

Incidencia de *Escherichia coli* serotipo O157:H7 en carne proveniente de ganado bovino de mataderos de Puerto Rico

Por

Melissa M. Oquendo Rodríguez

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

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2006

Aprobado por:

Madeline Velázquez, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Edna Negrón, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Aixa Rivera, M.S.
Presidenta, Comité Graduado

Fecha

Edna Negrón, Ph.D.
Director del Programa

Fecha

Representante de Estudios Graduados
Ernesto Riquelme, Ph.D.

Fecha

ABSTRACT

The main objective of this investigation was to evaluate the incidence of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle during the slaughter process in Puerto Rico. The slaughter houses visited were located in Mayagüez, Arecibo and Yauco. The current methods of reduction for bacterial counts and the prevention of food borne pathogens were also evaluated. The sampling method used was the one proposed by the United States Department of Agriculture (USDA) for processing of samples and the detection of *E. coli* O157:H7 using the method of polyurethane sponges. The animals sampled for the investigation were classified based on their race and age. The results for the presence of *E. coli* O157:H7 in the carcass prior and after the wash were negative. The bacterial counts in the samples were not significant throughout the investigation. The statistical analysis used was the MacNemar test. There were no significant differences with the treatment applied to the carcass. The Wilcoxon test analysis was also performed to compare the reduction of bacterial counts in the carcass. These values fluctuated depending on the slaughter house. ($p < 0.05$) The results of the serological tests performed indicated the presence of generic *E. coli*, and a possible *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*. Based on these results it can be assumed that the slaughter houses visited had Good Manufacturing Practices (GMP's), Standard Sanitization Operational Procedures (SSOP's), Standard Procedures of Sanitization (SPS) and followed their Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) plans.

RESUMEN

El objetivo primordial de esta investigación fue determinar la incidencia de *Escherichia coli* O157:H7 en el ganado bovino en mataderos de los pueblos de Mayagüez, Arecibo y Yauco. Los métodos utilizados actualmente en Puerto Rico para la reducción de contaminación microbiana y prevención de patógenos fueron evaluados también. Se utilizó el sistema propuesto por la USDA para la detección de *E. coli* O157:H7 utilizando el método de esponjas de poliuretano. Se utilizaron muestras de ganado vacuno macho de tipo lechero y de carne donde se clasificaban por su edad. Los resultados arrojaron negativos para la presencia del patógeno antes y después del lavado de la canal en los tres mataderos. Los conteos de colonias fueron bajos por lo que no hay necesidad de incorporar estrategias adicionales de intervención para el lavado de la canal durante el procesamiento de la matanza de reses. El análisis estadístico de MacNemar demostró que no existen diferencias significativas antes y después del tratamiento aplicado a la canal. El análisis estadístico de Wilcoxon se utilizó para promediar la carga microbiana en la canal, los resultados fluctuaron dependiendo el matadero. ($p < 0.05$) Los resultados de pruebas bioquímicas realizadas revelaron la presencia de *E. coli* genérico y un posible *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes* en la canal. Los mataderos estudiados estaban en buenas condiciones de sanitización siguiendo las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), Procedimientos Operacionales Estándares de Sanitización (POES), Estándares de Desempeño Sanitarios (EDS) y planes HACCP.

Derechos de Autor Reservados©
Melissa M. Oquendo Rodríguez
2006

**Dedico esta tesis a mi Dios todopoderoso,
a mi familia que sin ellos jamás lo hubiese logrado, mi mamá, mi papá, mis abuelos y todas
aquellas personas que me han ayudado a seguir siempre hacia delante sin importar los
obstáculos. Con Dios todo se puede.**

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada le doy gracias a mi Dios todo poderoso por haberme permitido continuar mis estudios dándome fuerzas y sobre todo salud para realizar el grado de maestría. Quiero agradecer a mi familia que sin ellos esto no se hubiese hecho realidad. Mi mamá María Rodríguez que además de una madre ha sido siempre mi mejor amiga, la cual me ha brindado siempre su apoyo y comprensión en los momentos difíciles de mi vida, demostrándome ser una madre excepcional. Mis abuelos Gracia Morganti y Alfredo Rodríguez que me han guiado a través de los años y siempre me animaban para continuar con la jornada, y que tienen un lugar muy especial en mi corazón. Mi padre Miguel Oquendo que a pesar de la distancia siempre ha estado ahí para mí, apoyándome incondicionalmente en todo momento.

Doy gracias al programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos del Recinto Universitario de Mayagüez por haberme dado la oportunidad de ser parte del programa. En adición a la directora de tesis la profesora Aixa Rivera, por siempre confiar en mí, servirme de guía y amiga. A los demás miembros del comité la Dra. Edna Negrón, y Dra. Madeline Velázquez por ayudarme y brindarme conocimientos que me sirvieron de base para la realización de la investigación. La Dra. Linette Orellana y al Dr. Raúl Machiavelli por contribuir con sus ideas y cognición.

A la secretaria del programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Bessie por ser siempre tan dulce y cariñosa con todos nosotros, y a Don Ruperto por siempre hacernos reír en esos momentos difíciles.

Quiero agradecer al Departamento de Química por haberme ayudado brindándome la oportunidad de ser ayudante de cátedra durante los tres años de maestría. A las profesoras Ivelisse Padilla, Sara Delgado y Luz Solís coordinadoras de los laboratorios de Química General.

Agradezco a Lillian Cantisani Ramírez de la Estación Experimental de Agricultura quien cooperó en el proceso de recolección de muestras, con sus conocimientos y continua motivación.

Quiero agradecer a los mataderos cooperadores que permitieron realizar la investigación en sus facilidades. Mil gracias a los mataderos de Mayagüez, Arecibo y Yauco, sus dueños, empleados e inspectores por ser tan atentos en todo momento.

Le doy gracias a mis amistades que siempre estuvieron ahí para mí en mis momentos difíciles. En adición mis amigos del programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos, especialmente a Ana y Juan Manuel que me ayudaron a seguir adelante. Nunca pensé que les iba a tener tanto cariño. Siempre estarán en mi corazón a pesar de la distancia y recordaré con alegría los gratos momentos y no tan gratos que pasamos juntos.

Tabla de Contenido

Lista de Tablas	ix
Lista de Figuras	x
Lista de Apéndices	xi
1. Introducción	1
2. Objetivos	6
3. Revisión de Literatura	7
3.1 <i>Escherichia coli</i> O157:H7	7
3.2 Condiciones de crecimiento	9
3.3 Características de <i>E. coli</i> O157:H7	11
3.4 Ácido tolerantes	13
3.5 Condiciones de limitación de nutrientes	14
3.6 Estrategias de intervención	15
3.7 Puntos críticos de control	17
4. Metodología	19
4.1 Fuente de información	19
4.2 Recolección de muestras	19
4.3 Determinación e identificación de recuento microbiano	21
4.3.a Método de esponja	22
4.3.b Recolección de muestras del intestino grueso	23
4.3.c Determinación de bacterias gram- negativas	23
4.3.d Determinación de cantidad total de bacterias	24

4.3.e Prueba confirmatoria para <i>E. coli</i> O157:H7 mediante la prueba de aglutinación de látex	25
4.3.f Caracterización de bacterias entéricas	25
4.4 Análisis estadístico	26
4.5 Modelo estadístico	27
5. Resultados y Discusión	29
5.1 Características del estudio realizado en los diferentes mataderos de Puerto Rico	29
5.2 Recuento de colonias	31
5.3 Resultados de análisis microbiológico	37
5.4 Determinación de bacterias gram-negativa	39
5.5 Pruebas confirmatorias para <i>E. coli</i> O157:H7	41
5.5.a Prueba confirmatoria para <i>E. coli</i> O157:H7 mediante caldo EC con MUG	41
5.5.b Prueba da aglutinación de látex para confirmación de <i>E. coli</i> O157:H7	42
Análisis estadístico para eficiencia del tratamiento	43
Resultados de carga microbiana en heces	47
Resultados de la prueba API 20E (Biomérieux®)	47
6.Conclusiones	50
7.Recomendaciones	52
8. Bibliografía	53
9. Apéndices	62

Lista de Tablas

Tabla 1. Distribución de muestras obtenidas por área y grupo de edad	21
Tabla 2. Modelo de tablas utilizadas-Prueba MacNemar	28
Tabla 3. Promedios de log UFC por variable	31
Tabla 4. Pruebas confirmatorias para <i>E. coli</i> O157:H7	39
Tabla 5. Comparación de la eficiencia del tratamiento aplicado a la canal en el matadero de Mayagüez	43
Tabla 6. Promedio de log UFC antes y después del lavado de la canal en el matadero de Mayagüez	44
Tabla 7. Comparación de la eficiencia del tratamiento aplicado a la canal en el matadero de Arecibo	45
Tabla 8. Promedio de log UFC antes y después del lavado de la canal en el matadero de Arecibo	45
Tabla 9. Comparación de la eficiencia del tratamiento aplicado a la canal en el matadero de Yauco	46
Tabla 10. Promedio de log UFC antes y después del lavado de la canal en el matadero de Yauco	46

Lista de Figuras

Figura 1. Toma de muestras en el cuarto trasero de la canal utilizando el método de esponja. (Meat / Turkey sampling kit Nasco®)	20
Figura 2. Toma de muestra de la nuca en la parte izquierda de la canal utilizando método de esponjas	22
Figura 3. Toma de heces del intestino grueso utilizando espátula estéril	23
Figura 4. Prueba de aglutinación de látex con antisuero O157 y H7 (Remel®)	25
Figura 5. Prueba bioquímica API 20E (Biomérieux®)	26
Figura 6. Crecimiento de colonias en el agar MacConkey-Sorbitol	38
Figura 7. Platos con agar EMB exhibieron coloración verde metálico	39
Figura 8. Tubos con caldo EC inoculados con colonia proveniente de MacConkey-Sorbitol iluminados con luz ultravioleta	41
Figura 9. Prueba de aglutinación de látex (Remel®)	43
Figura 10. Resultados de la prueba API 20E	49

Lista de Apéndices

Tabla 11. Comparación de promedios de UFC/cm ² en variable edad	62
Tabla 12. Comparación de promedios de UFC/cm ² en variable variable tipo de animal	62
Tabla 13. Comparación de promedios de UFC/cm ² en variable lugar de muestreo en la canal	62
Tabla 14. Comparación de tratamiento antes y después del tratamiento de los tres mataderos en conjunto	62
Tabla 15. Comparación de promedios de UFC/cm ² entre mataderos	62
Tabla 16. Promedio de log UFC antes y después de lavado de la canal en muestras recolectadas en el matadero de Mayagüez	62
Tabla 17. Promedio de log UFC antes y después de lavado de la canal en muestras recolectadas en el matadero de Arecibo	62
Tabla 18. Promedio de log UFC antes y después de lavado de la canal en muestras recolectadas en el matadero de Yauco	63

Lista de Abreviaciones

Bacteriological Analytical Manual	BAM
Buenas Practicas de Manufactura	BPM
Centro de Control de Enfermedades	CDC
Colitis Hemorrágica	EC
Estándares de Desempeño Sanitarios	EDS
Eosin Methylene Blue Agar, Levine	EMB
Enfermedades Transmitidas por Alimentos	ETA
Food Safety Inspection Service	FSIS
Good Manufacturing Practices	GMP
Enzima beta-glucoronidasa	GUD
Hazard Analysis and Critical Control Points	HACCP
4-methylumbelliferyl- β -glucoronide	MUG
Procedimientos Operacionales Estándares de Sanitización	POES
Shiga Like Toxin	SLT
Standard Procedures of Sanitization	SPS
Standard Sanitization Operational Procedures	SSOP
Unidades Formadoras de Colonias	UFC
United States Department of Agriculture	USDA

1. Introducción

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) son aquellas que se desarrollan por el consumo de agua o alimentos contaminados, donde el alimento actúa como vehículo de transmisión de organismos o sustancias tóxicas que puedan ocasionar daños a la salud humana. Los síntomas pueden variar y dependen del tipo de organismo, la cantidad del alimento contaminado que se consuma el inoculo y del estado inmunológico o físico de la persona. Es establecido que un brote de ETA se declara cuando dos o más personas sufren una enfermedad similar después de ingerir un mismo alimento, lo que señala al alimento como el origen de la enfermedad. Las ETA, desde el punto de vista de salud pública, juegan un rol muy importante en la industria de los alimentos ya que es indicativo de la calidad, seguridad e inocuidad de éstos.

Escherichia coli, miembro de la familia de los *Enterobacteriaceae*, es una bacteria anaeróbica facultativa, gram-negativa, mótil, no formadora de spora y nombrada por el doctor austriaco Theodor von Escherich. Éste fue pionero en la medicina pediátrica y dedicó sus esfuerzos para mejorar el cuidado de niños, particularmente en la higiene y nutrición infantil. En el año 1986 el doctor Escherich convencido que la bacteriología podía resolver muchos problemas pediátricos, aisló el género originalmente designado como *Bacillus commune*, en la familia *Enterobacteriaceae*. Posteriormente pasó a nombrarse *Escherichia coli*. Se han reconocido más de 200 serotipos O para este género, donde los serotipos O son los causantes de enfermedades a los humanos.

La mayoría de las cepas de *Escherichia coli* son inocuas o no patogénicas, lo que significa que no causan enfermedad alguna y viven en los intestinos de los seres humanos

y animales saludables. El humano promedio contiene alrededor de 1 kg de bacterias en su intestino, donde el 0.1% son *E. coli*. La presencia de esta bacteria en el intestino es necesaria para un desarrollo normal y la salud de la persona. *E. coli* y otras bacterias entéricas sintetizan la vitamina K y vitaminas del complejo B que el cuerpo absorbe. A pesar de que el intestino es el hábitat normal de estas bacterias, éstas pueden vivir fuera del mismo en ambientes contaminados con materia fecal tales como en el agua o en la tierra. Bajo estas circunstancias la presencia de la bacteria sirve como indicador de contaminación fecal (Jay, 2000).

Sin embargo existen ciertos serotipos de *E. coli*, que pueden causar enfermedades gastrointestinales con síntomas como diarrea. Estos diversos serotipos patogénicos de las *E. coli* son clasificados de acuerdo con sus mecanismos de virulencia. Estas incluyen las *E. coli* enterotoxigénicas, enterohemorrágicas, enteroinvasivas, enteropatogénicas, enteroadherentes y enteroagregativas (Vásquez y Cabral, 2001). Entre los diferentes serotipos de *E. coli* patogénicos algunos son capaces de producir toxinas resistentes al calor. Estas toxinas son similares a la toxina que produce *Shigella dysenteriae* (Jay, 2000). Es por esto que se le conoce como “*Shiga-like toxin producers*”.

El serotipo O157:H7 causa una enfermedad transmitida por los alimentos, y está mayormente asociada a alimentos cárnicos. La misma produce una toxina potente la que puede causar una tóxico-infección, que resulta en una enfermedad grave para los humanos.

E. coli O157:H7 fue la principal causa del brote de diarrea aguda sanguinolenta durante el 1982. Éste causado por el consumo de hamburguesas crudas contaminadas en los estados de Oregon y Michigan. En el 1985 fue reconocida como un agente causante

del Síndrome Urémico Hemolítico. El Síndrome Urémico Hemolítico mayormente en niños y pacientes inmunocompetentes es caracterizado por una disfunción renal aguda en la cual se destruyen las células sanguíneas y fallo renal. Cerca de un 2% a 7% de las infecciones conducen a esta complicación. Un tercio de las personas con este Síndrome necesitan tratamiento de diálisis; otras presentan complicaciones como alta presión, convulsiones, ceguera o parálisis. En personas de edad avanzada la enfermedad más comúnmente causada por este patógeno es Púrpura Trombótica Trombocitopénica, la cual en ocasiones puede causar hasta la muerte (Payton, et al., 2002). El periodo de incubación para la mayoría de las cepas es de 3 a 8 días. Usualmente los síntomas desaparecen de 5 a 10 días (Omisaskin, et al., 2003). El Centro de Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta aconseja no tomar antibióticos para contrarrestar los síntomas, ya que esto puede ocasionar complicaciones con los riñones, así mismo deben evitarse los medicamentos antidiuréticos.

En el 1993, ocurrió otro brote alimentario fatal causado por *E. coli* O157:H7 donde murieron cuatro personas en los estados de Washington, Idaho, California y Nevada causados por el consumo de hamburguesas crudas en una cadena de comida rápida. 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 (por sus siglas en inglés FSIS). La clasificación de adulterante fue extendida a la carne de res no intacta en el 1999. FSIS considera necesario la reevaluación de los Planes de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (por sus siglas en inglés HACCP) para productos crudos y determinó que establecimientos que no han tomado en consideración a *E. coli* O157:H7

como un peligro biológico en su plan tienen que reevaluar estos. Esto con el propósito de disminuir los riesgos de una toxico-infección causados por el patógeno.

Las estadísticas señalan que anualmente en los Estados Unidos ocurren 62,000 casos de infecciones con *E. coli* O157:H7, 1800 hospitalizaciones, 52 muertes, 3000 casos que desarrollan el Síndrome Urémico Hemolítico (la mayoría niños menores de cinco años).

El registro federal de los Estados Unidos publicó el 7 de octubre de 2002 un artículo en el cual explica el uso de métodos más sensitivos para la identificación del patógeno, esto entre 3 de septiembre de 1999 y el 8 de septiembre de 2002. En el estudio se observó que la prevalencia de *E. coli* O157:H7 en muestras de carne fue un 0.80%. Además se observó un aumento en las muestras tomadas, lo que sugiere que los hallazgos de baja incidencia en el pasado podrían haber estado relacionados a la poca sensibilidad del método y tamaño de las muestras analizadas.

E. coli O157:H7 seguirá siendo una preocupación de salud pública importante para la industria de alimentos si las medidas correctivas no son llevadas a cabo. Las medidas preventivas pueden reducir el número de ganado vacuno portador de este patógeno y así la contaminación de la carne durante el sacrificio de los animales y en la preparación de la carne molida

Expertos en inocuidad alimentaria han estado perdiendo terreno contra la contaminación bacteriana. Las cepas más amenazantes, como la *Escherichia coli* O157:H7, continúan apareciendo inesperadamente, a pesar del incremento en las exigencias de estándares para alimentos seguros (Vásquez y Cabral, 2001).

Estudios sobre la incidencia de este patógeno se han llevado a cabo en los Estados Unidos y en Europa. Debido a que el ganado vacuno es el reservorio natural principal de *E. coli* O157:H7 este puede ser transmitido a la canal durante el proceso de matanza si no se llevan unas medidas sanitarias adecuadas. La determinación de dicho patógeno es de gran importancia para la industria ganadera en Puerto Rico ya que un brote sería devastador, debido a que los ganaderos locales no cuentan con los mismos recursos o ayudas económicas como las industrias en los E.U. o Europa.

El 16 de marzo de 2005 en Puerto Rico, la USDA identificó tres muestras positivas para *E. coli* O157:H7 en carne molida de res, esto de unas 2,502 muestras analizadas durante ese año. Pasados estudios realizados en Estados Unidos han revelado que dicha bacteria es el principal causante de problemas de salud en la sociedad. Es muy importante por esta razón que se requiere más información e investigaciones a cerca de este patógeno en Puerto Rico. Es por esto el interés de conocer la incidencia de *E. coli* O157:H7 en los mataderos de Puerto Rico.

2. Objetivos

Esta investigación persigue identificar la incidencia de *E. coli* O157:H7 en tres mataderos de reses en el área norte, oeste y sur de Puerto Rico, específicamente en los pueblos de Mayagüez, Arecibo y Yauco. Esto ayudará a determinar si los métodos utilizados para la reducción y prevención de bacterias y patógenos en las canales de reses en Puerto Rico es efectivo, o si es necesario incorporar estrategias de intervención adicionales para la reducción o eliminación de *E. coli* O157:H7, patógeno tan nocivo para la salud del ser humano.

3. Revisión de Literatura

3.1 *Escherichia coli* O157:H7

Su nombre se origina del antígeno somático [O] 157 identificado y el séptimo antígeno flagelar [H]. El antígeno [O] se deriva de la pared celular y el [H] del flagelo este se encuentra solo en especies motiles.

Investigaciones de brotes han demostrado que *E. coli* O157:H7 puede ser transmitido por alimentos, en agua o transmisión de persona a persona. Productos de origen bovino, tales como carne no cocida adecuadamente o leche cruda han sido asociados a este patógeno (Vásquez y Cabral, 2001). La contaminación con dicho patógeno en alimentos no asociados a este puede inferir contaminación cruzada con productos o superficies que contenían la bacteria. Debido a la relación estrecha de este patógeno a productos de origen bovino, estos han sido señalados como el principal reservorio del patógeno (Shere, et al., 1998). Solo pocas células son necesarias para causar la infección, niveles de 0.9 a 4.3 UFC/g fueron reportados en muestras tomadas de lotes de carne molida que fueron implicados en el brote de Síndrome Urémico Hemolítico en humanos en el año 1993 (Payton-Pruett, et al., 2002).

El patógeno se encuentra típicamente en el ganado vacuno saludable, lo que hace difícil el control de este. Se ha demostrado que el 75% del ganado lechero y el 63% de ganado vacuno de engorde son positivo para *E. coli* O157:H7 (Grauke, et al., 2002).

La prevalencia del patógeno puede ser menor o mayor dependiendo de la época del año. Se ha comprobado que la época de mayor incidencia de enfermedades en

humanos asociadas a este patógeno ocurre durante los meses de verano, la misma época que la prevalencia de *E. coli* O157:H7 en las heces del ganado bovino es mayor (LeJeune, et al., 2004). Aproximadamente un 86% de los brotes de *E. coli* O157:H7 reportados en Estados Unidos ocurren entre los meses de mayo a octubre. La razón de este patrón se desconoce, pero se cree que puede deberse a un aumento en la prevalencia del patógeno en el ganado vacuno u otros rumiantes o de vehículos de transmisión durante el verano. Además durante esta época de verano hay un aumento en el consumo de carne de res molida o en corte debido a los meses en los cuales se realizan comidas al aire libre, lo cual permite mayor exposición de los humanos a la carne. Por último, también se observa un aumento en el manejo inapropiado de los alimentos, esto incluye: abuso de temperatura, contaminación cruzada y la cocción incompleta de productos cárnicos la cual aumenta durante los meses de calor (Doyle, et al., 2001).

El tiempo promedio en el cual este patógeno se mantiene en el sistema gastrointestinal de los rumiantes es de 30 días, aunque en algunos animales la bacteria puede estar presente hasta un año o más. Los factores que contribuyen a la presencia de la bacteria en rumiantes se desconocen, pero se discute la habilidad de la misma al colonizar una localización en particular en el sistema gastrointestinal. Estudios han demostrado que el colon es el lugar en el sistema gastrointestinal donde principalmente se aloja el patógeno en rumiantes adultos (Grauke, et al., 2002).

3.2 Condiciones de crecimiento

Estudios han demostrado que *E. coli* O157:H7 crece en un amplio rango de temperatura. El mismo puede sobrevivir a temperaturas de congelación y rangos de pH desde 4.4 a 9. La temperatura óptima de crecimiento del patógeno es 37°C, aunque se ha observado crecimiento a temperaturas de 7 a 44.5° C. El proceso de pasteurización o cocción adecuada del alimento a 70° C por 2 minutos elimina el patógeno. Se ha demostrado que a temperaturas de 4 a 5° C la población bacteriana no disminuye significativamente en un periodo de siete días (Pearce, et al.2004). Estudio llevado a cabo con mayonesa comercial confirma la sobrevivencia de *E. coli* O157:H7 en medios ácidos. Se exhibió sobrevivencia de la bacteria en dicho producto a una temperatura de 5° a 7° C durante 35 días, dichas células no fueron detectadas después de 72 horas al ser almacenadas a 25°C. (Doyle, et al., 2001). La mayonesa tenía un pH de 3.65 y un inóculo de 10⁷ UFC (Doyle, et al., 2001).

Estudios han comprobado la tolerancia a la sal de dicho patógeno. La misma fue expuesta a concentraciones de 4.5% y 6.5% de NaCl, donde en la concentración de mayor salinidad se observó una fase lag de 31.7 horas. Estas investigaciones encontraron que no hubo crecimiento a una concentración de NaCl mayor de 8.5% (Doyle, et al., 2001).

La resistencia termal de *E. coli* O157:H7 no es como la de las demás bacterias gram negativas, estas cepas son más sensitivas al calor. Un estudio reciente encontró diferencias en los valores termales D_{60°C} (minutos) entre distintos productos cárnicos. Los valores D aumentan según aumenta en contenido de grasa en el alimento (Jay, 2000).

Varias investigaciones realizadas en ganado lechero en Wisconsin en el 1996, comprobaron que la mayor incidencia de *E. coli* O157:H7 se encuentra en el ganado vacuno joven (Shere, et al.,1998). El uso de antibióticos puede alterar la flora microbiana de bovinos y permitir que el patógeno se multiplique en el tracto digestivo. Además de permitir que *E. coli* O57:H7 adquiriera resistencia a antibióticos tales como la estreptomicina, sulfisoxazole y tetracyclina, permite que tenga una ventaja competitiva sobre la flora microbiana normal. Se ha reportado un aumento en *E. coli* O157:H7 resistentes a antibióticos en humanos (Shere, et al., 1998). Se ha comprobado que la administración de niveles subterapéuticos de antibióticos a animales puede ser un factor contributivo para la resistencia de este patógeno a dichos medicamentos en los humanos (Shere, et al., 1998). Otro factor que puede ayudar a la distribución del patógeno en el ambiente son las aves silvestres ya que durante el vuelo estas pueden esparcir el patógeno a grandes distancias, al llevar partículas de heces en las plumas o patas. Esto convierte estas aves en un peligroso vehículo de transmisión (LeJeune, et al., 2004). La dieta del animal y los cambios en la misma son otros factores que pueden influenciar a que el patógeno persista en el animal (Shere, et al.1998). Muchos estudios se han dedicado a la ecología microbiana de *E. coli* O157:H7 en los intestinos y heces de bovinos. Un estudio reveló que animales cuya dieta era basada en concentrado que contenía 50% alfalfa sin procesar y 50% maíz por un periodo de cuatro días exhibía una disminución en la presencia de *E. coli* O157:H7/g. Investigadores han demostrado que *E. coli* O157:H7 se encuentra en mayor incidencia en ganado que se alimenta de aditivos, estos sugieren que el ionoforo puede ser un factor de prevalencia de este organismo en las heces de bovinos. En otro estudio sobre la dieta demostró que el ganado vacuno cuya dieta era mayormente

de granos, exhibía una disminución en el pH del colon y una mayor cantidad de *E. coli* ácido resistente (Jay, 2000). Otro estudio más reciente determinó que el ganado alimentado con pasto exhibe el patógeno en sus heces por mayor tiempo que animales que son alimentados con granos y que el patógeno era igual en cuanto a su resistencia al ácido. Por otra parte el agrupar el ganado vacuno, utilizar utensilios sin desinfectar y la alimentación temprana de granos han sido factores asociados a un aumento en la incidencia de la bacteria (Jay, 2000).

3.3 Características de *E. coli* O157:H7

Estudios dirigidos hacia la caracterización de *Escherichia coli* serotipo O157:H7 revelan que los marcadores bioquímicos de dicho patógeno son significativamente diferentes a los de *E. coli* genérico. *Escherichia coli* O157:H7 es diferente a otros tipos de *E. coli*, no solo desde el punto de vista clínico y epidemiológico sino que en algunas características bacteriológicas. Una combinación de las reacciones a β -glucuronidasa, sorbitol, rafinosa y dulcitol puede separar preliminarmente este serotipo del resto de los *E. coli* (Ratnam, et al., 1988). Estos análisis incluyen una reacción negativa para la β -glucuronidasa y sorbitol, y una reacción positiva para el análisis de rafinosa y dulcitol. La fermentación de sucrosa fue observada en el 87% de las cepas de *E. coli* O157:H7, en contraste a las de *E. coli* que solo fermentaron un 42-54%. La mayoría de las cepas (87%) fermentan dulcitol y sucrosa en un periodo de 24 horas, mientras que el 89% no fermentaron ramnosa en este periodo de tiempo (Ratnam, et al., 1988). Se ha reportado que *E. coli* es un bacilo gram negativo que fermenta lactosa, que tiene la capacidad de producir β -glucuronidasa, y cerca del 96% producen esta enzima (Ratnam, et al., 1998). *E. coli* O157:H7 es la excepción ya que ésta no fermenta sorbitol. Desde este punto de

vista, el sorbitol puede utilizarse como agente en un medio diferencial para la detección de estos patógenos como *E. hermannii*, recientemente reconocida como miembro del género de *Escherichia*. Ésta no solo es β -glucuronidasa negativo sino que es incapaz de fermentar sorbitol como *E. coli* O157:H7. En adición esta cepa ha reaccionado con el antisuero O157, lo que puede llevar fácilmente a confundir con el serotipo O157:H7. La diferencia entre ambos tipos de *E. coli* es que en medios de cultivos diferenciales de sorbitol como el antisuero-sorbitol H7 y sorbitol-MacConkey arrojan resultados de coloración diferente, siendo las colonias de *E. hermannii* de color amarillo y colonias típicas de *E. coli* O157:H7 de color rosa pálido (Ratnam, et al., 1988).

E. coli O157:H7 produce factores citotóxicos a células Vero las cuales se les han nombrado Verotoxinas o toxinas Shigga, esto por su similitud a la toxina Shigga que produce *Shigella dysenteriae* tipo 1 (Doyle, et al., 2001). Los dos prototipos de toxinas son SLT-1 (Shigga-like toxin 1) y SLT-2 (Shigga-like toxin 2). Este patógeno produce cantidades elevadas de dichas toxinas. Además existen otros serogrupos de *E. coli* que producen Verotoxinas (Ratnam, et al., 1988). Ambas toxinas son estructuralmente similares, son bacteriófagos lisógenos localizadas en los cromosomas que bloquean la translación eucariótica. Estudios sobre el efecto de la temperatura en la producción de toxinas comprobaron que no hay efecto alguno en la síntesis de la toxina. En otro estudio la producción de la toxina ocurrió a temperaturas de 10°, 12° y 37°C. Por otra parte una cantidad menor de toxina se detectó a una temperatura de 21°C (Jay, 2000).

Información epidemiológica indica que las complicaciones de enfermedades tales como el Síndrome Urémico Hemolítico y la Púrpura Trombótica Trombocitopénica son mayormente asociadas a la Verotoxina tipo II. La producción de toxinas varía con el

medio de cultivo, tipo de alimento, temperatura, pH y aeración. En adición a las verotoxinas, este patógeno tiene un plásmido de gran tamaño, siendo esta característica de gran ayuda en la identificación de la cepa patogénica (Leenanon, et al.2003).

La presencia del patógeno en los bovinos al momento de la matanza, marca una gran necesidad en incorporar estrategias para minimizar estos problemas antes o durante este proceso. Esto se observó en un estudio llevado a cabo en Europa en el 2002. Existen varias soluciones, muchas de ellas dirigidas hacia el tiempo, lugar y costos (Omisakin, et al., 2003). Sin embargo la necesidad de tener medidas de control adecuadas se ha estado estudiando hacen años. Varios tratamientos se han investigado para lograr la reducción y la eliminación del patógeno, algunos de los tratamientos han sido efectivos pero algunos solo logran disminuir la concentración bacteriana (Castillo, et al., 1998).

3.4 Ácido Tolerantes

Bacterias ácido lácticas crecen a pH bajo en presencia de acetato, muchas de estas bacterias pueden disminuir el pH intracelular cuando el pH extracelular disminuye. Las cepas de *E. coli* generan un pH alto con un pH extracelular bajo. La regulación de pH intracelular del serotipo O157:H7 no se ha examinado. Basándose en la observación de que muchas bacterias que son resistentes al acetato permiten que su pH intracelular descienda, parece que la cepa O157:H7 tiene un sistema diferente de regulación intracelular del pH. Investigaciones pasadas revelaron que *E. coli* O157:H7 es altamente resistente al acetato y que puede sobrevivir a condiciones aeróbicas con una concentración de 27mM de acetato a un pH de 5.0 por 21 días. Estudios adicionales son necesarios para determinar mejor los mecanismos utilizados por este patógeno para la resistencia al acetato (Diez-González y Russell, 1997).

La sobre vivencia de *E. coli* O157:H7 en alimentos ácidos crea implicaciones nuevas en cuanto a los nuevos procesos para la reducción o eliminación del mismo. Ya que los ácidos orgánicos no han sido capaces de llegar a una reducción completa de la bacteria por ésta ser tolerante en medio ácido, el tratamiento con fosfato trisódico brinda un medio básico a la carcasa que se le aplique el tratamiento lo que puede retar la sobre vivencia del mismo. Sin embargo el patógeno puede sobrevivir a pH de 11 y 12 por más de siete horas.

3.5 Condiciones bajo limitación de nutrientes

El agua es una de las posibles fuentes de contaminación para el ganado vacuno por *E. coli* O157:H7. Esta es un medio excelente de transporte para el patógeno y otras enfermedades. Se ha documentado que las bacterias que crecen inicialmente en un ambiente de nutrientes adecuado al ser expuestas al estrés o condiciones extremas pueden adaptarse al mismo mediante su transformación a estado viable no cultivable. El estado viable no cultivable representa una estrategia de sobrevivencia adoptada principalmente por las bacterias gram negativas en respuesta a condiciones extremas en el ambiente. Factores como la temperatura, concentración de nutrientes, salinidad, presión osmótica y el pH pueden contribuir a este estado de latencia. Estudios realizados por Wang y colaboradores en el año 1998 revelan que algunas cepas de O157:H7 en estado viable no cultivable fueron capaz de crecer en platos de agar. Se ha demostrado que muchas bacterias patógenas en este estado son capaces de producir toxinas, colonizar el huésped y causar enfermedad. Este patógeno tiene la habilidad de existir en este estado latente por largos periodos de tiempo por la razón de que el mismo es altamente competitivo en ambientes acuáticos. Por otra parte la bacteria se adapta mejor a un ambiente de agua

pura que en lagos o reservas de agua, ya que en estos habitan otras bacterias las cuales pueden inhibir el crecimiento de *E. coli* O157:H7 en estado viable no cultivable (Wang, et al., 1998).

Los brotes de infección de *E. coli* O157:H7 donde el vehículo de transmisión ha sido el agua contaminada han aumentado substancialmente durante los años recientes, esto por que han estado asociados con agua donde personas nadan, agua para consumo humano, aguas de pozos y del hielo. En alimentos la actividad de agua máxima en la que puede sobrevivir *E. coli* O157:H7 es de 0.995 y una mínima de 0.95 (Jay, 2000).

3.6 Estrategias de Intervención

Entre las estrategias de intervención evaluadas en varios estudios y actualmente recomendadas se encuentran: el lavado de la canal con agua y vapor, recorte o pelado, tratamientos combinados de agua caliente y ácidos orgánicos. La aplicación de ácidos orgánicos es una alternativa que es utilizada actualmente para la descontaminación de las canales de res en la industria de alimentos. Se ha reportado que el uso de ácidos orgánicos se considera como una práctica GRAS (“Generally Recognized as Safe”) para la reducción de cepas de *E. coli* O157:H7 en carnes rojas (Dorsa, et al., 1995). Generalmente tratamientos con ácido láctico, acético o cítrico a diferentes concentraciones resultan en una disminución de la población de 1 a 4 log₁₀ UFC/cm² en las superficies de canales. La efectividad de los ácidos orgánicos como el ácido láctico para la reducción de patógenos en las canales varía, según los estudios, lo que puede atribuirse a diferencias en concentraciones del ácido, métodos utilizados para la aplicación del ácido, temperatura, tiempo de contacto, técnica de muestreo, tipo de tejido y organismo (Nettles y Siracusa, 1994). En noviembre de 1992, fue aprobado el uso de

ácidos orgánicos durante la pre-eviceración por la FSIS, del Departamento de Agricultura de E.U. Este método ha sido utilizado para aumentar la inocuidad del producto y extender el largo de vida útil de la carne de res y cerdo (Nettles y Siragusa, 1994). Investigadores han evaluado la eficacia de los ácidos ascórbico, propiónico, cítrico, láctico y acético, desde concentraciones de 0.1 hasta 24%, para la reducción de poblaciones de bacterias en carnes rojas. Una mayor reducción de bacterias se obtuvo con una concentración mayor del ácido, combinaciones de ácidos y aumento en la temperatura del tratamiento o si la bacteria estaba adherida a un tejido adiposo. El efecto antibacterial de los ácidos orgánicos se atribuye a moléculas ácidas sin disociar que interfieren con el metabolismo celular o disminuyen en la actividad biológica como resultado de cambios en pH en la célula. El rocear con ácidos al 5% reduce el pH de la superficie de canales de res con tejido adiposo y sin tejido adiposo crea un ambiente desfavorable para el crecimiento de bacterias (Nettles y Siragusa, 1994).

Estudios dirigidos por Nettles y Siragusa en el 1994 comprobaron que los ácidos láctico, cítrico y acético a concentraciones de 5% reducían poblaciones de *E. coli* O157:H7, pero ningún tratamiento logró una eliminación total del patógeno de la carcasa. Dependiendo del tipo de cepa y la población inicial del patógeno se puede obtener reducciones de 1 a 2 \log_{10} UFC/cm². Esto no es considerado suficiente microbiológicamente seguro para un alimento, ya que para el consumo humano el alimento debe de ser seguro e inocuo. Por otra parte, el integrar el uso de los ácidos orgánicos puede ser beneficioso al Plan de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP por sus siglas en inglés).

3.7 Puntos Críticos de Control

Las regulaciones de la FSIS 9 CFR 417.2(c) 1 y 2 requieren que los peligros asociados a la seguridad del alimento sean identificados en un análisis de peligros y sean listados en el plan HACCP. Para cada peligro identificado debe haber un punto crítico de control (PCC). Un punto crítico de control es un punto, paso o procedimiento en el proceso en el cual se puede aplicar un control y como resultado prevenir, eliminar o reducir los riesgos a niveles aceptables (FSIS, 2002).

Cada establecimiento debe de conducir un análisis de peligros con el fin de determinar los peligros de un alimento que ocurren durante el proceso de producción e identificar las medidas preventivas que el establecimiento puede tomar para controlar estos peligros. Los análisis de peligros deben incluir riesgos que ocurren antes, durante y después de la entrada al establecimiento (FSIS, 2002).

Algunos puntos críticos de control en el proceso de matanza del animal que se deben considerar al diseñar un análisis de peligros de acuerdo a la FSIS incluyen:

- La fuente del animal, edad y tipo de animal influye en la prevalencia de *E. coli* O157:H7
- La llegada del animal al área de matanza, éste debe estar limpio, el lodo y materia fecal debe ser mínima
- El área de espera del animal, debe evaluarse la posible contaminación entre animales en el área previo a la matanza
- El área del tiro en el cual se aturde el animal puede ser un vehículo de contaminación
- El sangrado del animal puede ser un vehículo de transmisión.

- El esófago y el contenido ruminal pueden ser un vehículo de transmisión para la carcasa (especialmente la cabeza) si el esófago no está completamente cerrado.
- El proceso de remoción de la cabeza: debe considerarse por una posible contaminación del esófago (contenidos del rumen)
- Durante la remoción de la piel puede ser una fuente de contaminación de la piel, extremidades y la ubre. Puede ocurrir contaminación por heces o el orín.
- Durante la evisceración, puede ocurrir contaminación fecal, del rumen o de orina.
- El lavado final de la canal debe asegurar remoción completa de cualquier contaminante.
- El Congelado de la canal, se debe considerar para prevenir el crecimiento de *E. coli* O157:H7
- El producto final debe almacenarse a 40°F o menor para prevenir crecimiento de *E. coli* O157:H7

4. Metodología

4.1 Fuente de información

Para llevar a cabo esta investigación se obtuvieron las muestras en tres mataderos en el área norte, oeste y sur de Puerto Rico: Mayagüez, Arecibo y Yauco. En estos mataderos cooperadores, el proceso de limpieza de la canal después de la remoción de la piel del animal, fue el mismo. El lavado de la canal se realizaba utilizando agua potable a presión a temperatura de ambiente.

4.2 Recolección de Muestras

Se evaluaron muestras de ganado bovino macho de tipo lechero y de carne, siendo los de leche de la raza Holstein y los de carne de las razas Senepol y Brahmán. Algunos animales eran cruce entre tipo leche con tipo carne, o carne con carne. Este ganado se subdividió por edad: de 4 o menos incisivos permanentes y 5 incisivos permanentes o más. La edad del ganado se determinó mediante el número de incisivos permanentes (Boletín 299 Estación Experimental Agrícola, Casas A., et al., Agosto 2001).

Las muestras fueron tomadas en distintas etapas durante el proceso de matanza: en la canal pre lavada, en la canal post lavada y en el intestino grueso. Las muestras de pre y post lavada se tomaron en el cuarto delantero, en el área de la nuca o cuello, y en el cuarto trasero, ambas de la media canal izquierda, utilizando el método de esponja, según el método aprobado y descrito por la USDA (Meat / Turkey sampling kit Nasco®). (Figura 1).

Dicha muestra se tomó colocando un cuadrante de 4 x 4 designado para el muestreo de carne de res donde se deslizó la esponja diez veces en forma horizontal y diez veces en forma vertical a lo largo de la superficie del cuadrante, posteriormente se colocó en una bolsa estéril (Whirl-Pak®). (Figura 2).

Figura 1. Toma de muestras en el cuarto trasero de la media canal izquierda utilizando el método de esponja. (Meat / Turkey sampling kit Nasco®)



Las muestras de las heces fueron tomadas del intestino grueso, después de la evisceración del animal, utilizando una espátula estéril y colocando la muestra en una bolsa identificada y posteriormente sellada (Figura 3). Para evitar alteraciones en la carga microbiana se colocaron las muestras en bolsas estériles separadas, con solución peptona y debidamente identificadas (Meat / Turkey sampling kit Nasco®).

Se muestrearon un total de 12 canales por matadero, en todos los mataderos se utilizó la misma metodología y los mismos criterios (Tabla 1). Las muestras fueron transportadas al laboratorio de microbiología de alimentos del Programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos del Recinto Universitario de Mayagüez en una nevera portátil con “cold packs” manteniendo una temperatura de alrededor de 4°C, de manera de evitar un estrés adicional a la bacteria por cambios en temperatura. Las muestras se procesaron en un periodo de tiempo de 2-10 horas después de la toma de las mismas.

El periodo de recogido de muestras fue durante los meses de septiembre del 2005 a marzo del 2006. La hora de recogido de muestras variaba dependiendo del proceso de matanza en el matadero.

Tabla 1. Distribución de las muestras obtenidas por área y grupo de edad

Área de Muestras	Ganado bovino con 4 incisivos o menos	Ganado bovino con 5 incisivos o mas
Cuarto Delantero	3	3
Cuarto Trasero	3	3
Intestino	3	3
Total 12 animales por tipo por matadero y 12 muestras por canal		

4.3 Determinación e Identificación de recuento microbiano.

El método utilizado para la determinación de la incidencia de *E. coli* O157:H7 en ganado bovino en los mataderos de Puerto Rico fue el protocolo sugerido de muestreo en alimentos cárnicos según USDA y FSIS.

4.3.a Método de Esponja

Las esponjas de poliuretano se sumergieron en agua de peptona al 1% para enriquecer el cultivo colectado en éstas. Las esponjas sumergidas en 25 ml de peptona al 1% con muestras de la superficie de la canal recolectadas se utilizaron para hacer diluciones seriadas de 10^{-2} hasta 10^{-6} en tubos de ensayo con 9ml de peptona al 0.1%. Se utilizó la técnica de esparcido en plato con 0.1 ml de la dilución en el Agar MacConkey-Sorbitol, esto en duplicado. Este es el medio diferencial para el cultivo y aislamiento de *Escherichia coli* serotipo O157:H7. Estos platos fueron incubados a 35-37°C por 18 horas. Al paso de este período de incubación, las colonias formadas se enumeraron utilizando un contador de colonias (“*Bantex Colony Counter*” 920A). Se reportaron aquellos contajes que estaban dentro de un rango de 25 a 250 colonias por plato.

Figura 2. Toma de muestra del cuarto delantero en la parte izquierda de la media canal utilizando método de esponjas



4.3.b Análisis microbiológico en heces del intestino grueso

Las muestras de heces fueron analizadas tomando 1g de la muestra fecal recogida y colocándola en una bolsa de “*stomacher*” a la cual se añadió 99 ml de peptona al 0.1% para homogenizar la muestra. Se realizaron diluciones seriadas de 10^{-2} a 10^{-7} en botellas de dilución con 90 ml de agua de peptona al 0.1% (Figura 3). Se inoculó 0.1ml de cada dilución, éstas fueron incubadas posteriormente en platos con agar MacConkey-Sorbitol por un periodo de 18 a 24 horas a una temperatura de $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se contaron aquellos platos que contenían 25- 250 colonias.

Figura 3. Toma de heces del intestino grueso utilizando espátula estéril



4.3.c Determinación de bacterias gram-negativas

Se utilizó el medio de cultivo de Eosin Methylene Blue Agar, Levin (EMB) para la identificación de bacterias gram-negativas ya que éste es un medio selectivo y diferencial para bacterias entéricas. Este medio contiene tintes como agentes selectivos para estos microorganismos. Estos inhiben bacterias gram-positivas, además diferencian

entre fermentadores y no fermentadores de lactosa. Permite mejor diferenciación entre las especies de *Escherichia* y *Enterobacter*. (Manual Difco, 2002)

Se utilizaron colonias aisladas que crecieron en platos con agar MacConkey-Sorbitol para la identificación de las bacterias entéricas.

4.3.d Determinación de cantidad total de bacterias

Para la determinación de cantidad total de bacterias se utilizó el caldo de EC (colitis hemorrágica) con reactivo 4-methyl-umbelliferyl- β -glucoronide (MUG) para la confirmación de *E. coli* O157:H7. Se utilizó el método sugerido por el BAM (Bacteriological Analytical Manual). Este método permite determinar la cantidad de bacterias que poseen la enzima beta-glucoronidasa (GUD). El caldo EC contiene peptona como fuente de nutrientes. El medio consiste de un caldo de lactosa con sales biliares de 0.15%. El crecimiento de formadores de esporas y estreptococos fecales se inhibe mediante la presencia de las sales biliares mientras que el mismo aumenta el crecimiento de *E. coli*. Se escogieron colonias incoloras que crecieron en el medio de cultivo MacConkey-Sorbitol las cuales son características para *E. coli* O157:H7.

4.3.e Prueba confirmatoria para *E. coli* O157:H7 mediante aglutinación de látex

Para la identificación confirmatoria del serotipo O157:H7 de colonias negativas para la prueba de sorbitol y MUG se utilizó la prueba de aglutinación de látex con antisuero O157 y H7, esto siguiendo las instrucciones del fabricante (Remel®) (Figura 4). Éstas se aglutinan directamente con suero anti-O157 o mediante una reacción con partículas de látex recubiertas con anticuerpos específicos. Las colonias que muestren una

aglutinación positiva se confirman con pruebas convencionales, ya que hay descritas reacciones cruzadas con otras bacterias como *Yersinia enterocolitica* O9, *Escherichia hermannii* y algunos serotipos de *Salmonella*. Para esta prueba se escogieron colonias que crecieron en agar MacConkey –Sorbitol que eran típicas para *E. coli* O157:H7.

Figura 4. Prueba de aglutinación de látex con antisuero O157 y H7 (Remel®)



4.3.f Caracterización de bacterias entéricas

Como parte de la caracterización de colonias aisladas se realizaron tinciones gram y prueba de oxidasa con el propósito de identificar su morfología celular. Se utilizó el API 20 E (Biomérieux®) que es un sistema de identificación de *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram negativos no fastidiosos. El mismo consiste de 21 pruebas bioquímicas miniaturizadas, así como una base de datos. Estas pruebas ayudaron a la caracterización confirmatoria de las colonias que se aislaron en el medio de MacConkey-Sorbitol (Figura 5).

Figura 5. Prueba bioquímica API 20E (Biomérieux®)



4.4 Análisis Estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorizado en un modelo factorial 2 x 2 x 2 x 3 con efectos fijos (2 tipos, 2 edades, 2 lavadas y 3 localidades). Se utilizó la prueba de McNemar para comparar las proporciones bajo cada condición, efecto de tratamiento: antes y después de lavado durante el proceso de matanza, relacionando las edades y el tipo de ganado lechero o para carne. Esta es una prueba no paramétrica la cual determina cualquier cambio ocurrido antes y después del tratamiento (Rosner, 1995).

Se utilizó la prueba de Wilcoxon, la cual es una prueba no paramétrica, para establecer si dos distribuciones difieren en su parámetro de posición, cuando se dispone de dos muestras con observaciones de pares. La prueba supone que la distribución de la variable diferencia es simétrica y que los valores son mutuamente independientes. Se utilizó el programa para análisis estadísticos InfoStat para calcular el estadístico como la suma de los rangos correspondientes a diferencias positivas. El valor p se obtiene usando la aproximación normal (Manual Infostat, 2002).

Los análisis estadísticos se realizaron para observar si existe algún efecto del tipo de ganado, la edad del animal, el manejo de la canal en el matadero (localidades) y de las lavadas de la canal pre y post deshollinado (remoción de la piel) sobre la incidencia de *E. coli* O157:H7 en la carne de res producida en las áreas evaluadas en Puerto Rico.

4.5 Modelo Estadístico

La comparación de cada condición bajo los efectos del tratamiento antes y después se utilizó la prueba exacta de MacNemar para proporciones correlativas para un estadístico donde el número n menor de 20 muestras. La prueba de MacNemar para proporciones correlativas.

$$p = 2 \times \sum_{k=n_A}^{n_A} \left\{ \binom{n_D}{k} \right\} \left\{ \frac{1}{2} \right\}^{n_D} \text{ if } n_A > n_D / 2$$

$$p = 2 \times \sum_{k=n_A}^{n_A} \left\{ \binom{n_D}{k} \right\} \left\{ \frac{1}{2} \right\}^{n_D} \text{ if } n_A < n_D / 2$$

$$(p = 1 \text{ si } n_A = n_D / 2)$$

Las hipótesis a comprobar son las siguientes: $H_0: \pi_1 = \pi_2$ versus $H_a: \pi_1 \neq \pi_2$

Rechazamos la hipótesis nula si el valor de $p < 0.05$

En la tabla 2 se presenta el modelo de tablas utilizadas donde se van a identificar el par discordante y el par concordante. Se escoge el par de discordantes y se denominan discordante de tipo A y discordante de tipo B.

Tabla 2: Modelo de tablas utilizadas- Prueba de MacNemar

Cuarto Trasero			
	Reduce	No Reduce	Total
		Disc. Tipo B	
Reduce			
No Reduce	Disc.tipo A		
Total			

La prueba Wilcoxon compara los diferentes factores en estudio entre sí, tomando en cuenta la carga microbiana en el área de la canal en la cual se tomaron las muestras, antes y después del lavado de la canal. En el análisis se clasifica el área y efectividad. Se distinguió cada parámetro con letras:

- A= Área del cuarto trasero antes de lavado
- B= Área del cuarto delantero de lavado
- C= Área del cuarto trasero después de lavado
- D= Área del cuarto delantero después de lavado

Conociendo estos criterios se evaluaron los resultados obtenidos de la prueba mediante el uso del sistema Infostat. Las hipótesis son las siguientes: $H_0: M_1 = M_2$ versus $H_a: M_1 \neq M_2$ Donde comparan los promedios de la carga microbiana en log UFC, y se rechaza la hipótesis nula si $p < 0.05$.

5. Resultados y Discusión

5.1 Características del estudio realizado en los diferentes mataderos de Puerto Rico

El estudio para la detección de la incidencia de *E. coli* O157:H7 se llevó a cabo en tres mataderos de Puerto Rico, en los pueblos de Mayagüez, Arecibo y en Yauco. Esto representa alrededor del 60% de los mataderos activos en Puerto Rico. En los mataderos visitados todos llevaban a cabo la matanza de reses de tipo lechero y de carne. Cada matadero hacía uso de las Buenas Prácticas de Manufactura. Los mataderos estudiados tenían sala de espera para el descanso de los animales antes del proceso de matanza. Los animales eran agrupados dependiendo el espacio de esta sala, normalmente estos estaban acomodados en grupos de cuatro o cinco por corral. Las facilidades de los mataderos tienen estaciones para el lavado de manos, agua para desinfección de cuchillos y las sierras utilizadas, área para llevar a cabo la limpieza y evisceración de la canal. Los empleados vestían con delantales, redcillas y casco, algunos hacían el uso de guantes de látex.

Todo establecimiento de alimentos o productos dirigidos para en consumo humano debe tener establecido un plan de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (por sus siglas en inglés HACCP) para el control y monitoreo del proceso. Cada matadero tiene un inspector del USDA el cual se encarga de inspeccionar las canales y las vísceras del animal. Estos se enfocan en la presencia de parásitos, acumulación de fluido infectado o abscesos, contaminantes físicos y de verificar que las buenas practicas de manufactura llevadas a cabo durante el proceso de matanza. Los inspectores además

realizan pruebas para determinar la presencia de diferentes patógenos, entre ellos *E. coli* O157:H7.

Entrevistas realizadas a los diferentes inspectores en los mataderos colaboradores, indicaron que nunca han tenido casos de *E. coli* O157:H7 en sus mataderos. En adicción, cada matadero tiene una persona encargada del control de calidad, donde estos toman también muestras para la detección de *E. coli* O157:H7 una vez al mes escogiendo una canal al azar, *E. coli* genérico o biotipo 1 y recuento total de bacterias una vez en semana escogiendo una canal al azar. Esto les provee una idea de la calidad e inocuidad en la cual sus empleados trabajan y la salud de los animales que llegan al matadero.

Los mataderos visitados tenían dos puntos críticos de control durante el proceso de matanza. El primer punto crítico de control era el lavado final de la canal, donde el personal de control de calidad escogía una canal al azar y se verificaba que no tuviera peligros biológicos o físicos. El segundo punto crítico de control era la temperatura del producto en la nevera, donde dicha temperatura era monitoreada dos veces al día. La temperatura es el parámetro ambiental más importante que influye en el crecimiento de microorganismos en la canal (Doyle. et al, 2001).

El matadero de Mayagüez almacenaba sus productos a 40°F. En los mataderos de Arecibo y Yauco al tener facilidades de procesar la canal, estos mantenían las neveras a temperaturas de 30 a 38°F. La canal tiene que llegar a una temperatura interna de 40°F en un periodo de 24 horas. De acuerdo a la USDA los productos cárnicos que sean potencialmente peligrosos y tengan riesgos de contaminación post procesos deben enfriarse dentro de este periodo.

Aberle y colaboradores evaluaron el efecto de temperatura de almacenamiento de la carne molida y el crecimiento de bacterias psicotróficas. El estudio reveló diferencias marcadas en crecimiento microbiano a temperaturas por debajo de los 5°C, enfatizando la extrema importancia en mantener una temperatura de refrigeración óptima para el almacenado de productos cárnicos.

5.2 Recuento de colonias

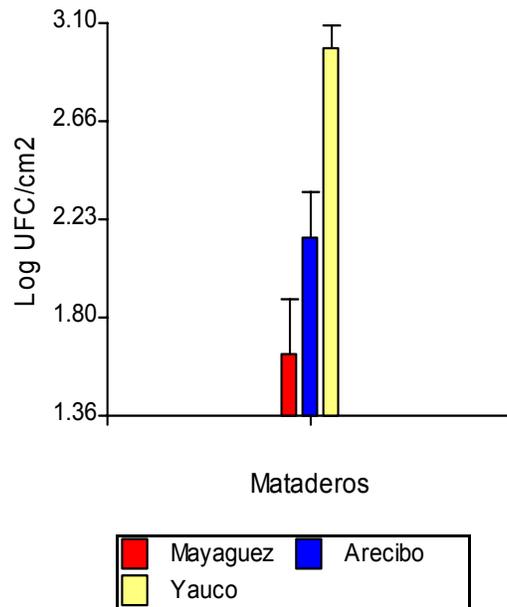
Tabla 3: Promedios de log UFC por variable

Fuente de variación	Promedios de log UFC/cm²
Áreas	
Cuarto Delantero	2.52
Cuarto trasero	2.23
Intestino	6.37
Edades	
4 incisivos permanentes o menor	4.35
5 incisivos permanentes o mayor	4.39
Tipos	
Ganado lechero	4.57
Ganado para carne	4.84
Localidades	
Mayagüez	7.33
Yauco	9.65
Arecibo	13.46
Tratamientos	
Antes de lavado	2.34
Después de lavado	2.28

Se utilizó la prueba de Wilcoxon para analizar estadísticamente si el recuento microbiano en cada una de las fuentes de variaciones era significativamente diferente. Los resultados de la Tabla 3 muestran los promedios de log UFC/cm² encontrados en el estudio. La investigación revela que los promedios de los log UFC/cm² por matadero demuestran diferencias significativas estadísticamente ($p < 0.05$). Los conteos microbianos en el matadero de Mayagüez fueron los más bajos, seguidos por el matadero de Arecibo y por último el de Yauco. En la Gráfica 1 se pueden observar las comparaciones de los UFC/cm² promedios en los tres mataderos. Los conteos microbianos en los tres mataderos son bajos y no tienen ningún efecto en el producto final. Estudios realizados por la FSIS/USDA sobre la comparación de varias estrategias de intervención durante el proceso de matanza revelaron que la aplicación de agua para contra restar carga microbiana y *E. coli* O157:H7 exhibía una reducción de 4.71 ± 0.53 log UFC/cm² en heces.

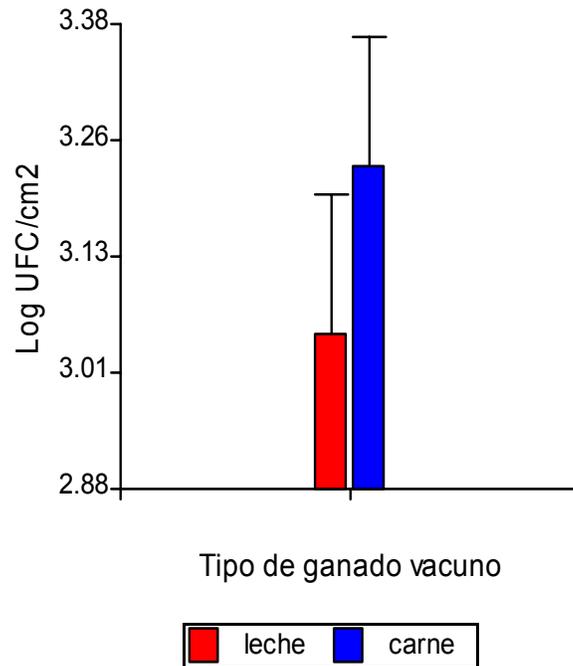
Arthur y colegas (2004) reportaron un promedio de recuento total aeróbico de 7.8 UFC/100cm² en la piel de ganado vacuno y 1.4 UFC/100cm en carcasas refrigeradas

Gráfica 1: Promedios de log UFC/cm² en mataderos



El factor tipo de animal según el análisis estadístico demostró que no exhibe diferencias significativas, indicando que la carga microbiológica del ganado tipo carne no es estadísticamente diferente comparada con el ganado lechero. En la Gráfica 2 se comparan los resultados de los promedios de log UFC/cm² resultantes de ganado tipo lechero y ganado para carne. Grauke informa que *E. coli* O157:H7 normalmente se encuentra en el ganado vacuno pero prevalece con más frecuencia en el ganado lechero. En este estudio realizado no se encontró la presencia del patógeno en ningún tipo de animal, pero si una mayor carga microbiana en el ganado para carne. Se puede deducir que una posible razón a un recuento mayor en ganado para carne sea la administración de antibióticos a ganado lechero para la prevención de enfermedades como mastitis.

Gráfica 2: Promedios de log UFC/cm² tipo de ganado

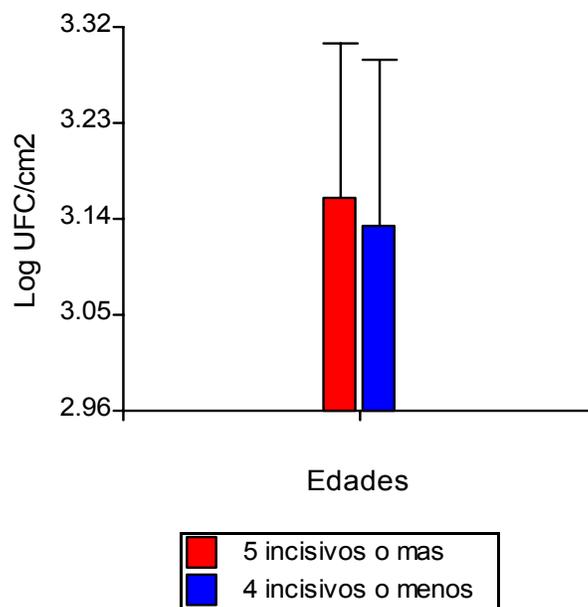


El estudio revela que en el factor edad no existen diferencias significativas, lo que infiere que los recuentos microbianos en ambos parámetros no son diferentes. Esto indica que la variable edad no influye en la eficiencia del tratamiento aplicado a la canal o en la carga microbiana. Investigaciones hechas por Shere (1998) en ganado lechero comprobaron que una mayor incidencia de *E. coli* O157:H7 se encuentra en el ganado vacuno joven. En los estudios realizados no se detectó la presencia de *E. coli* O157:H7, y revelan que existe una mayor carga microbiológica en el ganado adulto. Los hallazgos de esta investigación concuerdan con las investigaciones realizadas por Doyle y colaboradores (2001).

Doyle y colaboradores (2001) indican que las células bacterianas tienden a ser más resistentes mientras están en la fase estacionaria de crecimiento, estas células son

más viejas y menos activas, mientras que cuando están en la fase logarítmica son más resistentes. Esto indica que las células de animales de 5 incisivos o más tienen células bacterianas más resistentes por lo tanto se va a observar un recuento microbiano mayor que en animales de menor edad.

Gráfica 3: Promedios de log UFC/cm² en edades

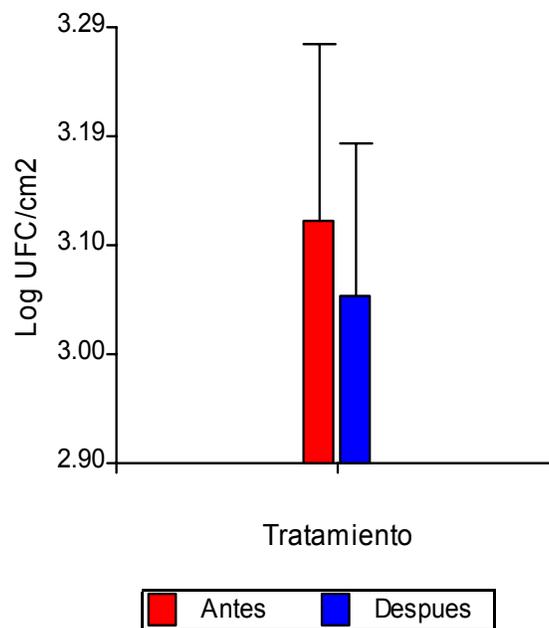


El análisis estadístico de la comparación de la carga microbiana antes y después del tratamiento de lavado estadísticamente demostró que el lavado de la canal sí tenía un efecto con respecto a la carga microbiana ($p < 0.05$). La Gráfica 4 muestra las comparaciones de carga microbiana antes y después del tratamiento en la canal. En general el tratamiento del lavado fue efectivo para la disminución o eliminación de la carga microbiana inicial en la canal, sin embargo en ocasiones después del tratamiento la

carga microbiana aumentó. El aumento en colonias después de lavado pueden deberse a contaminación durante el proceso y manejo inadecuado de parte de los empleados.

Dorsa (1995) dirigió sus estudios hacia la evaluación de la efectividad de lavado de la canal con agua potable a diferentes rangos de temperatura. Este comprobó la reducción de 1 log en la canal después del lavado con agua a presión. Por otra parte afirma que el agua a temperaturas de 83.5 a 44.5°C fueron mas efectivas en cuanto a la reducción de la carga microbiana inicial.

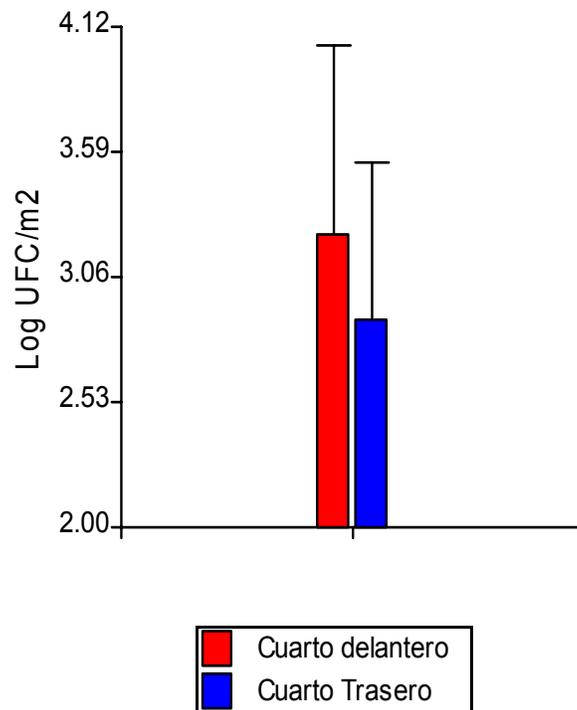
Gráfica 4: Promedios de log UFC/cm² variable tratamiento



El lugar de muestreo en la canal es un factor muy importante ya que las áreas analizadas estaban expuestas a posible contaminación durante el proceso de matanza. Las áreas de muestra fueron en el cuarto delantero en el área de la nuca o cuello, en el anca o cuarto trasero y en el intestino. El área de muestreo en el cuarto trasero (el anca) está

cerca del ano del animal, por lo que se presume sea más fácil la contaminación por las heces, y en el cuarto delantero (en la nuca del animal) la cual queda más cerca del suelo y cabeza del animal, lo que puede ocasionar contaminación con el contenido ruminal. (FSIS/USDA, 2002.). El estudio realizado demostró que en el cuarto delantero había mayor carga microbiológica que en el cuarto trasero, al realizar el análisis estadístico este demostró que si existen diferencias significativas en las áreas de muestra. ($p < 0.05$)

Gráfica 5: Promedios de log UFC/cm² en lugar



Las poblaciones de colonias a lo largo del estudio se mantuvieron en un recuento de bacterias de 10^2 a 10^3 . Doyle (2001) indica que la carne comienza a dar señales de deterioro cuando el recuento microbiano llega a 10^7 UFC/cm². A si mismo, estudios

sobre la calidad de carne comprobaron que los productos que exhiben un conteo microbiano menor de 10^5 bacteria/g exhiben una calidad microbiana aceptable (Jay et al, 1986). Esto nos indica que los productos analizados en estos mataderos caen dentro de estos parámetros, y demuestran una calidad microbiológica aceptable en el producto cárnico.

Estudios realizados por Byrne y colaboradores (2000) que analizaron la reducción de *E. coli* O157:H7 durante el proceso de matanza mediante el lavado de la canal, revelaron contajes de bacterias en las manos de los trabajadores, cuchillos y sierras utilizadas para el proceso de eviscerado y remoción de la piel de la canal.

5.3 Resultados de análisis microbiológico

El análisis se llevó a cabo con esponjas de poliuretano, estas se han utilizado para la detección de bacterias en la industria de alimentos. Algunas de las ventajas del uso de estas esponjas en la toma de muestras de superficies son la habilidad de poder analizar áreas amplias y la detección de bajos niveles de contaminación. (Lasta, et. Al., 1992)

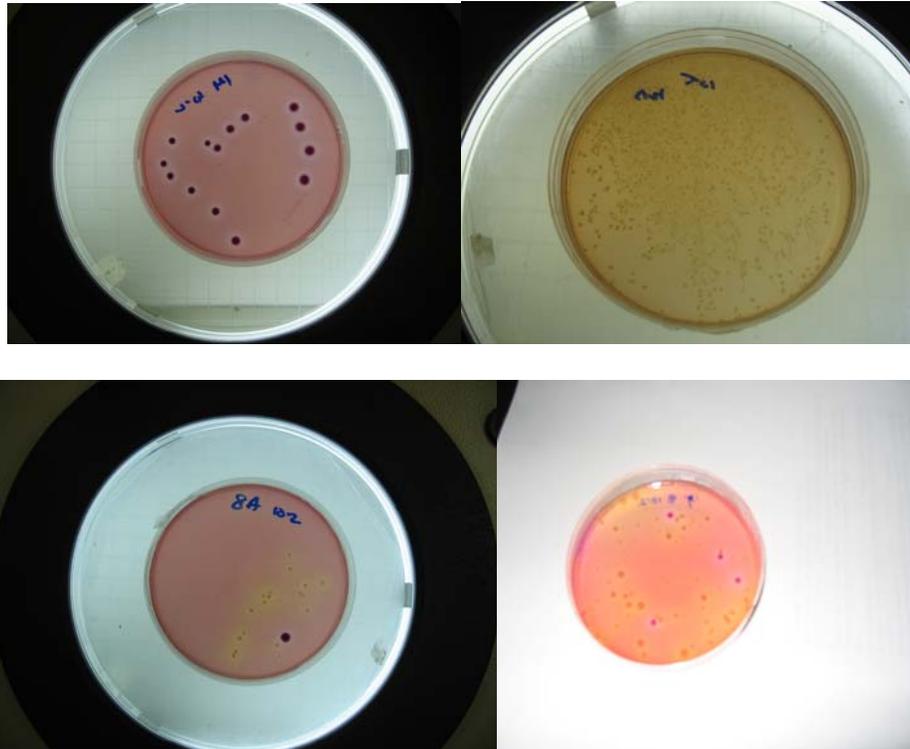
Las muestras inoculadas en platos de MacConkey-Sorbitol demostraron un crecimiento de colonias rosa brillante que indican que es sorbitol positivo y colonias rosa pálido en sorbitol negativo. *E. coli* O157:H7 es sorbitol negativo lo cual exhibe una colonia típica incolora o rosa pálido en MacConkey Sorbitol.

En la Figura 6 se observa el crecimiento característico de colonias en el medio de cultivo MacConkey-Sorbitol. Se observaron colonias rosa brillante y rosa pálido o incoloro. Las colonias incoloras fueron posteriormente confirmadas negativo para el patógeno *E. coli* O157H:7 con las pruebas confirmatorias. Las colonias rosa brillante

indicaron la presencia de *Escherichia coli* biotipo 1 en las pruebas bioquímicas de API 20E.

Estudios llevados a cabo por Pao y colaboradores (2004), que utilizaron medios de cultivo como MacConkey-Sorbitol para la determinación de *E. coli* O157:H7, no fueron exitosos. Sin embargo una muestra resultó positiva en agar MacConkey-Sorbitol con cefixime y telurito lo que hace que este sea un medio mas selectivo y diferencial ya que inhibe *Proteus mirabilis*, cepas de *E. coli* no O157:H7 y especies no fermentadoras de sorbitol.(Manual Difco, 2002).

Figura 6. Crecimiento de colonias en el agar MacConkey-Sorbitol



5.4 Determinación de bacterias gram-negativas

Los resultados de muestras inoculadas en platos EMB exhibieron todos coloración verde metálico el cual es indicativo de bacterias del género *Enterobacteriaceae*. En la Figura 7 se observan los resultados de colonias aisladas. Estos resultados revelan la presencia de bacterias del género *Enterobacteriaceae* en la canal. Éstas son indicativas de contaminación fecal, lo que podría eventualmente afectar el largo de vida útil del producto (Jay, 2000).

Figura 7: Platos con agar EMB exhibieron coloración verde metálico

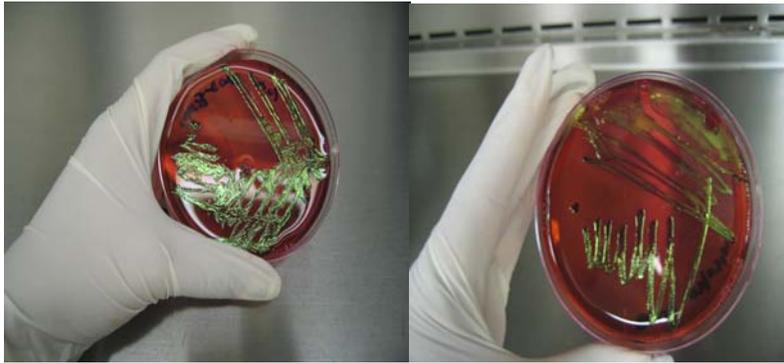


Tabla 4: Resultados de pruebas confirmatorias para *E. coli* O157:H7

Variable	¹ Número de muestras	Prueba con caldo EC	Prueba de aglutinación de látex
Área			
Cuarto delantero	9	Negativo	Negativo
Cuarto trasero	8	Negativo	Negativo
Intestino	15	Negativo	Negativo
Edad			
4 incisivos permanentes o menos	18	Negativo	Negativo
5 incisivos permanentes o mas	14	Negativo	Negativo
Tipo			
Ganado lechero	15	Negativo	Negativo
Ganado para carne	17	Negativo	Negativo
Localidad			
Mayagüez	7	Negativo	Negativo
Yauco	15	Negativo	Negativo
Arecibo	10	Negativo	Negativo
Tratamiento			
Antes de lavado	7	Negativo	Negativo
Después de lavado	10	Negativo	Negativo

¹ Las pruebas confirmativas se realizaron solo a las colonias típicas de *E. coli* O157:H7

5.5 Pruebas confirmatorias para *E. coli* O157:H7

Se llevaron a cabo las pruebas de identificación prueba de EC con MUG y la prueba de aglutinación de látex para confirmar la presencia de *E. coli* O157:H7 en las colonias que crecieron en el medio de MacConkey-Sorbitol

5.5.a Prueba confirmatoria para *E. coli* O157:H7 mediante caldo EC con MUG

Los resultados de la prueba confirmatoria para *E. coli* O157:H7 utilizando el caldo EC con MUG fueron negativos para todas las variables evaluadas en este estudio (Tabla 3). Todos los tubos con caldo EC con MUG exhibieron fluorescencia en un periodo de 24 horas a una temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ al exponerse a la luz ultravioleta, confirmando un resultado negativo para *E. coli* O157:H7 (Figura 8). Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por la USDA (2005) donde indican que la incidencia de *E. coli* O157:H7 está por debajo de los objetivos del “National Healthy People 2010”. Estudios recientes indican que las infecciones de *E. coli* O157:H7 han disminuido un 42%.

Figura 8. Tubos con caldo EC inoculados con colonia proveniente de MacConkey-Sorbitol iluminados con luz ultravioleta.



Las colonias típicas para *E. coli* O157:H7 en el medio de cultivo MacConkey-Sorbitol fueron inoculadas en caldo de EC con MUG. Se comprobó la actividad de la enzima beta glucuronidasa (GUD) en caldo de EC (colitis hemorrágica) con reactivo 4-methyl-umbelliferyl- β -glucoronide (MUG). Este método permite determinar la cantidad total de bacterias que poseen la enzima beta-glucuronidasa (GUD) cuya acción se pone de manifiesto sobre el indicador cromogénico del medio de cultivo al producirse un cambio de pH. La enzima β -glucuronidasa cataliza la hidrólisis del substrato fluorogénico MUG. El resultado se verificó mediante la fluorescencia del tubo de ensayo con caldo de EC inoculado con una colonia característica para *E. coli* O157:H7 proveniente del agar de MacConkey-Sorbitol utilizando una luz ultravioleta portátil. Un tubo que exhiba fluorescencia es indicador de un resultado negativo para el patógeno, la no fluorescencia es indicador de una prueba positiva (Manual Difco, 2002).

5.5.b Prueba de aglutinación de látex para confirmación de *E. coli* O157:H7

Las colonias incoloras que crecieron en MacConkey-Sorbitol fueron confirmadas negativas para el patógeno *E. coli* O157:H7 no exhibiendo aglutinación con la prueba de aglutinación de látex. Esto para todas las variables evaluadas en este estudio. Esto indica que no hubo influencia de tipo de animal, edad y localidades estudiadas (Tabla 3). La Figura 9 muestra el resultado negativo para *E. coli* O157:H7 utilizando el método de aglutinación de látex.

Estos resultados negativos para *E. coli* O157:H7 confirman estudios realizados por la USDA que se ha observado una disminución de un 42% sobre la incidencia del patógeno durante los años 1996 al 2003.

Figura 9. Prueba de aglutinación de látex (Remel®)



5.6 Análisis estadístico para eficiencia del tratamiento y carga microbiana promedio

El análisis estadístico de MacNemar demuestra las proporciones bajo estudio. La tabla 5 indica la eficiencia del tratamiento aplicado en la canal en las áreas de muestra, en el cuarto trasero y en el cuarto delantero en el matadero de Mayagüez. La prueba indica que no hay diferencias significativas antes y después del tratamiento en ambas áreas bajo estudio, $p=1$.

Tabla 5: Comparación de la eficiencia del tratamiento aplicado a la canal en el matadero de Mayagüez

		Cuarto Trasero		
		Reduce	No Reduce	Total
Cuarto Delantero	Reduce	0	1	1
	No Reduce	1	10	11
	Total	1	11	12

Tabla 6: Promedio de log UFC antes y después de lavado de la canal en muestras recolectadas en el matadero de Mayagüez

	Promedio de log UFC/cm ² antes de lavado	Promedio de log UFC/cm ² después de lavado
Cuarto trasero	0.278	< 1
Cuarto delantero	0.988	1.59

La carga microbiana en las canales se promedió para comprobar si existían diferencias significativas antes y después del tratamiento. El análisis estadístico de Wilcoxon fue utilizado para esta comparación. Para el matadero de Mayagüez (Tabla 5)

se observó que para los parámetros de antes y después del tratamiento en la parte del cuarto trasero de la canal existían diferencias significativas ($p < 0.05$). Esto se debe a que el tratamiento podía reducir la carga microbiana o aumentarla. El aumento de la carga microbiana puede deberse a contaminación durante el proceso de matanza o la calidad del agua (FSIS/USDA, 2002). En adición se demostraron diferencias significativas en la carga microbiana en la canal antes y después del tratamiento en el área de estudio del cuarto delantero. En su mayoría en esta área ocurría un aumento en la carga microbiológica, lo que puede atribuirse a que esta área se encontraba cercana al suelo, lo que aumenta la probabilidad de contaminación cruzada. Por otra parte la carga microbiana del cuarto trasero y del cuarto delantero antes y después del lavado en una misma canal no mostraron diferencias significativas.

Tabla 7: Comparación de la eficiencia del tratamiento aplicado a la canal en el matadero en Arecibo

	Cuarto Trasero			
	Reduce	No Reduce	Total	
Cuarto Delantero				
	Reduce	2	3	5
	No Reduce	5	2	7
	Total	7	5	12

Las comparaciones de eficiencia del tratamiento a la canal en el matadero de Arecibo se demuestran en la Tabla 7. El análisis estadístico de MacNemar comprueba que no hay diferencias significativas con la aplicación del tratamiento en ambos lugares de la canal, el valor de $p = 0.7266$.

Tabla 8: Promedio de log UFC antes y después de lavado de la canal en muestras recolectadas en el matadero de Arecibo

	Promedio de log CFU/cm ² antes de lavado	Promedio de log CFU/cm ² después de lavado
Cuarto trasero	1.68	1.09
Cuarto delantero	0.86	1.08

Para los promedios de carga microbiana en el matadero de Arecibo se pudo comprobar que hubo diferencias significativas para todos los parámetros bajo estudio utilizando el análisis estadístico de Wilcoxon. En su mayoría el tratamiento no reducía la contaminación microbiana, esto porque la carga microbiana era muy baja o porque la canal exhibía un aumento en la carga microbiana después del tratamiento. En su mayoría el área del cuarto delantero era la que presentaba post contaminación al tratamiento, esto se debe a su cercanía al suelo.

Tabla 9: Comparación de la eficiencia del tratamiento aplicado a la canal en el matadero en Yauco

	Cuarto Trasero			
	Reduce	No Reduce	Total	
Cuarto Delantero				
	Reduce	5	1	6
	No Reduce	1	5	6
	Total	6	6	12

El matadero de Yauco, similar a los restantes mataderos estudiados, no demostró diferencias significativas antes y después del tratamiento mediante el análisis estadístico de MacNemar. En la Tabla 9 se puede observar los resultados de la reducción de carga microbiana por área con el tratamiento, el valor de p para esta prueba fue $p=1$.

Tabla 10: Promedio de log UFC antes y después de lavado de la canal en muestras recolectadas en el matadero de Yauco

	Promedio de log UFC/cm ² antes de lavado	Promedio de log UFC/cm ² después de lavado
Cuarto trasero	1.62	1.50
Cuarto delantero	1.54	2.13

Para el análisis estadístico de Wilcoxon el matadero de Yauco no exhibió diferencias significativas para los parámetros en estudio. Esto indica que la carga microbiana en la canal fue muy baja en todas las comparaciones. Se observó contaminación post lavado mayormente en el área del cuarto delantero, esto puede atribuirse a que el área estaba sujeta a una mayor contaminación debido a su cercanía al suelo y líquido ruminal que podían pasar hacia la canal durante el eviscerado.

5.7 Resultados de carga microbiana en heces

Tabla 11: Promedio de UFC en muestra de heces del intestino

Matadero	Promedio de log UFC/g en Heces
Mayagüez	6.47
Arecibo	6.30
Yauco	6.33

En la Tabla 11 se presentan los promedios de la carga microbiológica de las heces en platos de MacConkey-Sorbitol. Los promedios en todos los mataderos fueron cercanos. Las muestras analizadas arrojaron resultados negativos para la presencia de *E. coli* O157:H7 pero positivos para *E. coli*.

5.8 Resultados de la prueba de API 20E (Biomérieux®)

Se utilizó la prueba de API 20E (Biomérieux®) (Figura 10) para la identificación de las colonias presentes en los platos de MacConkey- Sorbitol de las muestras de las canales recogidas en los mataderos bajo estudio. Se realizaron 10 pruebas a colonias características de *E. coli*. El sistema API 20E es específicamente para la detección de bacterias de importancia clínica, algunos resultados de las pruebas no se encontraron en el catálogo de API 20E, lo que indica que las otras bacterias no son de interés clínico y por consiguiente no causan enfermedad alguna. Los resultados de las pruebas bioquímicas en el API 20E identificaron la presencia de *E. coli* y de una posible *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes*.

Figura 10. Resultados de la prueba API 20E



E. coli es indicativo de contaminación fecal lo que nos indica que hubo contaminación cruzada durante el proceso de matanza. Esto pudo haber llegado al

músculo durante el descuere del animal donde en ocasiones la piel entraba en contacto con el músculo. Por otra parte esta bacteria no causa enfermedad en el humano y los resultados de los contajes para *E. coli* fueron bien bajos.

Las especies de *Enterobacter* particularmente *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes* son patógenos importantes responsables de diversas infecciones incluyendo infecciones del tracto respiratorio, de la piel, infecciones del tracto urinario, endocarditis, infecciones intra-abdominales, osteomielitis, artritis séptica e infecciones oftálmicas. Las especies de *Enterobacter* rara vez causan enfermedades a personas saludables. Estos patógenos oportunistas similares a los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, poseen una endotoxina que juega un papel primordial en la fisiología de la sepsis y sus complicaciones. Las personas más susceptibles para el contagio de infecciones por *Enterobacter* son aquellas en hospitales, especialmente aquellas en cuidado intensivo por largos periodos de tiempo. Otros factores de riesgo es el uso previo de agentes antimicrobiales, condiciones como la diabetes, quemaduras, ventilación mecánica, el uso de catéteres y un sistema inmunosuprimido (Sinave, 2003).

El vehículo de transmisión puede ser endógeno (vía colonización de la piel, sistema gastrointestinal o tracto urinario). Múltiples estudios y reportes han incriminado las manos del personal a cargo, soluciones intravenosas, endoscopios, productos derivados de sangre, maquinarias para monitorear la presión intra arterial y estetoscopios como fuentes para la infección (Sinave, 2003). En este estudio se sugiere que la presencia de esta especie podría deberse a pobre higiene de parte de los empleados ya que este puede ser transmitido por la flora microbiana de la piel, tracto gastrointestinal o tracto

urinario, en adición, el no utilizar guantes de látex durante el proceso de evisceración y lavado de la canal.

6. Conclusiones

Los resultados de la investigación para la presencia de *Escherichia coli* O157:H7 fueron negativos. Esto indica que el factor de edad y tipo no son determinantes en la incidencia de *E. coli* O157:H7 en los mataderos de Puerto Rico. Además, se puede inferir que por ende no existe hasta el momento la necesidad de incorporar estrategias adicionales para la prevención para *E. coli* O157:H7, lo cual significaría gastos adicionales innecesarios para los mataderos evaluados.

Por otra parte, al evaluar la efectividad del tratamiento aplicado para la reducción de la carga microbiana, en los mataderos estudiados, no exhibieron diferencias significativas en la carga microbiana de la canal. Esto podría deberse a que la misma carga inicial era muy baja, sin embargo se observó frecuentemente la contaminación post tratamiento. Esto puede atribuirse a un manejo inadecuado de parte de los empleados durante el proceso de matanza o por la calidad del agua que se utilizó, lo que motiva una investigación en estas áreas.

Los resultados de las pruebas bioquímicas de API 20E, arrojan que en las colonias había la presencia de *E. coli* genérico, el cual sirve como indicador de contaminación fecal en la canal. Esto demuestra que durante el proceso de matanza el músculo, que supone que sea estéril tuvo contacto con materia fecal. En adición los resultados indicaron una posible presencia de *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes*, esta bacteria puede ocasionar enfermedades a la salud.

Sin lugar a dudas, el proceso de matanza es un punto muy importante para la seguridad del producto final. Sin embargo se deben tomar medidas de prevención empezando en la finca donde proviene el animal ya que muchos de los patógenos

proviene de esta y finalizando en la mesa, cuando el consumidor es el que está a cargo de que el producto final sea seguro. Por otra parte las medidas de control dependen de muchos factores, como un manejo y cocción adecuada por parte de los consumidores, manejo apropiado durante la transportación, seguido de los planes HACCP en los mataderos (Garber et al., 1998).

7. Recomendaciones

Concerniente a los resultados de la investigación se hacen las siguientes recomendaciones para futuros estudios:

- Realizar un estudio similar en todos los mataderos activos en Puerto Rico.
- Realizar un estudio similar durante los meses de verano, época en que el patógeno se estima es más frecuente.
- Personas que dirijan sus investigaciones para la identificación de *Escherichia coli* O157:H7 deben utilizar medios de cultivos más sensitivos, selectivos y diferenciales para la identificación del patógeno.
- El personal de control de calidad debe ofrecer seguimiento a sus empleados sobre las buenas prácticas de manufactura para minimizar la carga microbiana en la canal.
- El personal de los mataderos deben verificar la calidad del agua con la cual están lavando las canales para asegurar que ésta no está causando un aumento en la carga microbiana.
- Orientar al consumidor sobre las diferentes enfermedades causadas por alimentos.

Referencias

Aberle E.D., J.C. Forrest, D.E. Gerrard, E.W. Mills, H.B. Hedrick, M.D. Judge y R.A. Merkel. 2001. Principles of Meat science. Fourth Edition. Kendall/Hunt Publishing Company, Dubuque, Iowa.

Arthur T.M., J.M, Bosilevac, X Nou, S.D. Shackelford, T.L. Wheeler, M.P. Kent, D. Jaroni, B. Pauling y D.M. Koohmaraie M.2004. *Escherichia coli* prevalence and enumeration of aerobic bacteria, *Enterobacteriaceae*, and *Escherichia coli* O157 at various steps in commercial beef processing plants. Journal of Food Protection. 67: 658-65.

Bacteriological Analytical Manual

Visitada en Abril 2005 <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-mm.html>

Bosilevac M. y M. Koohmaraie 2003. Efficacy of cetylpyridinium chloride to reduce *E. coli* O157:H7 in comercial beef processing plants. Cattlemen's beef board, national cattlemen's beef association center for research and knowledge management.

Byrne C.M., Bolton D.J., Sheridan J.J., McDowell D.A., Blair I.S. 2000. The effects of preslaughter washing on the reduction of *Escherichia coli* O157:H7 transfer from cattle hides to carcasses during slaughter. Journal of Applied Microbiology 30: 142-146.

Casas, A., Cianzio, D. y Rivera, A. 2001. Boletín 299 Estación Experimental Agrícola Agosto 2001.

Castillo A., L.M. Lucia, K.J. Goodson, J.W. Savell y G.R. Acuff. 1998. Comparison of water wash, trimming, and combined hot water and lactic acid treatments for reducing bacteria of fecal origin on beef carasses. Journal of Food Protection. 61(7): 823-828.

Centers for disease control and prevention: Department of Health and Human Services. Visitada en Enero 2006

http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/escherichiacoli_g_sp.htm

Conner D.E. y J. Kotrola. 1995. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. Journal of Applied and Environmental Microbiology. 61(1):382-385.

Council for Agricultural Science and Technology. 2004. Intervention strategies for the microbiological safety of foods of animal origin. Issue Paper 25

Diez-González F. y J.B. Russell.1997. The ability of *Escherichia coli* O157:H7 to decrease its intracellular pH and resist the toxicity of acetic acid. *Microbiology* 143: 1175-1180

Dorsa J.W., C. Cuter, R.G. Siragusa y M. Koochmaraje.1995. Microbial determinations of beef and sheep carcasses by steam, hot spray washes, and a stream-vacuum sanitizer. *Journal of Food Protection* 59(2):127-135

Dorsa J.W. y C. Cuter.1997. Effects of acetic acid, lactic acid and trisodium phosphate on the microflora of refrigerated beef carcass surface tissue inoculated with *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria innocua* and *Clostridium sporogenes*. *Journal of Food Protection* 60(6):619-624.

Doyle M.P., Beuchat R.L. y Montville J.T.2001.*Food Microbiology Fundamentals and frontiers*. Second Edition. ASM Press, Washington, D.C.

Food Safety and Inspection Service.2002. Guidance for minimizing the risk of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in beef slaughter operations. http://www.fsis.gov/OPHS/NACMF/rep_stand.htm

Gansheroff L.J. y A.D. O'Brien. 2000. *Escherichia coli* O157:H7 in beef cattle presented for slaughter in the U.S.: Higher prevalence rates than previously estimated. *Proc Natl. Acad Sci USA* 97(7):2959-2961

Garber L., S. Wells, L. Schroeder-Tucker, y K. Ferris.1999. Factors associated with fecal shedding of verotoxin producing *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms. *Journal of Food Protection* 62(4):307-312.

Grauke L.J., I.T. Kudva, J.W. Yoon, C.W. Hunt, C.J. Williams y C. Hovde. 2002. Gastrointestinal tract location of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminants. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 68(5):2269-2277.

Jay J.M. 2000. Modern Food Microbiology. Sixth edition. Aspen Publishers Inc. Gaithersburg, Maryland

Jay, J.M., M.D. Pearson y N.J. Stern.1986. Foodborne Microorganisms and their Toxins: Developing Methodology, Marcel Dekker, New York, N. Y.

Kang H.D.y D. Fung.1999. Development of a medium for differentiation between *Escherichia coli* and *Escherichia coli* O157:H7. Journal of Food Protection 62(4):313-317.

Khaita M.I., D.R. Smith, J.A. Stoner, A.M. Parkhurst., S. Hinkley, T.J. Klopfenstein y R.A. Moxley. 2003. Incidence, duration, and prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 fecal shedding by feedlot cattle during the finishing period. Journal of Food Protection. 66(11): 1972-1977

Lasta J.A., R. Rodríguez, M. Zanelli y C.A. Margaria.1992. Bacterial count from bovine carcasses as an indicator of hygiene at slaughtering places: A proposal for sampling. Journal of Food Protection. 54(4):271-278

LeJeune J.T., T.E. Besser, D.H. Rice, R.P. Berg y D.D. Stilborn.2004. Longitudinal study of fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle: Predominance and persistence of specific clonal types despite massive population turnover. Journal of Applied and Environmental Microbiology.70(1):377-384.

Miller G.L. y C. Kaspar.1994. *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. Journal of Food Protection 57(6): 460-464

Mustapha A., T. Ariyapitipun y A.D. Clarke. 2002. Survival of *Escherichia Coli* O157:H7 on vacuum packaged raw beef treated with polylactic acid, lactic acid, and nicin. Journal of Food Science 67(1): 262-267

Nettles C. y G. Siragusa. 1994. Efficacy of organic acids against *Escherichia coli* O157:H7 attached to beef carcass tissue using a pilot scale model carcass washer. Journal of Food Protection 57(2): 97-103.

Omisaskin F., M. MacRae, I.D. Ogden. y N.J. Strachan.2003.Concentration and prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle feces at slaughter. Journal of Applied and Environmental Microbiology. 69(5): 2444-2447.

Pao, S., M. Patel, A. Kalantari, J.P. Tritschler, S. Wildeus y B.L. Sayre.2004. Detection of Salmonella strains and *Escherichia coli* O157:H7 in feces of small ruminants and their isolation with various media. Journal of Applied and Environmental Microbiology.71(4):2158-2161

Paytton-Pruett W., T. Biela, C.P. Lattuada, P.M. Mrozinski, M.W. Barbour, R.S. Flowers, W. Osborne, J.O. Reagan,D. Theno, V. Cook, A. Mcnamara. y B. Rose 2002. Incidence of *Escherichia coli* O157:H7 in frozen beef patties produced over an 8-hour shift. Journal of Food Protection. 65(9):1363-1370.

Pearce, M.C., D. Fenlon, J.C. Low, A.W. Smith, H.I. Knight, J. Evans, G. Fostes, B.A. Synge y G.J. Gunn. 2004. Distribution of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine fecal pats and its impact on estimates of the prevalence of fecal shedding. Journal of Applied and Environmental Microbiology. 70(10): 5737-5743

Ratnam S., S. March, R. Ahmed, G.S. Bezanson, y S. Kasatiya.1988. Characterization of *Escherichia coli* serotype O157:H7. Journal of clinical microbiology 26(10):2006-2011.

Rice, W.E. y H. Jonson.2000. Short communication: survival of *Escherichia coli* O157:H7in dairy cattle drinking water. Journal of Dairy Science 83(9): 2021-2023

Rosner B. Fundamentals of biostatics. 1995.Fourth Edition.

Shere J.A., K.J. Bartlett y C.W. Kaspar.1998. Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7dissemination on four dairy farms in Wisconsin. Journal of Applied and Environmental Microbiology. 64(4): 1390-1399.

Sinave, P.C. 2003. Enterobacter Infections. EMedicine

Usera M. *Escherichia coli* O157:H7 productor de verotoxina : Un resumen practico Sección de Enterobacterias. Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid
Visitada en Mayo 2005 http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/o157.htm

Vasquez J. y A. Cabral.2001. La inocuidad alimentaria, realidad y reto mundial. Publicación de la dirección de alimentación y nutrición de la FAO.28:1014

Wang G., T. Zhao y M. Doyle.1996. Fate of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Applied and Environmental Microbiology. 62(7): 2567-2570.

Visitada en Febrero 2005

<http://www.etsia.upm.es/fedna/analisis/ana22x.htm>

8. Apéndice

Análisis estadístico con la prueba de Wilcoxon utilizando programa Infostat.

Tabla 11. Comparación de promedios de log UFC/cm² en variable edad

Prueba de Wilcoxon (muestras apareadas)

Obs (1)	Obs (2)	N	Suma (R+)	E (R+)	Var (R+)	Bt p(2 colas)
5 o mas	4 o menos	30	217.00	232.50	2362.75	>0.9999

Tabla 12 Comparación de promedios de log UFC/cm² en variable variable tipo de animal

Prueba de Wilcoxon (muestras apareadas)

Obs (1)	Obs (2)	N	Suma (R+)	E (R+)	Var (R+)	Bt p(2 colas)
carne	leche	31	309.50	248.00	2603.63	>0.9999

Tabla 13. Comparación de promedios de UFC/cm² en variable lugar de muestreo en la canal

Prueba de Wilcoxon (muestras apareadas)

Obs (1)	Obs (2)	N	Suma (R+)	E (R+)	Var (R+)	Bt p(2 colas)
Arriba	Abajo	28	136.00	203.00	1927.88	<0.0001

Tabla 14. Comparación de tratamiento antes y después del tratamiento de los tres mataderos en conjunto

Prueba de Wilcoxon (muestras apareadas)

Obs (1)	Obs (2)	N	Suma (R+)	E (R+)	Var (R+)	Bt p(2 colas)
Antes	Después	31	298.50	248.00	2603.25	0.0020

Tabla 15. Comparación de promedios de UFC/cm² entre mataderos

Prueba de Wilcoxon (muestras apareadas)

Obs(1)	Obs(2)	N	Suma(R+)	E(R+)	Var(R+)	media(dif)	DE(dif)	Z	p(2 colas)
Mayaguez	Arecibo	54	486.00	742.50	13403.50	-0.52	1.64	-2.22	0.0267
Mayaguez	Yauco	54	272.50	742.50	13487.50	-1.36	1.92	-4.05	0.0001
Arecibo	Yauco	54	422.00	742.50	13487.63	-0.85	1.80	-2.76	0.0058

Tabla 16. Promedio de log UFC antes y después de lavado de la canal en muestras recolectadas en el matadero de Mayagüez

Prueba de Wilcoxon (muestras apareadas)

Obs (1)	Obs (2)	N	Suma (R+)	E (R+)	Var (R+)	Bt p(2 colas)
A	C	12	12.00	39.00	135.00	>0.9999
A	B	12	11.00	39.00	147.50	<0.0001
A	D	12	9.00	39.00	158.13	<0.0001
C	B	12	0.00	39.00	141.88	<0.0001
C	D	12	0.00	39.00	158.00	<0.0001
B	D	12	12.00	39.00	158.13	>0.9999

Tabla 17. Promedio de log UFC antes y después de lavado de la canal en muestras recolectadas en el matadero de Arecibo

Prueba de Wilcoxon (muestras apareadas)						
Obs (1)	Obs (2)	N	Suma (R+)	E (R+)	Var (R+)	Bt p(2 colas)
A	B	12	44.00	39.00	162.00	>0.9999
A	C	12	42.00	39.00	162.25	>0.9999
A	D	12	39.00	39.00	162.25	0.3440
B	C	12	32.00	39.00	155.50	>0.9999
B	D	12	30.00	39.00	160.00	>0.9999
C	D	12	34.00	39.00	162.00	>0.9999

Tabla 18. Promedio de log UFC antes y después de lavado de la canal en muestras recolectadas en el matadero de Yauco

Prueba de Wilcoxon (muestras apareadas)						
Obs (1)	Obs (2)	N	Suma (R+)	E (R+)	Var (R+)	Bt p(2 colas)
A	B	12	39.50	39.00	161.88	0.2260
A	C	12	63.50	39.00	161.38	0.0020
A	D	12	31.00	39.00	162.38	0.3940
B	C	12	51.00	39.00	162.13	0.0440
B	D	12	27.00	39.00	162.13	0.1120
C	D	12	18.00	39.00	162.38	<0.0001