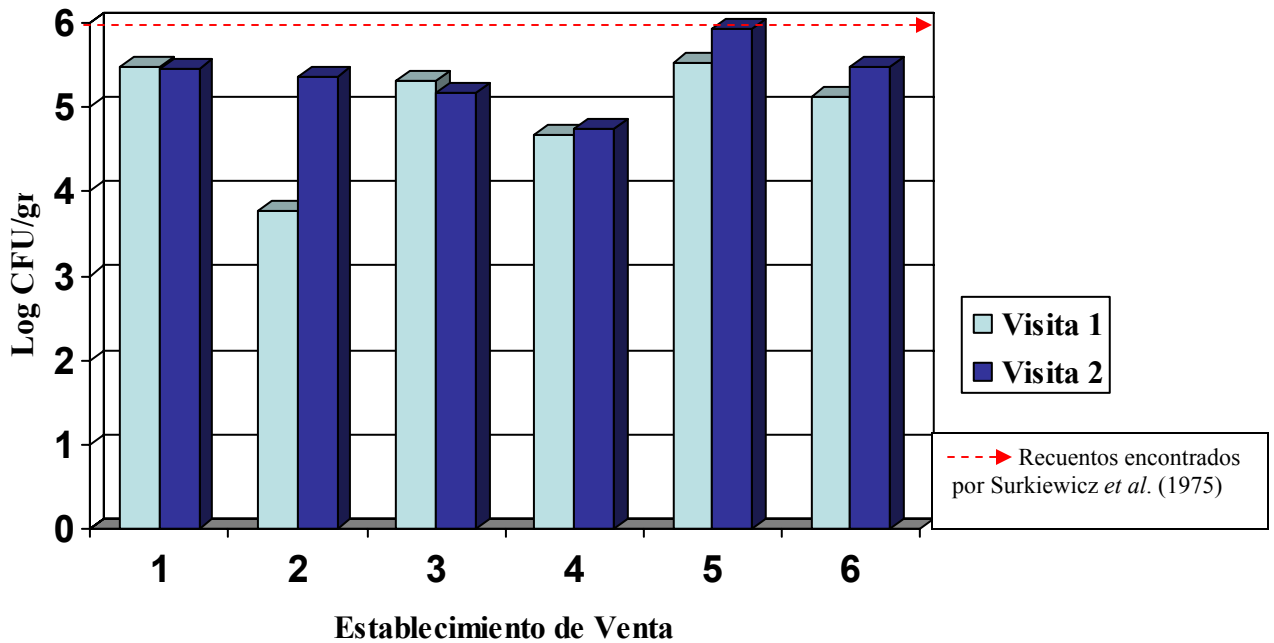
posible que el cambio de algunos de estos factores pueda dar paso al crecimiento de microorganismos no deseados.

No hubo efectos significativos del origen de la carne molida, lo que se atribuye a que las reglas y regulaciones que rigen los establecimientos procesadores de carne son las mismas para Puerto Rico y los Estados Unidos, lo cual se cumplieron cabalmente. Los efectos significativos de establecimiento se atribuyen a situaciones internas de cada establecimiento relacionadas con la aplicación de las normas de higiene, tanto de las facilidades y equipos utilizados como de los empleados que allí laboran. Se observó que las interacciones significativas fueron aquellas en que establecimiento fue una de las variables consideradas para la interacción, lo que evidencia el impacto de las normas de higiene dentro de cada establecimiento. De acuerdo a las regulaciones del Código de Alimentos (1) el personal gerencial debe proveer información importante sobre la salud, higiene personal de los empleados (lavado de manos), limpieza y sanitización de equipos y utensilios, monitoreo de temperaturas, como medidas importantes para reducir las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Además (2) se debe monitorear el crecimiento microbiano mediante tiempo de exposición de alimentos, temperaturas de cocción, temperatura de congelación. Finalmente (3) el personal gerencial debe ofrecer información detallada acerca de limpieza y higienización de equipos y utensilios. Por otra parte las buenas prácticas de manufactura velan por que estos alimentos estén siendo preparados en un ambiente limpio y sean aptos para el consumo humano.

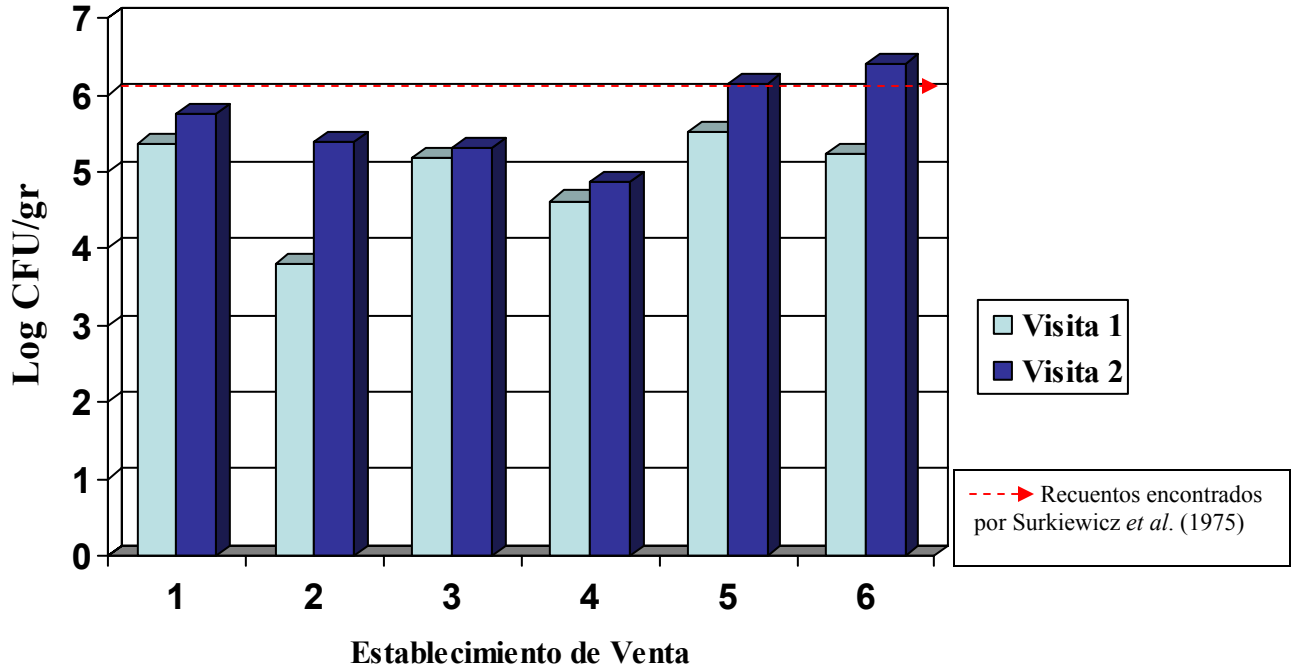
**Gráfica 4. Crecimiento de Aeróbicos Totales en la carne molida local e importada de los Estados Unidos**



**Gráfica 5. Recuento total de aeróbicos en carne molida local**



**Gráfica 6. Recuento total de aeróbicos en carne molida importada de los Estados Unidos**



## VI. Conclusiones

En este estudio se evaluó la calidad e inocuidad en 24 muestras de carne molida de procesadores locales e importados de los Estados Unidos en varios pueblos del área oeste de Puerto Rico. Las bacterias patogénicas *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* no fueron recuperadas en ninguna de las 24 muestras de carne molida analizadas. Este hallazgo puede ser debido al aspecto regulativo establecido por el Departamento de Agricultura y el Servicio de Inspección y Seguridad de Alimentos, además de la implementación de algunas prácticas establecidas en el Código de Alimentos y las buenas practicas de manufactura. Aunque estas bacterias no fueron recuperadas los establecimientos de venta deben continuar y mejorar sus prácticas de higiene y higienización de equipos para asegurar la inocuidad de los productos que venden.

No hubo diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) entre el origen de la carne molida en el perfil microbiológico de las bacterias causantes de deterioro del grupo de los *Enterobacteriaceae* y el recuento aeróbico total. Se encontró diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) cuando se comparaba cada establecimiento y visita. Esta diferencia significativa puede ser el resultado de diferentes prácticas de manejo e higiene en cada establecimiento. Por lo tanto, es importante que los establecimientos mantengan buenas prácticas de higiene para mantener los recuentos de estos microorganismos bajos; ya que la consecuencia primaria de tener altos recuentos de este tipo de bacterias es una vida útil corta del producto que representa pérdidas para los minoristas.

El recuento de bacterias aeróbicas totales va a influenciar el largo de vida y rapidez en el deterioro de la carne molida. Recuentos altos de microorganismos aerobios

totales significa que las buenas prácticas de la higiene no están siendo llevadas a cabo. Para disminuir estos recuentos es necesario mejorar las buenas prácticas de manufactura, higiene personal y seguir las regulaciones que provee el Código de Alimentos. Finalmente no se debe olvidar la importancia de un adiestramiento apropiado del personal que maneja alimentos y una adecuada supervisión de ese personal (CFR, 2001).

La industria de carne en Puerto Rico debe enfocar sus esfuerzos en programas educativos de manejo adecuado de alimentos. De esta forma los establecimientos de venta al detal pueden crear conciencia sobre la importancia que pueden tener sus acciones en la reducción de bacterias causantes de deterioro y enfermedades.



## VII. Referencia

AOAC, 1975. *Staphylococcus aureus* in foods. Official method 9755.55 Surface plating method for isolation and enumeration.

Anon. 2001. Commission decision of 8 June 2001 (2001/471/EC). Official Journal of European Communities L165: 48–53.

Baylis, C.L. 2006. Campden and Chorleywood Food Research Association, UK. Enterobacteriaceae. Chapter 22. P. 635-636.

Bacteriological Analytical Manual, 2001.

Visitada en Mayo 28, 2008. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-3.html>

Bergdoll, M.S. 1989. *Staphylococcus aureus*, in Doyle M P, Foodborne Bacterial Pathogens, New York, Marcel Dekker, 463–523.

Burgess, F., Little, C.L., Allen G., Williamson K. y Mitchell, R.T. 2005. Prevalence of *Campylobacter*, *Salmonella* and *Escherichia coli* on external packaging of raw meat. J. Food Prot. 68(3): 469-75.

Caricajo, A., Treny, A., Fonsale, N., Bes, M., Reverdy, M.E., Gille, Y., Aubert, G. y Freydiere, A.M. 2001. Performance of the Chromogenic Medium CHROMagar Staph aureus and the Staphycrom Coagulase Test in the Detection and Identification of *Staphylococcus aureus* in Clinical Specimens. Journal of Clinical Microbiology. P. 2581-2583.

Casas, A., Cianzo D. 2005. Informe de la Empresa de Producción de Carne.

Casas, A., Cianzo D. y Rivera A. 2005. Nuestra Carne de Res: La más Saludable. La Res Informativa. University of Puerto Rico. Animal Industry Department. Vol. 9(2). June 2005.

CFR, 2001. Título 21 Parte 110. Buenas Prácticas de Manufactura. Disponible: <http://vm.cfsan.fda.gov/~lrd/scfr110.html>. Visitada en Mayo 22, 2008.

Crowley, H., Cagney, C., Sheridan, J. J., Anderson, W., McDowell, D. A., Blair, I. S., Bishop, R. H. y Duffy, G. 2005. *Enterobacteriaceae* in beef products from retail outlets in the Republic of Ireland and comparison of the presence and counts of *E. coli* O157:H7 in these products. Food Microbiology 22: 409–414.

Ebel, E., Scholsser, W., Kause, J., Orloski, K., Roberts, T., Narrad, C., Malcolm, S., Coleman, M. y Powell, M. 2004. Draft risk assessment of the public health impact of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. J. Food Prot. 67(9): 1991-9.

Eisenberg, M.S. 1975. Staphylococcal food poisoning aboard a commercial aircraft, *Lancet*, 27, 595–9.

Food Code. 2005. FDA/Center for Food Safety & Applied Nutrition.. Chapter 2-6. Disponible: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/foodcode.html>. 2005. Visitada en Marzo, 14 2008.

FSIS. 2001. Risk Assessment for *E. coli* O157:H7 in Ground Beef. Disponible: <http://www.fsis.usda.gov/OPHS/ecolrisk/home.htm>. Visitada en Mayo 23, 2008.

FSIS. 2007. Microbiological Results of Raw Ground Beef Products Analyzed for *Escherichia coli* O157:H7. 2007.

Disponible:

[http://www.fsis.usda.gov/Science/Grpund\\_Bee\\_E.Coli\\_Testing\\_Results/index.asp](http://www.fsis.usda.gov/Science/Grpund_Bee_E.Coli_Testing_Results/index.asp).

Visitada en Marzo 14, 2008.

FSIS. 2008. Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products. Disponible: [http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG\\_5\\_04.pdf](http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_5_04.pdf). Visitada en Mayo 23, 2008.

Hedrick H.B., Aberle, E.D., Forrest, J.C., Judge, M.D. y Merkel, R.A. 1994. Principles of Meat Science. Third Edition., Kendall Hunt Publishing Co., Dubuque, Iowa.

Holicka, J.; Guy, R.A.; Kapoor, A., Shepherd D., Horgen, P.A. 2006. A rapid (one day), sensitive real-time polymerase chain reaction assay for detecting *E. coli* O157:H7 in ground beef. *Canadian Journal of Microbiology*; 52, 10; ProQuest Biology Journals. p. 992

Hume, S. 2003. USDA Sees Improved Ground-Beef Safety. *Restaurants & Institutions* 113 no25 84 N 1 2003. Copyright (2002) Reed Business Information, a division of Reed Elsevier, Inc.

Hussein, H.S. y Bollinger, L.M. 2005. Prevalence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in beef cattle. *J. Food Prot.* 68(10): 2224-41.

Implementation of Commission Decision 2001/471/EC - The application of HACCP principles and microbiological testing in licensed meat plants. 2001. Disponible: <http://www.food.gov.uk/consultations/consulteng/2001/haccp>. Visitada en Mayo 23, 2008.

Jay, J. M. 1992. *Food Microbiology*. Fourth Ed. Chapman and Hall, New York, NY.

Jay, J. M. 2000. *Modern Food Microbiology*. Aspen Publishers Inc. Gaithersberg, MD.

Jones, T F., Kellum, M.E., Porter, S.S., Bell, M. y Schaffer, W. 2002. An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Emerg Infect Dis*, 8, 82–4.

Khan, A., Yamasaki, S., Sato, T., Ramamurthy, T., Pal, A., Datta, S., Chowdhury, N. R., Chandra, Das S., Sikdar, A., Tsukamoto, T., Kumar, B. S., Takeda, Y. y Balakrish, N. G. 2002. Prevalence and Genetic Profiling of Virulence Determinants of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Cattle, Beef, and Humans, Calcutta, India. *Emerging Infectious Diseases* 8 no1 54-62.

Keene, W.E., Hedberg, K., Herriott, D.E., Hancock, D.D., McKay, R.W., Barrett, T.J. y Fleming, D.W. 1997. A prolonged outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections caused by commercially distributed raw milk. *J. Infect. Dis.* 176:815-818.

Kluytmans, J., Mouton, J., Vandenberg, F., Manders, M., Maata, T.A., Wagenvoort, J., Michel, M. y Verbrugh, H. 1996. Reduction in surgical site infections in cardiothoracic surgery by elimination of nasal carriage of *Staphylococcus aureus*, *Infect Control Hosp Epidemiol*, 17, 780–5.

McClure, P.J. 2002. Microbiological hazard identification in the meat industry. CRC Press LLC and Woodhead Publishing Ltd.

Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M. y Tauxe, R.V. 1999. Food-Related Illness and Death in the United States. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA

Naugle, A.L., Holt, K.G., Levine P. y Eckle, R. 2005. Food Safety and inspection service regulatory testing program for *Escherichia coli* O157:H7 in rare ground beef. *J. Food Prot.* 68(3): 462-8.

Oquendo, R.M. 2006. Incidencia de *Escherichia coli* serotipo O157:H7 en carne proveniente de ganado bovino de mataderos de Puerto Rico. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, P.R.

Rodriguez, S.Y. 2007. Evaluación microbiológica de la carne de res de Puerto Rico bajo dos formas de empaque. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, P.R.

Statistical Analysis System, versión 9.1, 2005.

Surkiewicz, B. F., Harris, M.E., Elliott, R.P., Macaluso, J.F. y Strand, M.M. 1975. Bacteriological survey of raw beef patties produced at establishments under federal inspection. *Appl. Microbiol.* 29:331-334.

Van Loo, I., Diederer, B., Savelkoul, P., Woudenberg, J., Roosendaal, R., Belkum, A., Lemmens-den Toom, N., Verhulst, C., Van Keulen, P. y Kluytmans, J. 2007. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Meat Products, the Netherlands. Emerging Infectious Diseases. Vol. 13, No. 11.

Yano M, Doki Y, Inoue M, Tsujinaka T, Shiozaki H, Monden M. 2000. Preoperative intranasal mupirocin ointment significantly reduces postoperative infection with *Staphylococcus aureus* in patients undergoing upper gastrointestinal surgery, Surg Today, 30, 16–21.

## VII. Apéndice

Variable Dependiente: *Enterococcus*

<b>Tabla 2. Interacción entre la muestra y el establecimiento de venta para la bacteria <i>Enterococcus</i></b>					
Fuente	GL	Tipo III SS	Media de Cuadrados	Valor F	Pr > F
Establecimiento	5	0.8552	0.171	498.13	< 0.0001

<b>Tabla 3. Interacción entre la muestra, el establecimiento de venta y el origen para la bacteria <i>Enterococcus</i></b>					
Fuente	GL	Tipo III SS	Media de Cuadrados	Valor F	Pr > F
Origen	1	0.00000035	0.00000035	0	0.9903
Estable * Origen	5	0.1847	0.0369	16.85	0.0018

<b>Tabla 4. Interacción entre la muestra, el establecimiento de venta, el origen y visita para la bacteria <i>Enterococcus</i></b>					
Fuente	GL	Tipo III SS	Media de Cuadrados	Valor F	Pr > F
Visita	1	0.0207	0.0207	11.12	0.0067
Estable * Visita	5	0.2237	0.04474	24	< 0.0001
Origen * Visita	1	0.0035	0.0035	1.88	0.1977
Estable * Origen * Visita	4	0.0297	0.0074	3.98	0.0311

Variable Dependiente: Recuento Total de bacterias aeróbicas

<b>Tabla 5. Interacción entre la muestra y el establecimiento de venta en conteo aeróbico total</b>					
Fuente	GL	Tipo III SS	Media de Cuadrados	Valor F	Pr > F
Establecimiento	5	10.407	0.2081	19.22	0.0012

<b>Tabla 6. Interacción entre la muestra, el establecimiento de venta y el origen en conteo aeróbico total</b>					
Fuente	GL	Tipo III SS	Media de Cuadrados	Valor F	Pr > F
Origen	1	0.0943	0.0943	2.51	0.1642
Estable * Origen	5	0.1778	0.0356	0.95	0.514

<b>Tabla 7. Interacción entre la muestra, el establecimiento de venta, el origen y visita en conteo aeróbico total</b>					
Fuente	GL	Tipo III SS	Media de cuadrados	Valor F	Pr > F
Visita	1	0.187	0.187	6.41	0.0279
Estabe * Visita	5	0.6657	0.1331	4.56	0.0169
Origen * Visita	1	0.0113	0.0113	0.39	0.5473
Estabe * Origen * Visita	4	0.0744	0.0186	0.64	0.6464