



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR PARA LA DETERMINACIÓN DE *Listeria monocytogenes* EN CARNE DE POLLO, RES Y CERDO

ASael EDEM DE LA ROSA ZARIÑANA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2017

La presente tesis titulada: **“Estandarización y validación de la técnica de PCR para la determinación de *Listeria monocytogenes* en carne de pollo, res y cerdo”** realizada por el alumno **Asael Edem de la Rosa Zariñana**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA


DRA. MARÍA MAGDALENA CROSBY GALVÁN

ASESOR


DR. DAVID HERNÁNDEZ SÁNCHEZ

ASESOR


DR. MIGUEL ÁNGEL MATA ESPINOSA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, febrero de 2017.

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR PARA LA DETERMINACIÓN DE *Listeria monocytogenes* EN CARNE DE POLLO, RES Y CERDO

Asael Edem de la Rosa Zariñana, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

Este trabajo de investigación tuvo como objetivo estandarizar y validar la técnica de PCR para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne de pollo, res y cerdo, y evaluar la calidad microbiológica de la carne distribuida en puntos de venta de la ciudad de Texcoco de Mora, Estado de México. Se recolectaron 60 muestras de 250 g de carne de pollo (20), res (20) y cerdo (20), provenientes de establecimientos comerciales (tianguis, carnicerías y supermercados), realizando los muestreos en tres periodos a intervalos de 15 días (del 15 de octubre al 16 de noviembre), haciendo un total de 177 muestras de carne analizadas. Se evaluó la especificidad y la sensibilidad de los iniciadores MAR1-MAR2 y PRSF-PRSR para amplificar los genes *iap* y *prs*, respectivamente, mediante PCR para la detección de *Listeria monocytogenes* (*Lm*), bajo los resultados que arrojaron en el índice de McNemar y Kappa. Asimismo, se validó la PCR para la detección de *Lm* con relación al método microbiológico establecido en la NOM-143-SSA1-1995, basándose en el nivel de concordancia de ambas metodologías y el Teorema de Bayes. Por otro lado, se calculó la incidencia de *Listeria monocytogenes* en relación al tipo de carne y establecimientos. La concentración mínima de ADN detectable fue de 3 ng μL^{-1} . La especificidad y sensibilidad de los iniciadores MAR1-MAR2 y PRSF-PRSR fue del 100%. El grado de acuerdo entre la PCR y el método microbiológico fue de 89, 92 y 90% para la carne de pollo, res y cerdo, respectivamente. La incidencia de *Listeria monocytogenes* fue de 68, 69 y 55% en carne de pollo, res y cerdo, de las cuales 84% de estas incidencias fueron en los tianguis y carnicerías y el 15.3% en supermercados. La técnica de PCR desarrollada resultó más sensible, específica y rápida para la detección de *Listeria monocytogenes* que el método microbiológico de la NOM-143-SSA1-1995.

Palabras clave: PCR, *Listeria monocytogenes*, NOM-143-SSA1-1995, carne, sensibilidad.

**PCR ESTANDARIZATION AND VALIDATION FOR *Listeria monocytogenes*
DETRMINATION ON CHICKEN, BEEF AND PORK MEAT**

Asael Edem de la Rosa Zariñana, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

In order to standardize and validate the PCR technique for the *Listeria monocytogenes* detection on chicken, beef and pork meat, and evaluate the microbiological quality of meat distributed at sale points in Texcoco city this research was carried out. Sixty samples of chicken (20), beef (20) and pork (20) meat of 250 g each, were collected from commercial establishments (“tianguis”, butchers and supermarkets), sampling in three periods with 15 day of intervals (october 15th to november 16), add up to a total of 177 samples of meat analyzed. The Specificity and Sensitivity of primers MAR1-MAR2 and PRSF-PRSR were evaluated to amplify the *iap* and *prs* genes, respectively, by PCR for *Listeria monocytogenes* (Lm) detection and data were analyzed by the McNemar and Kappa index. PCR was also validated for the detection of Lm in relation to the microbiological method established in the NOM-143-SSA1-1995, according to the level of agreement of both methodologies and the Bayes Theorem. On the other hand, of *Listeria monocytogenes* incidence was calculated in relation to the meat type and establishments. The minimum detectable DNA concentration was 3 ng μL^{-1} . The specificity and sensitivity of the primers MAR1-MAR2 and PRSF-PRSR was 100%. The degree of agreement between PCR and the microbiological method was 89, 92 and 90% for chicken, beef and pork meat, respectively. The incidence of *Listeria monocytogenes* was 68, 69 and 55% in chicken, beef and pork meat; 84% of these incidences were in tianguis and butchers and 15.3% in supermarkets. The PCR technique developed was more sensitive, specific and rapid for the detection of *Listeria monocytogenes* than the microbiological method of the NOM-143-SSA1-1995.

Key words: PCR, *Listeria monocytogenes*, NOM-143-SSA1-1995, meat, sensitivity.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico durante mis estudios de posgrado.

Al Colegio de Postgraduados por brindarme la oportunidad de ingresar y culminar mis estudios de posgrado.

Al Posgrado en Ganadería por darme la oportunidad de estudiar y culminar la formación académica que en sus gloriosas aulas me ofreció.

A la **Dra. María Magdalena Crosby Galván** por haber dirigido este trabajo de investigación, agradezco de antemano y con todo el corazón su sinceridad y apoyo incondicional en toda mi estancia. Es usted, una persona maravillosa.

Al **Dr. David Hernández Sánchez** por su sincera amistad, arduo apoyo absoluto y consejos en el transcurso de este trabajo y en toda la carrera.

Al **Dr. Miguel Ángel Mata Espinosa** por sus aportaciones, opiniones y revisión del trabajo.

A la **Dra. Martha Elva Ramírez Guzmán** por el apoyo incondicional y por haberle dedicado el tiempo necesario para el análisis de los datos del trabajo.

A la **Ing. Margarita Crosby Galván** por el tiempo dedicado a este trabajo de investigación, sus aportaciones y opiniones fueron muy importantes para el desarrollo y termino.

A todos los profesores del Posgrado en Ganadería por ser guía en mi formación académica y social.

DEDICATORIA

A ti Diosito por prestarme la vida y darme una familia que amar.

A mi amada Mónica, a ti mi amor por el apoyo, consejos, sacrificios y sobre todo por los momentos que has pasado a mí lado desde el día que nos conocimos y ese deseo de verte cada día, hoy se ha convertido en mi todo. Eres la luz de mí camino y la razón de mí existir.

A mis tres pequeñas hijas Atziri, Sofía y Mónica ustedes son mi vida desde el primer momento que supe que vendrían al mundo se convirtieron en mi más preciado tesoro, son mis ganas de vivir y mi más hermoso sueño. Ustedes han enseñado el significado de la vida, su ternura, sus abrazos, sus besos, su cariño me han mostrado que tan valiosa es la vida. Nunca les fallaré, estaré siempre a su lado hermosas.

Con infinito amor y cariño a mis padres: Asael de la Rosa Galindo y Ma. Cecilia Zariñana Solórzano, por darme vida y una hermosa familia. Ustedes son mi inspiración, gracias por sus consejos, felicitaciones y correcciones, ya que sin ello no hubiera culminado mis estudios. Siempre han estado a mí lado en los malos y buenos momentos, y espero nunca fallarles. En verdad los amo papitos.

A mis hermanas Aurora, Alina, por su amor y compañía en toda mi vida, gracias por confiar ciegamente en mí. Sin ustedes no sería nada. Las amo.

A la familia Zaragoza Ortega por darme la oportunidad de ser parte de ustedes, les doy las gracias por todo el apoyo que me han brindado. Los quiero como a mis padres y mis hermanos.

A toda mi familia, por apoyarme en cualquier aspecto de mi vida, sé que sin su apoyo no hubiera culminado esta parte importante de mi vida.

A mis amigos y compañeros de vida, sé que donde quiera que estén siempre seguirán apoyándome.

Con todo mi amor y cariño:

Asael Edem

CONTENIDO

| | |
|--|----|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA | 3 |
| 2.1. Producción mundial y nacional de carne..... | 3 |
| 2.2. Tipos de mercado nacional..... | 6 |
| 2.3. Consumo nacional de carne y mercadeo..... | 7 |
| 2.4. Déficit nacional de carne e importación de productos cárnicos..... | 10 |
| 2.5. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs)..... | 11 |
| 2.6. Principales microorganismos causantes de las ETAs..... | 15 |
| 2.7. <i>Listeria monocytogenes</i> y listeriosis..... | 17 |
| 2.8. Factores que predisponen la presencia de bacterias en la carne..... | 20 |
| 2.9. Métodos de diagnóstico de <i>Listeria spp.</i> | 25 |
| III. OBJETIVOS | 31 |
| 3.1. Objetivo General..... | 31 |
| 3.2. Objetivo Específico..... | 31 |
| IV. HIPÓTESIS | 31 |
| V. MATERIALES Y MÉTODOS | 32 |
| 5.1. Localización..... | 32 |
| 5.2. Muestreo..... | 32 |
| 5.3. Cepas control..... | 33 |
| 5.4. Inoculación de muestras de carne..... | 34 |
| 5.5. Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> por la norma NOM-143-SSA1-1995..... | 34 |
| 5.6. Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> por medio de PCR..... | 35 |
| 5.7. Extracción de ADN de las muestras de carne..... | 35 |
| 5.8. Control positivo y negativo..... | 36 |
| 5.9. Iniciadores para la identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Listeria sp.</i> | 36 |
| 5.10. Condiciones de la técnica de PRC..... | 37 |
| 5.10.1. Amplificación del gen <i>iap</i> | 37 |
| 5.10.2. Amplificación del gen <i>prs</i> | 37 |
| 5.11. Electroforesis..... | 37 |
| 5.12. Variables evaluadas..... | 38 |
| 5.12.1. Especificidad y sensibilidad relativa..... | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 5.12.2. Índice de McNemar..... | 38 |
| 5.12.3. Índice de acuerdo (Kappa)..... | 39 |
| 5.12.4. Teorema de Bayes o redes Bayesianas | 40 |
| 5.12.5. Incidencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en carne (pollo, res y cerdo) y tipo de establecimiento (tianguis, carnicerías y supermercados) | 41 |
| VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 42 |
| 6.1. Validación de la técnica de PCR..... | 42 |
| 6.1.1. Concentración mínima de ADN..... | 42 |
| 6.1.2. Especificidad y sensibilidad relativa de los iniciadores Mar 1-Mar 2 y PRS F-PRS R en la técnica de PCR | 44 |
| 6.1.3. Comparación de la metodología convencional de la NOM-143-SSA1-1995 y la técnica de PCR para la identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> en carne de pollo, res y cerdo..... | 46 |
| 6.2. Incidencia de <i>Listeria monocytogenes</i> | 49 |
| 6.2.1. Incidencia de <i>Listeria monocytogenes</i> por periodo y tipo de carne..... | 51 |
| 6.2.2. Incidencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en carne de pollo, res y cerdo por tipo de establecimiento (tianguis, carnicerías y supermercados) | 55 |
| VII. CONCLUSIONES..... | 60 |
| VIII. LITERATURA CITADA | 61 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Principales Estados productores de carne de pollo, res y cerdo..... | 5 |
| Cuadro 2. Número de centros de sacrificios en México, capacidad instalada y capacidad utilizada..... | 7 |
| Cuadro 3. Producción de carne de res y consumo doméstico nacional..... | 8 |
| Cuadro 4. Producción de carne de porcino y consumo doméstico nacional..... | 9 |
| Cuadro 5. Producción de carne de pollo y consumo doméstico nacional..... | 9 |
| Cuadro 6. Tipos de peligros contenidos en los alimentos..... | 13 |
| Cuadro 7. Principales microorganismos causantes de ETAs..... | 16 |
| Cuadro 8. Características de <i>Listeria spp</i> | 19 |
| Cuadro 9. Fuentes potenciales de contaminación de <i>L. monocytogenes</i> | 21 |
| Cuadro 10. Iniciadores para la amplificación de genes en la determinación de <i>Listeria spp</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> | 36 |
| Cuadro 11. Cálculo de la especificidad (E) y sensibilidad (S) relativa..... | 38 |
| Cuadro 12. Tabla para el cálculo del índice McNemar..... | 39 |
| Cuadro 13. Escala de interpretación del índice Kappa..... | 40 |
| Cuadro 14. Concentración de ADN extraído y UFC mL ⁻¹ de <i>Listeria monocytogenes</i> | 43 |
| Cuadro 15. Análisis de la sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR para la detección de <i>Listeria monocytogenes</i> | 44 |
| Cuadro 16. Índice de Kappa y Teorema de Bayes obtenidos al comparar el método microbiológico con la técnica de PCR para la detección de <i>Listeria monocytogenes</i> en carne de pollo, res y cerdo..... | 46 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Producción mundial de carne | 3 |
| Figura 2. Producción nacional de carne. | 4 |
| Figura 3. Estados productores de carne en México..... | 5 |
| Figura 4. Diagrama de flujo para el sacrificio de ganado bovino. | 24 |
| Figura 5. Diagrama de flujo de una línea de sacrificio de porcinos..... | 24 |
| Figura 6. Diagrama de flujo para el sacrificio de aves..... | 25 |
| Figura 7. Resumen general de la NOM-143-SSA1-1995..... | 27 |
| Figura 8. Resumen general de la NOM-210-SSA1-2014..... | 27 |
| Figura 9. Detección mínima de ADN por PCR para los genes <i>iap</i> (<i>Listeria monocytogenes</i>) y <i>prs</i> (<i>Listeria spp</i>) por electroforesis en gel de agarosa al 2%..... | 42 |
| Figura 10-a. Amplificación de los genes <i>iap</i> (453 pb) y <i>prs</i> (370 pb) para muestras positivas a <i>Listeria monocytogenes</i> | 45 |
| Figura 10-b. Amplificación de los genes <i>iap</i> (453 pb) y <i>prs</i> (370 pb) para muestras negativas a <i>Listeria monocytogenes</i> | 45 |
| Figura 11. Incidencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en carne de pollo, res y cerdo en puntos de venta de la Ciudad de Texcoco, durante tres periodos de muestreo. | 50 |
| Figura 12. Incidencia de <i>Listeria monocytogenes</i> por periodo de muestreo y tipo de carne distribuidas en puntos de venta de la Ciudad de Texcoco..... | 52 |
| Figura 13. Presencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en carne de pollo, res y cerdo por tipo de establecimiento distribuidas en la Ciudad de Texcoco..... | 56 |
| Figura 14. Proceso y técnicas para el procesamiento de productos cárnicos empleados en carnicerías y tianguis de la Ciudad de Texcoco. | 57 |

I. INTRODUCCIÓN

Derivado de la creciente demanda en la producción, comercialización y consumo de alimentos, los gobiernos exigen cada día un control más eficiente y estricto de su calidad higiénica y sanitaria, con el fin de prevenir las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs; Martino *et al.*, 2010). En este sentido, la calidad nutricional y la inocuidad de los alimentos son factores importantes que repercuten directamente en la salud y la calidad de vida de las personas. Es por ello, que para cuidar la inocuidad de los alimentos en los países desarrollados o en desarrollo, es necesaria la aplicación de ciertas técnicas y normas a fin de prevenir la transmisión de enfermedades de origen alimentario (Kopper *et al.*, 2009). Las ETAs se producen por la ingestión de alimentos y bebidas contaminados con microorganismos patógenos, toxinas, venenos, etc., que afectan la salud del consumidor en forma individual o colectiva. Sus síntomas más comunes son diarreas y vómitos, pero también se puede presentar choque séptico, hepatitis, cefaleas, fiebre, visión doble, entre otros síntomas (Rosas y Acosta, 2001; FAO, 2009; OMS, 2016).

Por otro lado, las ETAs constituyen un importante problema de salud pública nacional y mundial debido al incremento en su ocurrencia, el surgimiento de nuevas formas de transmisión, la aparición de grupos poblacionales vulnerables, el aumento de la resistencia de los patógenos a los compuestos antimicrobianos y el impacto socioeconómico que ocasionan. La incidencia de estas enfermedades es un indicador directo de la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos, y se ha demostrado que la contaminación de éstos puede ocurrir durante su procesamiento (Autio *et al.*, 1999; Millemann *et al.*, 2000) o por el empleo de materia prima contaminada, pues algunas bacterias patógenas para el hombre forman parte de la flora normal de aves, cerdos y ganado (Hielm *et al.*, 1998; Fach *et al.*, 2002).

Unas de las principales fuentes de contagio con microorganismo patógenos o intoxicaciones es el consumo de alimentos contaminados, entre los que se pueden mencionar pescados y mariscos, productos cárnicos y avícolas, productos lácteos, vegetales, huevos frescos e incluso la miel de abeja (Rojas y González, 2006; FAO, 2009).

La frecuencia con la que la carne es una fuente de microorganismos patógenos depende del grado de contaminación en la granja, en el sacrificio y en las operaciones posteriores, así como de la intensidad de la de la multiplicación, si se produce, en almacenamiento. Tal como

lo menciona la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2016) “de la granja al tenedor”, es decir, las prácticas de higiene deben adoptarse desde el origen del producto (granjas), procesamiento, puntos de venta y en la preparación de los alimentos. Los microorganismos y toxinas presentes en la carne que provocan alteraciones en la salud de los consumidores, pueden tener su origen en una infección primaria (animales vivos) o secundaria (por contaminación) (López y Casp, 2004; OMS, 2016).

Según Orihuel *et al.* (2011), la importancia de los alimentos como vía primaria de transmisión de listeriosis (causada por *Listeria monocytogenes*) a las personas, se reconoció hasta la década de 1980, a raíz de varios brotes importantes de listeriosis en Norteamérica y Europa. Una característica importante de esta enfermedad transmitida por alimentos es que el patógeno puede multiplicarse a temperaturas de refrigeración, hasta alcanzar cifras significativas. A pesar de que son muchos y diversos los alimentos que pueden contaminarse con *L. monocytogenes*, los brotes y los casos esporádicos de listeriosis están predominantemente asociados a alimentos listos para el consumo, una categoría extensa de productos que incluye la leche y los productos lácteos, productos cárnicos principalmente.

Desde hace algunas décadas, tradicionalmente las infecciones se diagnostican mediante el cultivo de muestras de alimentos que se suponen contaminados y la identificación de las bacterias que crecen en los medios de cultivo, con base en criterios morfológicos y fisiológicos que quizá dependan de factores ambientales o genéticos (Scheu *et al.*, 2009), con el inconveniente de que la obtención de resultados puede tomar ocho días o algunas semanas dependiendo el tipo de patógeno a identificar.

Por lo anterior, la industria alimentaria debe de reforzar las técnicas que permiten el análisis de los productos cárnicos y procesados, las cuales se basan en Normas Oficiales o en metodologías aprobadas; sin embargo, la mayoría de estos métodos no permiten la toma de decisiones rápidas causando incrementos en el costo de producción y pérdidas económicas considerables de productos perecederos y en los casos más graves, puede ocasionar la muerte de los consumidores. Es por ello que se realizó este estudio en la validación y estandarización de la técnica de PCR para detección de *Listeria monocytogenes* en carne de pollo, res y cerdo debido a que es una técnica rápida y sensible que permite detectar patógenos en alimentos crudos o procesados (Rojas y González, 2006).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Producción mundial y nacional de carne

La FAO (2015) pronosticó incremento en la producción mundial de carne de 3.47 millones de ton que, en el año 2014, 318.8 millones de ton en total para el año 2015; 68.3, 112.1, 118.8 y 14 millones de ton de carne de res, pollo, cerdo y ovinos, respectivamente.

Algunos países como Alemania, Francia y España, Estados Unidos, la Federación de Rusia, China y Brasil aportan la mayor cantidad en la producción global de carne. Esta tendencia se mantendrá hasta el año 2023, en el cual la producción de carnes aumentará hasta un 19% (57.7 millones de ton) comparado con el periodo de producción de 2011 a 2013, de dicho incremento el 78% (45.1 millones de ton) corresponde a los países en desarrollo como los antes mencionados (FAO, 2015; ODCE-FAO, 2014). Es importante señalar que de este incremento para el año 2023, 28.3 millones serán de carne aviar, 16.7 millones a carne porcina, 9 millones a carne bovina, y 3.8 millones a carne ovina. Lo que significa que la carne de ave se consumirá en mayor proporción al final de esta década y no la carne de cerdo, como se ha venido consumiendo a lo largo de este periodo.

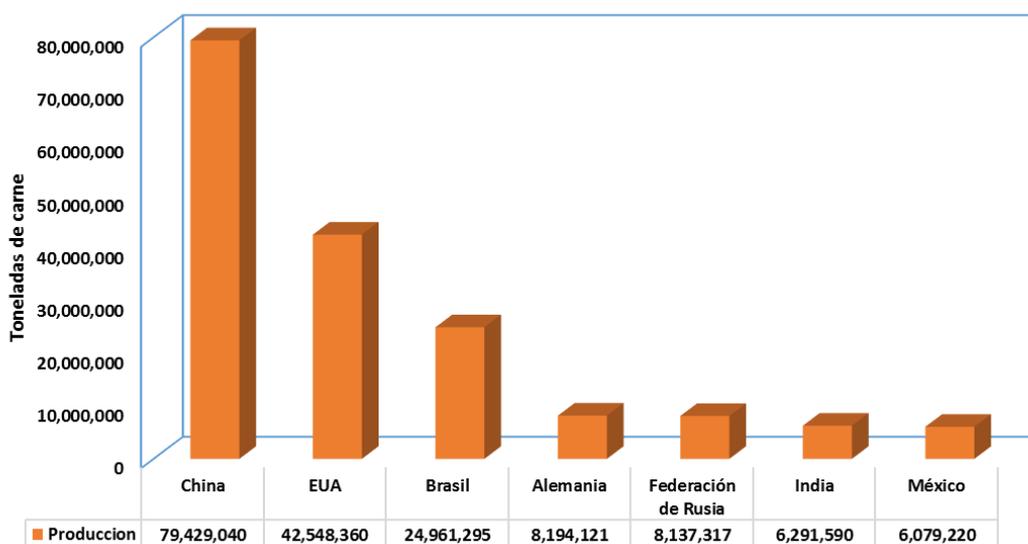


Figura 11. Producción mundial de carne (FAO-STAT, 2012).

Como se aprecia en la Figura 1, México pertenece a los diez principales productores de carne a nivel mundial, ocupando el séptimo lugar en la producción de este producto, después de la India y la Federación de Rusia, con una producción de 6,079,220 de ton de carne para el año 2012 (FAO-STAT, 2012). La carne que más se produce a nivel nacional (Figura 2) es la de ave, con un aporte de 2,791,639 ton, seguida de la carne de res (1,820,547 ton) y la carne de cerdo (1,238,625 ton). Dentro del volumen restante para completar el total de la producción nacional para este año, se encuentra la carne de caballo, ovino, caprino, pato, pavo y conejo. Por otro lado, el SIAP-SAGARPA (2014) reportan una producción de 6,114,713 ton, aproximadamente 0.583% más que el año 2012, en donde la carne de ave se sigue produciendo a mayor escala (Figura 2).

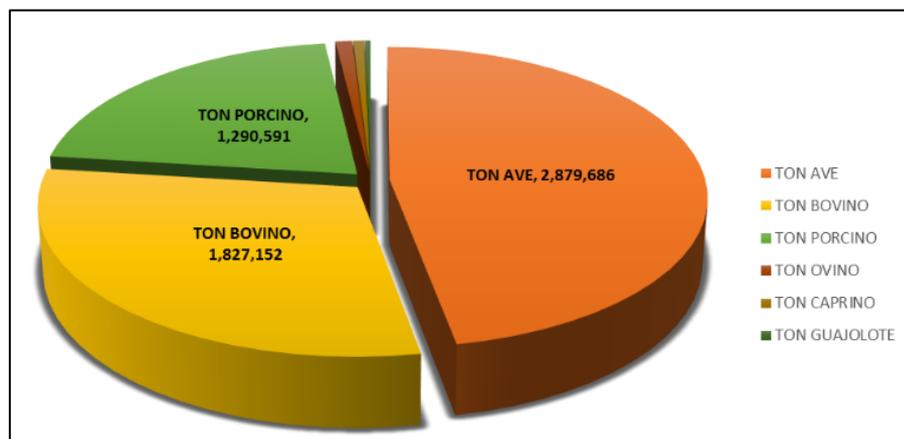


Figura 12. Producción nacional de carne (SIAP-SAGARPA, 2014).

La importancia de los datos citados radica en la premisa que la actividad ganadera, en conjunto con la agricultura, el aprovechamiento forestal, la pesca y la caza, forman parte del Producto Interno Bruto (PIB) agropecuario, que en total aportaron 3.7% al PIB nacional para el año 2014 (Gaucin *et al.*, 2014; INEGI, 2014). Tan sólo la producción de carne genera alrededor de \$235,515,551 millones de pesos en el mismo año y en conjunto, toda la actividad primaria general alrededor de 6, 862, 835 de empleos directos e indirectos.

Por otro lado, la producción de carne en el país se concentra en los Estados de Jalisco, Veracruz y Puebla, principalmente, como se aprecia en la Figura 3. Sin embargo, las entidades federativas que proporcionan los diferentes tipos de carne, por especie animal, no son los mismos que aportan a la producción nacional, en el caso de la producción de pollo y

cerdo, el Estado de Jalisco es el principal productor a nivel nacional, aportando 411,455 y 313,347 ton, respectivamente, para el caso de la carne de res el principal aporte lo tiene el Estado de Veracruz, produciendo 457,181 ton al año (Cuadro 1).

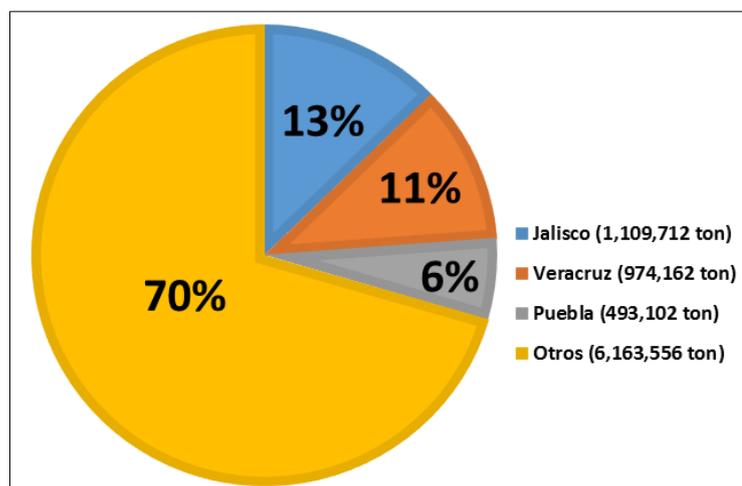


Figura 13. Estados productores de carne en México (SIAP-SAGARPA, 2014).

Cuadro 1. Principales estados productores de carne de pollo, res y cerdo.

| Estado | Carne de pollo (ton) | Estado | Carne de res (ton) | Estado | Carne de cerdo (ton) |
|----------------|----------------------|---------------|--------------------|------------|----------------------|
| Jalisco | 411,455 | Veracruz | 457,181 | Jalisco | 313,347 |
| Aguascalientes | 373,466 | Jalisco | 378,569 | Sonora | 279,505 |
| Durango | 369,364 | Chiapas | 213,276 | Puebla | 204,393 |
| Veracruz | 355,050 | Sinaloa | 163,676 | Veracruz | 152,509 |
| Querétaro | 319,118 | B. California | 146,480 | Yucatán | 142,250 |
| Puebla | 203,677 | S. L. Potosí | 141,168 | Guanajuato | 137,280 |

SIAP-SAGARPA (2014).

Con respecto al Estado de México, el SIAP-SAGARPA (2014) establece que es el principal productor de carne de ovino (16, 909 ton), a su vez en la producción de carne de pollo, res y cerdo ocupa el 11°, 19° y 12° lugar a nivel nacional, con una producción de 126, 547; 85, 865 y 28, 282 ton, respectivamente (SIAP-SAGARPA, 2014).

El INEGI (2014) a través del SIAP reporta ocho regiones de importancia en la producción de carne en general dentro del Estado de México, las cuales corresponden a Zumpango,

Jilotepec, Tejupilco, Atlacomulco, Toluca, Coatepec Harinas, Valle de Bravo y Texcoco. Esta última produce aproximadamente 38,005 ton de carne, de las cuales 22, 551; 9,726, y 5,728 ton de pollo, res y cerdo, respectivamente, ubicándose como la segunda región productora de carne de cerdo, tercer y cuarto lugar en la producción de carne de pollo y res.

En particular el municipio de Texcoco produce 8,341.473 ton de carne de pollo, 1,995.588 ton de carne de cerdo y 1,880.230 ton de carne de res. Es el principal productor de carne de la región, cuya producción asciende a los 291,007,028 de pesos al año (SIAP-SAGARPA, 2014).

2.2. Tipos de mercado nacional

El SIAP-SAGARPA para el año 2015 tuvo registrados tres tipos de instalaciones de sacrificio para animales de consumo humano, los cuales son establecimientos que cuentan con autorización federal (TIF), estatal o municipal y que cuya infraestructura, administración, sistema de sacrificio y manejo higiénico-sanitario de la carne varía. Sin embargo, existe un gran número de rastros clandestinos que colocan sus productos en el mercado y cuyas deficiencias en el proceso de sacrificio, faenado y manejo de la carne desencadenan riesgos de contraer enfermedades de transmisión por alimentos.

Lo anterior no implica que solamente los rastros clandestinos tienen estos riesgos, también los hay en los rastros TIF, estatales y municipales con mucha frecuencia, es por ello que el gobierno a través del SENASICA, inspecciona las actividades de dichos establecimientos y acredita con la certificación TIF, cuando se cumple con las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), Procesos Operacionales Estandarizados de Sanitización (POES) y algunas Normas Oficiales Mexicanas específicas para el caso.

Como podemos apreciar en el Cuadro 2, el número de rastros TIF es menor en comparación con los establecimientos municipales y privados; sin embargo, son los que sacrifican mayor número de animales, implicando que se tiene mayor acceso a carne de calidad e inocuidad, pero como mencionan Maldonado *et al.* (2005), este tipo de establecimientos cubre parte de la oferta de los productos pecuarios al mercado internacional y a nichos del mercado nacional de alto poder adquisitivo, quedando una buena parte de la demanda nacional a manos de los

centros de sacrificios municipales, privados o clandestinos cuyos recursos son limitados para ofrecer productos inocuos y de calidad.

Cuadro 2. Número de centros de sacrificios, capacidad instalada y capacidad utilizada.

| Tipo de rastro | No. de Centros | Capacidad instalada mensual (cabezas) | | |
|---------------------------------|----------------|---------------------------------------|---------|-----------|
| | | Aves | Bovino | Porcino |
| TIF | 108 | 66,019,347 | 413,899 | 688,558 |
| Privado | 139 | 12,393,132 | 72,832 | 215,616 |
| Municipal | 886 | 428,702 | 432,111 | 660,930 |
| Total | 1,133 | 78,841,181 | 918,842 | 1,565,104 |
| Capacidad utilizada mensual (%) | | 85 | 56 | 68 |

SIAP-SAGARPA (2015).

Los mismos autores realizaron un estudio para determinar la relación costo-beneficio de la implementación de dos tipos de controles de inocuidad y calidad alimentaria (HACCP e ISO 9000), en el cual el objetivo fue determinar el grado de adopción de los controles antes mencionados en rastros TIF. Ellos encontraron que de los 39 mataderos analizados, el 18% tenían el sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP, por su siglas en inglés), 57% estaban por implementarlo o tenían planes de hacerlo, mientras que el 25% restante manifestaron nulo interés en adoptarlo, concluyendo que los mataderos que exportan, también proveen a nichos del mercado nacional con mayor demanda en calidad, y fueron los primeros en adoptar la metodología HACCP.

2.3. Consumo nacional de carne y mercadeo

En 2011 el consumo nacional de carne de res fue de aproximadamente 1,900,000 de toneladas métricas y en 2020 se estima que éste alcance las 2,212,000, es decir, 16.4% más. La diferencia entre la producción de carne doméstica y el consumo interno está constituida por las importaciones. En los próximos años se prevé que el nivel de importaciones disminuya; sin embargo, para este periodo de estudio se estimó que el consumo *per cápita* de esta carne fuera de 17.1 kg¹, valor que se mantendrá constante (SFA-SAGARPA, 2011).

Cuadro 3. Producción de carne de res y consumo doméstico nacional

| Carne de bovino | 2016 | 2017 | 2018 | 2019 | 2020 |
|-----------------------------------|-------|---------|---------|---------|---------|
| Miles de toneladas métricas (mtm) | | | | | |
| Producción | 2,015 | 2,043.5 | 2,069.1 | 2,091 | 2,107.9 |
| Importaciones | 143.4 | 160.1 | 176.5 | 190.1 | 192.2 |
| Consumo doméstico | 2,070 | 2,115.2 | 2,157.4 | 2,193.1 | 2,212.1 |
| Exportaciones | 88.6 | 88.4 | 88.2 | 88 | 88 |

Adaptado de SFA-SAGARPA (2011).

A pesar de la tendencia de la producción a lo largo del periodo señalado, la AMEG (2015) en su boletín 2015, menciona que las exportaciones en el periodo de los años 2014 y 2015 aumentaron de 106,844 a 129,938 ton (21.6%) con un valor aproximado de 200.5 millones de dólares.

PORCIMEX (2016) señala que para los años 2014 y 2015 las importaciones de carne de cerdo aumentaron de 600 a 723 mil toneladas, respectivamente, mientras que las exportaciones para los mismos años aumentaron de 89 a 97 mil toneladas, este incremento en las importaciones puede ser consecuencia del incremento del consumo *per cápita* de la carne de porcino en casi 600 g en el último año, al pasar de 16 a 16.6 kg (SAGARPA, 2016).

De acuerdo con datos de la SFA-SAGARPA (2011), considerando el peso promedio nacional de sacrificio, la producción nacional de carne porcina se incrementaría de 1.17 millones de ton en 2011 a 1.42 millones de ton en 2020. Con respecto al consumo, se estima que éste aumentará de 1.9 millones de toneladas en 2011 a 2.1 millones en 2020 (Cuadro 4). En este sentido, se prevé que las importaciones mantengan un rango entre 759 y 816 mil ton anuales durante el periodo de estudio.

Cuadro 4. Producción de carne de porcino y consumo doméstico nacional.

| Carne de porcino | 2016 | 2017 | 2018 | 2019 | 2020 |
|-----------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Miles de toneladas métricas (mtm) | | | | | |
| Producción | 1,367.5 | 1381.3 | 1,392.6 | 1,404.3 | 1,416.2 |
| Importaciones | 780.2 | 788 | 794.8 | 797.5 | 810.2 |
| Oferta | 2,147.7 | 2,169.3 | 2,187.4 | 2,201.8 | 2,226.4 |
| Consumo doméstico | 2,093.1 | 2115.5 | 2,134.3 | 2,148.9 | 2,174.8 |
| Exportaciones | 55 | 54 | 53 | 53 | 52 |

Adaptado de SFA-SAGARPA (2011)

La Unión Nacional de Avicultores (UNA) señala que para el año 2015 la avicultura registró un crecimiento de 2.5%, y en lo que respecta a la producción de carne de pollo también creció en el mismo valor. El consumo *per cápita* de carne de pollo aumentó de 25.6 a 33.3 kg para 2015. Por otro lado, para los años 2014 y 2015 las exportaciones de carne de pollo se redujeron en 44.5% al pasar de 2,280 a 1,265 ton, por el contrario las importaciones se incrementaron en 4.9% al pasar de 181,564 a 190,409 ton para los años respectivos.

En el Cuadro 5 se puede observar en resumen la perspectiva para la producción de carne de pollo que hace la SFA-SAGARPA (2011), para este año son sacrificados alrededor de 1.65 millones de aves y se proyecta que en 2020 sean 1.8 millones. Derivado de los cambios en la dieta de los consumidores y de los precios relativos del pollo, en comparación con los de la carne de cerdo y la de bovino, se espera que el consumo *per cápita* de pollo se incremente de 30 a 32 kg de 2011 a 2020.

Cuadro 5. Producción de carne de pollo y consumo doméstico nacional.

| Carne de pollo | 2016 | 2017 | 2018 | 2019 | 2020 |
|-----------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Miles de toneladas métricas (mtm) | | | | | |
| Producción | 3,237.1 | 3,300.4 | 3,325 | 3401.6 | 3,429.7 |
| Importaciones | 589.9 | 592.2 | 600.3 | 597.6 | 603.2 |
| Oferta | 3,827 | 3,892.6 | 3,925.2 | 3,999.1 | 4,032.9 |
| Consumo doméstico | 3,828.1 | 3,893.6 | 3,926.3 | 4,000.2 | 4,034.0 |

Adaptado de SFA-SAGARPA (2011)

2.4. Déficit nacional de carne e importación de productos cárnicos

En el año 2015 México tuvo un déficit de 5.6, 9.5 y 54.64% (SIAP-SAGARPA, 2015) en cuanto a carne de pollo, res y cerdo respectivamente. La demanda de alimentos ha aumentado y se ha diversificado como resultado tanto del crecimiento demográfico, como del incremento en el consumo por persona asociado al crecimiento económico. Por otro lado, Godfray *et al.* (2010) mencionan que la urbanización y el cambio en los estilos de vida han contribuido a modificar el patrón de consumo y de la distribución de alimentos; la concentración del volumen de operaciones ha favorecido el desarrollo y mayor participación de los supermercados en la comercialización y distribución, introduciendo nuevos esquemas de contratos de compra-venta, estándares de calidad, desarrollo de productos, entre otros.

Para mitigar el efecto de la demanda creciente de alimentos, el gobierno mexicano debe de tomar medidas tales como la importación de productos para dar respuesta a esta demanda. Para ello, los países exportadores deben de cumplir normas propiamente del producto a ofrecer para la salida de su país y el ingreso a México; por ejemplo, para importar carne de res procedente de Estados Unidos de América, la United States Department of Agriculture (FSIS- USDA, 2016) exige a las empresas autorizadas para exportar el producto los siguientes requisitos:

1. Los certificados de exportación de productos a México pueden ser firmados por cualquier veterinario del Food Safety and Inspection Service (FSIS) o un inspector de alimentos.
2. Requisar formulario FSIS 9060-5 - certificado de exportación de salubridad. Este certificado es aceptado por el Departamento de Salud de México, como un certificado de libre venta de productos cárnicos y avícolas en EE.UU.
3. Para exportar productos a México se requiere que el "producto exportado de:" la columna "producto exportado de:" según Formulario FSIS 9060-5, deberán identificar tanto la ubicación de la ciudad y el estado del establecimiento exportador. El nombre, número de establecimiento, y la dirección del establecimiento de exportación deberán ser proporcionados en la sección "Observaciones" del Formulario FSIS 9060-5. La información debe corresponder a la información que aparece en establecimiento exportador de la Lista de Plantas elegibles FSIS para México. Antes del 1 de octubre del 2011, el Formulario FSIS 9060-5 podía o no llevar a esta información. Los certificados firmados a partir del 1 de octubre de 2011, del Formulario FSIS 9060-5 deben tener esta información. La dirección debe aparecer en el siguiente formato:

- Número establecimiento
- Nombre establecimiento
- Dirección
- Ciudad (*): Estado (*): Código postal

Además de cumplir los requisitos exigidos por la Food and Drug Administration (FDA), las empresas importadoras de México deben cumplir la reglamentación que exige el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), en la cual establece cumplir los requerimientos zoonosanitarios para la importación del producto a adquirir. Para ello, deberán solicitar en el Módulo de Consulta de Requisitos Zoonosanitarios para la Importación (MCRZI), los requerimientos para la importación de carne de bovino (ejemplo) tal cual lo estipula el artículo 32 de la Ley Federal de Sanidad Animal.

Una vez aprobada la mercancía, el producto pasa al país por algún punto de entrada (aeropuerto, puertos o fronteras) para su posterior distribución. Para el ejemplo anterior, de la oferta total de la carne de bovino (aproximadamente 2,158,400 ton) el 95.35% corresponde a la producción nacional, cuyo producto se somete a las normas nacionales de calidad e inocuidad para garantizar al consumidor que dicho producto no tendrá efecto adverso en su salud. El otro 4.65% corresponde al volumen derivado de las importaciones las cuales deben cumplir estándares de calidad e inocuidad más estrictos; sin embargo, Lozano *et al.* (2013) en un estudio en el cual verificaron la inocuidad de carne de bovino importada y nacional encontraron que en aquellas muestras obtenidas en la Ciudad de México de cadenas de supermercados, la presencia de *Listeria* fue mayor en muestras importadas (n=8; 17.5%) que en aquellas de origen mexicano (n=4; 10%). Por otro lado, en la Ciudad de México, no detectaron *Salmonella* en muestras importadas, mientras que 2.5% de las muestras mexicanas resultaron positivas a este patógeno. Los mismos autores detectaron *Yersinia* en 12.5% de las muestras importadas y en 27.5% (n=11) de las muestras de origen mexicano. Por lo anterior, se puede discutir que los estándares en cuestión de inocuidad que se exigen tanto en países importadores como exportadores a veces no son suficientes para que el producto ingrese, si no que estos se deben de cumplir hasta el punto de venta a los consumidores.

2.5. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs)

De acuerdo con Díaz *et al.* (2016) y Akutsu *et al.* (2005), el término “calidad”, se define como la satisfacción del cliente, evaluada a través del cumplimiento de normas donde se establecen parámetros de tolerancia aceptables para el consumidor. En otra perspectiva, los autores citan que la calidad puede definirse en cuatro rubros: la calidad intrínseca del alimento (calidad nutricional y sensorial), la seguridad (calidades higiénico-sanitarias), el servicio (relación cliente-proveedor) y el precio. En este sentido, el término inocuidad, que se define como la garantía de que los alimentos no causarán daño al consumidor cuando se preparen y consuman de acuerdo con el uso a que se destinan, se enlaza directamente con la calidad en términos de seguridad alimentaria.

Un término común y que resalta cuando se habla de inocuidad alimentaria son las llamadas Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs), las cuales se definen como aquellas que se originan por la ingestión de alimentos contaminados por microorganismo patógenos, toxinas, venenos naturales o sustancias químicas dañinas, en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor (Cervantes y Valencia, 2008; FAO, 2009; OMS, 2016).

Las ETAs suponen una importante carga para la salud, millones de personas enferman y muchas mueren por consumir alimentos insalubres por los múltiples problemas de salud que estos ocasionan.

Según Taeymans (1995), a lo largo de esa década, las ETAs despertaron preocupación con respecto a la inocuidad de los mismos. La industria alimentaria ha avanzado considerablemente hacia la comprensión y el control de los riesgos existentes o previstos y el desarrollo de métodos y modelos para identificar los peligros que amenazan la salud y predecir la inocuidad de los alimentos ya que se considera una importante prioridad. Es por ello, que el diseño de métodos rápidos y precisos en la industria alimenticia es de vital importancia para la vigilancia y control de patógenos (Pérez *et al.*, 2005; Rojas y González, 2006).

Los alimentos insalubres están relacionados con la muerte de unos 2 millones de personas al año a nivel mundial, en su mayoría niños. Los alimentos que contienen bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas nocivas, causan más de 200 enfermedades, que van desde la diarrea hasta el cáncer (SSA, 2015).

Un alimento puede estar expuesto a diversos peligros y consecuentemente perder inocuidad por múltiples agentes físicos, químicos o microbiológicos, los cuales potencialmente pueden provocar un daño a la salud del consumidor (De la Fuente y Barboza, 2010). A pesar del

desarrollo de novedosas y sofisticadas tecnologías para obtener alimentos más inocuos, persisten los riesgos microbiológicos, representados principalmente por las enfermedades transmitidas por alimentos (Ananou *et al.*, 2007).

Según el *Codex Alimentarius* (2015), un peligro alimentario se define como “un agente biológico, químico o físico presente en el alimento, o bien la condición en que éste se halla, que puede causar un efecto adverso para la salud”. Los peligros pueden clasificarse como físicos, químicos y biológicos (OPS/OMS, 2015), y en el Cuadro 6 se pueden apreciar algunos ejemplos relacionados con éstos.

Cuadro 6. Tipos de peligros contenidos en los alimentos.

| Peligro físico | Peligro químico | Peligro biológico |
|--|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">  Limadura de metales y máquinas  Vidrio  Joyas  Piedras  Astillas de madera y huesos | <ul style="list-style-type: none">  Residuos de pesticidas, herbicidas  Residuos de medicamentos veterinarios  Lubricantes, tintas, aceites  Compuestos tóxicos orgánicos e inorgánicos  Aditivos alimentarios  Alérgenos  Toxinas naturales | <ul style="list-style-type: none">  Bacterias  Organismos que producen toxinas o metabolitos secundarios  Mohos  Hongos  Parásitos  Virus  Priones |

OPS/OMS (2015) y FAO (2009).

Los brotes de ETAs en los que intervienen agentes infecciosos y los episodios de contaminación química y física en los alimentos, exhiben los problemas existentes en la inocuidad de los alimentos y aumentan la preocupación de que los sistemas modernos de producción, transformación y comercialización no ofrezcan garantías suficientes para la salud pública (Tafur, 2009).

Según Hernández *et al.* (2011) las infecciones gastrointestinales son una de las causas más importantes de morbilidad entre los lactantes y niños. Se ha estimado que en Asia, África y Latinoamérica la probabilidad de que un niño muera antes de los 5 años puede llegar a 50%, aunque esto depende de factores socioeconómicos y nutricionales. Las enfermedades

gastrointestinales infecciosas son causadas por bacterias (*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, entre otros no menos importantes), parásitos (*Giardia lamblia* y amibas), y virus (Rotavirus y virus Norwalk) al consumir alimentos y agua contaminados con materia fecal.

En la Conferencia Internacional FAO/OMS sobre Nutrición, celebrada en Roma en 2003, se reconoció que los alimentos contaminados representan la fuente de enfermedades transmisibles y no transmisibles que causan sufrimientos a millones de personas en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud ha notificado que cada año, los siete agentes patógenos principales (*Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *E. coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Toxoplasmodium gondii*) causan entre 3.3 y 12.3 millones de casos de infección solamente en los Estados Unidos, lo que da lugar a pérdidas económicas de entre 6,500 y 34,900 millones de dólares. De estas infecciones un promedio de 800 000 a 4 millones de infecciones son por *Salmonella*, de las cuales alrededor de 500 son fatales (SINAVE, 2014).

En México a finales de los ochenta, se reportaron 2,076,343 episodios relacionados con enfermedades de transmisión alimentaria (Parrilla *et al.*, 1993), mientras que para 2003 un estudio gubernamental había reportado 4,556 decesos causados por infecciones intestinales (Hernández *et al.*, 2011). Las fuentes que se han identificado en los brotes de enfermedades gastrointestinales (Cortés *et al.*, 2015) se trataban de alimentos como huevos, carne, pollo, productos lácteos, verduras, mariscos, enlatados, etcétera.

El organismo encargado de llevar a cabo estos registros en México es el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE, 2016). Según reportes de este Sistema, en el año 2015, se presentaron 38,053 casos de paratifoidea y otras salmonelosis y 21,311 casos de fiebre tifoidea así como 2,226,969 casos por infecciones intestinales causadas por diferentes organismos. Para el año 2016 (semana epidemiológica 24), se presentaron 40,246 casos de paratifoidea y otras salmonelosis y 17,644 casos de fiebre tifoidea, así como 2,021,298 casos por infecciones intestinales causadas por diferentes organismos. En esta misma semana también se reportan aproximadamente 13,268 casos de intoxicaciones alimentarias bacterianas, cifra que se asemeja al año 2015 (14,580 casos en todo el año), la diferencia está en que los datos del 2016 sólo consideran la semana epidemiológica 24.

Según González y Rojas (2005), la detección y la prevención de ETAs dependen del esfuerzo conjunto de las autoridades normativas, sanitarias, industriales y educativas, cuyas investigaciones objetivas y detalladas conlleven a una disminución en los riesgos de

contaminación de los alimentos. Para garantizar a los consumidores un alimento seguro e higiénico, es necesario el control de los microorganismos patógenos en todas las etapas de la producción, lo que implica disponer de métodos de diagnóstico que no sólo sean rápidos y sensibles, sino, sobre todo, altamente específicos.

2.6. Principales microorganismos causantes de las ETAs

Hasta la fecha se han descrito más de 250 enfermedades de transmisión por alimentos (ETAs) y la mayoría son infecciones ocasionadas por distintas bacterias, virus y parásitos (González y Rojas, 2005). De acuerdo con estimaciones en el año 2011 del Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos de América (CDC, 2015), en el apartado de Enfermedades Transmitidas por Alimentos menciona que existen ocho agentes patógenos conocidos responsables de las hospitalizaciones y muertes en los Estados Unidos: Norovirus, *Salmonella nontyphoidal*, *Clostridium perfringes*, *Campylobacter spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Toxoplasma gondii*, *E. coli* (STEC) o157 y *Listeria monocytogenes*. Sin embargo, instituciones como la FAO (2003) menciona siete, los cuales se discutieron con anterioridad. Como indica la FDA (2015) los peligros son muchos y diversos, con síntomas que van desde malestares relativamente leves hasta enfermedades muy graves, que ponen en peligro la vida. Si bien las personas muy jóvenes, los ancianos y quienes tienen el sistema inmunitario débil tienen mayor riesgo de padecer consecuencias graves, producto de la mayoría de las enfermedades transmitidas por los alimentos, algunos de los organismos que se indican a continuación constituyen una verdadera amenaza para todas las personas.

En el Cuadro 7 se presenta información resumida de los principales patógenos causantes de ETAs en el mundo, los cuales generan las principales causas de hospitalizaciones y mayor número de casos y muertes.

Cuadro 7. Principales microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos con base a la severidad de la enfermedad o por el número de casos que produce.

| Microorganismo patógeno | Efecto | Origen |
|-------------------------|--------|--------|
|-------------------------|--------|--------|

| | | |
|---------------------------------|---|---|
| <i>Campylobacter jejuni</i> | Causa más común de diarrea, incluso puede presentar sangrado, dolor abdominal, fiebre y vómito. | Carnes y pollos crudos o mal cocinados, leche cruda y agua sin tratamiento. |
| <i>Clostridium botulinum</i> | Produce el botulismo, que es caracterizado por parálisis muscular y vómitos, visión borrosa, insuficiencia respiratoria y la muerte. | Alimentos preparados en el hogar, aceite de hierbas, pescado, miel, alimentos enlatados. |
| <i>Escherichia coli O157:H7</i> | Diarrea, colitis hemorrágica, síndrome hemolítico-urémico. Puede producir una toxina mortal. | Carnes mal cocidas, leche cruda, productos agrícolas, salsas, agua contaminada. |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | Causa listeriosis, una enfermedad grave en mujeres embarazadas, recién nacidos y adultos con un sistema inmune débil, bacteremia o meningitis. | Suelo y agua. Se ha encontrado en productos lácteos, carne cruda y mal cocida, en pollos, productos del mar frescos o en conserva, ensaladas. |
| <i>Salmonella spp</i> | Gastroenteritis. Es la segunda causa más común de enfermedades transmitidas por alimentos, vómito y fiebre. | Huevo crudo y mal cocido, pollos y carnes mal cocinadas, productos lácteos, mariscos, frutas y vegetales, jugos o agua contaminada. |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Intoxicación estafilocócica. Produce una toxina que causa vómitos al poco tiempo de ser ingerida, fiebre, diarrea. | Alimentos cocinados con alto contenido en proteína (jamón cocido, ensaladas, pasteles, lácteos). |
| <i>Shigella spp.</i> | Disentería bacilar, fiebre, calambres. | Ensaladas, leche, productos lácteos, agua sucia, mayonesa, agua potable contaminada. |
| <i>Vibrio vulnificus</i> | Causa gastroenteritis (síndrome de septicemia primaria). Las personas con enfermedades en el hígado son de alto riesgo, diarrea, vómitos, fiebre, sangrado bajo la piel, úlceras. | Mariscos crudos o mal cocidos. |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | Causa yersiniosis, una enfermedad caracterizada por diarrea y/o vómitos. | Cerdo, productos lácteos y agrícolas, agua contaminada, tofu. |
| <i>Toxoplasma gondii</i> | Parásito que causa toxoplasmosis, una enfermedad muy severa que puede producir desórdenes en el sistema nervioso central, particularmente retardo mental y deterioro visual en niños. | Carnes, principalmente de cerdo. |

| | | |
|--------------------------------|---|---|
| <i>Arcobacter spp.</i> | Diarrea, bacteremia. | Carne de ave. |
| <i>Bacillus cereus</i> | Diarrea, vómito. | Arroz, especias, productos lácteos y cárnicos. |
| <i>Clostridium perfringens</i> | Diarreas acuosas, dolor abdominal, náuseas. | Carne de res y aves, salsas, jugo de carnes, cualquier alimento en el cual se haga mal uso de la temperatura. |
| <i>Cryptosporidium</i> | Diarrea (generalmente acuosa), calambres estomacales, malestar estomacal, fiebre leve. | Alimentos crudos o contaminados por una persona enfermo que la manipuló luego de cocinarla; agua potable contaminada. |
| <i>Cyclospora cayetanensis</i> | Diarrea (generalmente acuosa), pérdida del apetito, pérdida de peso significativa, calambres estomacales, náuseas, vómitos, fatiga. | Varios tipos de frutas y verduras frescas (bayas, lechuga y albahaca importadas). |
| <i>Vibrio cholerae</i> | Cólera. | Ostras crudas, pescado. |
| <i>Hepatitis A</i> | Diarrea, orina oscura, ictericia y síntomas similares a los de la gripe, por ejemplo, fiebre, dolor de cabeza, náuseas y dolores abdominales. | Frutas y verduras crudas, agua potable contaminada, alimentos sin cocer o alimentos cocidos que no son recalentados luego de haber estado en contacto con una persona infectada que los manipuló. |

Adaptado de Rojas y González (2006), De la Fuente y Barboza (2010) y FDA (2015)

2.7. *Listeria monocytogenes* y listeriosis

Listeria monocytogenes es el microorganismo patógeno responsable de la listeriosis, listerilosis, Listeriasis, infección listérica, granulomatosis infantiséptica (Tovar *et al.*, 2005), enfermedad transmitida por los alimentos de carácter grave. A pesar de presentarse con baja frecuencia, en la actualidad es una de las ETAs más letales conocidas, causando gran alarma a nivel mundial a productores de alimentos, consumidores y autoridades sanitarias. Esta preocupación a través de los años ha ido en aumento, ya que tanto investigadores como autoridades de salud han llegado a la conclusión que no es posible su completa eliminación a nivel de las plantas procesadoras de alimentos (Thimothe *et al.*, 2004). *Listeria monocytogenes* es un patógeno intracelular facultativo que puede llegar a causar enfermedades importantes en personas susceptibles. Los individuos inmunocomprometidos como las mujeres embarazadas, recién nacidos y personas seniles tienen mayor probabilidad de contraer listeriosis, donde las más características comunes son las infecciones en el

sistema nervioso central, en forma de meningitis aguda, meningoencefalitis y encefalitis de tronco (Laguna *et al.*, 2013).

A pesar de que la listeriosis se presenta rara vez, sigue siendo de preocupación de salud pública debido a su alta tasa de mortalidad (20 a 30%), esto debido a que la ingestión de alimentos contaminados se considera la principal fuente en los casos esporádicos de listeriosis (Doumith *et al.*, 2004).

Según Pieri *et al.* (2010) la listeriosis puede inducir abortos, trastornos neurológicos, sepsis y los trastornos gastrointestinales, además de estar asociada a alimentos tales como leche cruda, leche supuestamente pasteurizada, queso, helados, verduras crudas, carne mal cocida, embutidos, pollo crudo, pescado crudo o ahumado, la capacidad que tiene la *Listeria monocytogenes* para desarrollarse a temperaturas tan bajas como 3 °C, permite su multiplicación también en los alimentos refrigerados.

Según la Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria (2006) expone que la transmisión de la enfermedad puede tener un origen:

- ④ Vertical (madre-hijo)
- ④ Zoonótico (contacto con animales enfermos) y
- ④ Nosocomial (adquisición hospitalaria),

Según los autores en la actualidad se reconoce que la mayoría (99%) de los casos de listeriosis humana son de transmisión alimentaria.

El género *Listeria* se divide en seis especies (*Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, y *L. grayi*), donde sólo *L. monocytogenes* es patógena para el hombre y a los animales (Seeliger 1986; Rocourt y Cossart, 1997) y *Listeria ivanovii* está asociada únicamente con infección en animales.

Basados en los antígenos somático (O) y flagelar (H), existen hasta el momento, 13 serovariedades de *L. monocytogenes*. Sin embargo, tres de ellas (1/2a, 1/2b y 4b) han sido aisladas en más del 90% de los casos de listeriosis humana y animal (Low *et al.*, 1993, NOM-143-SSA1-1995). Otras serovariedades, como el 1/2c, se han encontrado como contaminantes de alimentos (Espaze *et al.*, 1998).

La listeriolisina-O (LLO), una hemolisina, es uno de los factores de patogenicidad más importantes de *L. monocytogenes*, y el gen *hlyA* es responsable de codificar este factor de

patogenicidad. Las fosfolipasas e internalinas pueden contarse como otros factores de virulencia de la bacteria (Swaminathan *et al.*, 2007).

Listeria monocytogenes es una bacteria Gram (+), aerobia o anaerobia facultativa, móvil a 25 °C e inmóvil a 37 °C, capaz de sobrevivir a temperaturas extremas entre 0 y 45 °C con un óptimo a 37 °C. Se le considera un patógeno psicrótrofo, es decir, capaz de desarrollar a temperaturas de refrigeración, lo cual la diferencia de otras bacterias patógenas como *Salmonella* o *Staphylococcus aureus*, que son inhibidas en su crecimiento a bajas temperaturas (Marzocca *et al.*, 2004). *L. monocytogenes* tiene la capacidad de formar biopelículas y de sobrevivir a pH extremo (9.6) y altas concentraciones de sal (>20%), características que le permiten crecer en suelo, cuerpos de agua, agua residual y alimentos. Las especies de *Listeria* son catalasa positiva, oxidasa negativa, rojo metil positivo y Voges-Proskauer positivo. Asimismo, *L. monocytogenes* es beta-hemolítica en agar sangre y forma zonas estrechas de hemólisis alrededor de las colonias, por otro lado, *L. ivanovii* forma dobles o triples zonas hemolíticas cuando crece en agar sangre de caballo, las otras especies de *Listeria* son no hemolíticas, tal como se aprecia en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Características de *Listeria spp.*

| Especies | Producción de ácido a partir de: | | | | | Reducción de nitrato | Prueba CAMP: | |
|-------------------------|----------------------------------|-----------|----------|-----------|-----------|----------------------|------------------|----------------|
| | Hemólisis | D-glucosa | D-Xilosa | D-Manitol | L-Ramnosa | | <i>S. aureus</i> | <i>R. eqhi</i> |
| <i>L. monocytogenes</i> | + | + | - | - | + | - | + | + o - |
| <i>L. innocua</i> | - | + | - | - | V | - | - | - |
| <i>L. ivanovii</i> | + | + | + | - | - | - | - | + |
| <i>L. seeligeri</i> | + | + | + | - | - | - | + | - |
| <i>L. welshimeri</i> | - | + | + | - | V | - | - | - |
| <i>L. grayi</i> | - | + | - | + | - | - | - | - |
| <i>L. murrayi</i> | - | + | - | + | V | + | - | - |

Schuchat *et al.*, 1991; NOM-143-SSA1-1995.

La contaminación de los alimentos por *L. monocytogenes* y su consecuente participación como agente responsable de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) son, por lo general, el resultado de eventos simultáneos que se presentan en varios puntos de la cadena alimentaria, entre los que se incluyen: a) alimentos y fuentes de contaminación del medio

ambiente; b) condiciones que favorecen el crecimiento del patógeno y c) falta de buenas prácticas de higiene y de programas de monitoreo en la cadena alimentaria (Castañeda *et al.*, 2014).

Por otro lado, Torres *et al.* (2005) mencionan que el genoma de *L. monocytogenes* fue secuenciado y posee un cromosoma circular de 2,944,528 pb con un promedio de G + C de 39%. Se han identificado 2,853 genes; sin embargo, al 35.3% de estos no se les conoce función. Estos autores también comentan que *L. innocua* posee sólo un cromosoma circular de 3,011,209 pb con un contenido promedio de G + C de 37%. Dentro del género *Listeria*, estas dos especies presentan alto grado de homología en la secuencia del RNA ribosomal 16S (RNAr 16S) siendo las de mayor cercanía taxonómica.

2.8. Factores que predisponen la presencia de bacterias en la carne

Bover y Garriga (2014) señalaron que los establecimientos de preparación y venta de alimentos listos para el consumo tienen especial responsabilidad en el origen de las contaminaciones por *L. monocytogenes* y, en último término, en la incidencia de listeriosis. También observan que algunos estudios sobre la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, preparados y envasados en el punto de venta muestran que la prevalencia del patógeno es superior a la observada en productos preparados y envasados en instalaciones industriales, generalmente bajo condiciones higiénicas controladas. Por otro lado, evaluaciones del riesgo sobre listeriosis en productos cárnicos listos para el consumo atribuyen la mayoría de casos de listeriosis (60 a 83%) a contaminaciones originadas en el punto de venta (Endrikat *et al.*, 2010).

Según Barrientos *et al.* (2015), *L. monocytogenes* es ubicua, sus reservorios son el medio ambiente en general, los animales y el hombre. Es considerada como contaminante frecuente de establecimientos de procesamiento de alimentos (centros de beneficio, salas de despiece e industrias alimentarias en general), donde es común que forme biopelículas o ‘biofilms’, mecanismo que la protege de condiciones adversas como cambios de temperatura y de los compuestos de lavado (Schöbitz *et al.*, 2009). Por consiguiente, las contaminaciones microbianas pueden ocurrir como resultado de técnicas equivocadas durante el proceso de sacrificio de ganado y aves de corral, prácticas defectuosas de corte y programas de saneamiento insuficiente pueden ser un riesgo para la salud humana (Mehmet *et al.*, 2015).

En el rastreo, durante los procesos de obtención de la carne, ésta puede entrar en contacto con la piel de los animales sacrificados, su contenido estomacal y entérico, el equipamiento y utensilios del establecimiento, las manos y ropas de los operarios, el agua utilizada para el lavado de la canal y del equipo, el aire de las zonas de procesado y de almacenamiento, teniendo como consecuencia la presencia de células microbianas en la superficie de la canal, en superficies de músculo y grasa previamente estéril (Mouwen y Prieto, 1998).

Los microorganismos que pueden alterar la carne tienen acceso por infección del animal vivo, previo al sacrificio, o por contaminación de la carne *posmortem*, en el rastreo. Para ello, se tiene que poner énfasis en todos los riesgos biológicos, químicos o físicos que sean razonables prever en cada fase, basándose en la composición del producto, proceso, las instalaciones (López y Casp, 2004). En este sentido, se debe conocer el diagrama de flujo de la línea de sacrificio de la especie animal en cuestión, hasta su comercialización directa al consumidor. En el Cuadro 9 se da a conocer algunas fuentes potenciales de contaminación por *Listeria monocytogenes* en los productos destinados a consumo humano.

Cuadro 9. Fuentes potenciales de contaminación de *Listeria monocytogenes*.

| Categoría | Fuentes potenciales |
|---|--|
| A. Ingredientes | <ul style="list-style-type: none"> 🌱 Materias primas, alimentos crudos: 🌱 carne y pescado 🌱 Leche 🌱 Vegetales (frutas y verduras) |
| B. Coadyuvantes/auxiliares tecnológicos | <ul style="list-style-type: none"> 🌱 Aire comprimido 🌱 Hielo 🌱 Soluciones salinas utilizadas en la refrigeración de los alimentos listos para el consumo |
| C. Superficies que entran en contacto con alimentos refrigerados listos para el consumo | <ul style="list-style-type: none"> 🌱 Cintas transportadoras fibrosas y porosas 🌱 Equipo de llenado y envasado 🌱 Cintas, peladoras y colectores 🌱 Contenedores, bandejas, cestos, tubos, etc. 🌱 Rebanadoras, picadoras, trituradoras, mezcladoras, amasaderas 🌱 Utensilios varios, cuchillos, tablas de cortar, etc. 🌱 Guantes |
| D. Superficies que no entran en | <ul style="list-style-type: none"> 🌱 Básculas de suelo |

contacto con alimentos refrigerados listos para el consumo.

- 🗑️ Mangueras
- 🗑️ Cavidades cilíndricas de los transportadores
- 🗑️ Armadura de equipos
- 🗑️ Armadura de muelles, oxidados o con cavidades
- 🗑️ Rodamientos vistos de los equipos
- 🗑️ Filtro de aire comprimido
- 🗑️ Condensación de cubetas de goteo
- 🗑️ Carcasas de motores
- 🗑️ Herramienta de mantenimiento (por ejemplo; llaves inglesas, destornilladores, etc.)
- 🗑️ Montacargas, toros, carretillas, estantes
- 🗑️ Interruptores
- 🗑️ Aspiradores, fregonas-bayetas
- 🗑️ Cubos de basura y otros artículos auxiliares
- 🗑️ Útiles de limpieza de equipamientos (cepillos, estropajos, etc.)
- 🗑️ Congeladores en espiral y en túnel
- 🗑️ Máquinas de hielo
- 🗑️ Delantales
- 🗑️ Suelos, paredes, techos, ventanas, desagües
- 🗑️ Estructuras elevadas, pasarelas
- 🗑️ Áreas de limpieza (pilas), condensaciones y agua estancada
- 🗑️ Aislamiento empapado/húmedo de paredes, tuberías y sistemas de enfriamiento
- 🗑️ Juntas de goma de las puertas, especialmente de los refrigeradores
- 🗑️ Contenido de los aspiradores

E. Ambiente de planta

Bover y Garriga (2014)

Estudios conducidos por el FSAI (2005) y Bover y Garriga (2014) han encontrado numerosos artículos que describen la presencia de *Listeria monocytogenes* en el ambiente (suelos, tierras de cultivo, prados y pastizales y otro material vegetal, agua, ríos y aguas residuales), en granjas, forraje y pienso para alimentación animal, así como en el ambiente de procesado de los alimentos, incluyendo industria y establecimientos de elaboración, preparación y venta de alimentos (paredes, suelos, desagües, techos, equipamientos, herramientas, etc.) e incluso también, la presencia de portadores sanos, tanto animales como humanos. Esto conlleva a que en los últimos años los establecimientos de preparación y venta de alimentos listos para el

consumo tengan una especial relevancia y responsabilidad como origen potencial de las contaminaciones por *L. monocytogenes*. En un estudio realizado por Sanmarcos *et al.* (1997) evaluaron la presencia de *Salmonella*, *Listeria* y *Yersinia* en ambientes, superficies de trabajo, equipo y manipuladores de mataderos, encontrando *Salmonella spp* en 11.1% de las cuchillas, 6.25% de las tablas de corte y 5.6% de los pisos muestreados, para *Yersinia enterocolitica* se encontró 16.7% en pisos y 12.5% en tablas de corte; *L. monocytogenes* se detectó en 13.3% de estropajos de pisos y 7.1% de recipientes para lavado de manos, además de otras especies de *Listeria* encontradas en estropajos de pisos y paredes y tablas de corte.

Con base en los hallazgos de las investigaciones anteriores, se puede concluir que la contaminación por microorganismo patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp*, *Yersinia enterocolitica* y *E. coli*, entre otras no menos importantes, se puede dar en cualquier punto de la cadena productiva, es decir, desde los animales o productos en el campo, la línea de sacrificio o poscosecha, empaque, puntos de venta al público y en el hogar. Esto dependerá principalmente de la carga microbiana presente, las prácticas de higiene y las condiciones para que el patógeno se desarrolle.

A continuación se presentan algunos diagramas de flujo de sacrificio de aves, reses y cerdos (Figuras 4, 5 y 6), de los cuales, cada eslabón de la cadena puede representar un riesgo de contaminación, poniendo en riesgo la salud del consumidor final.

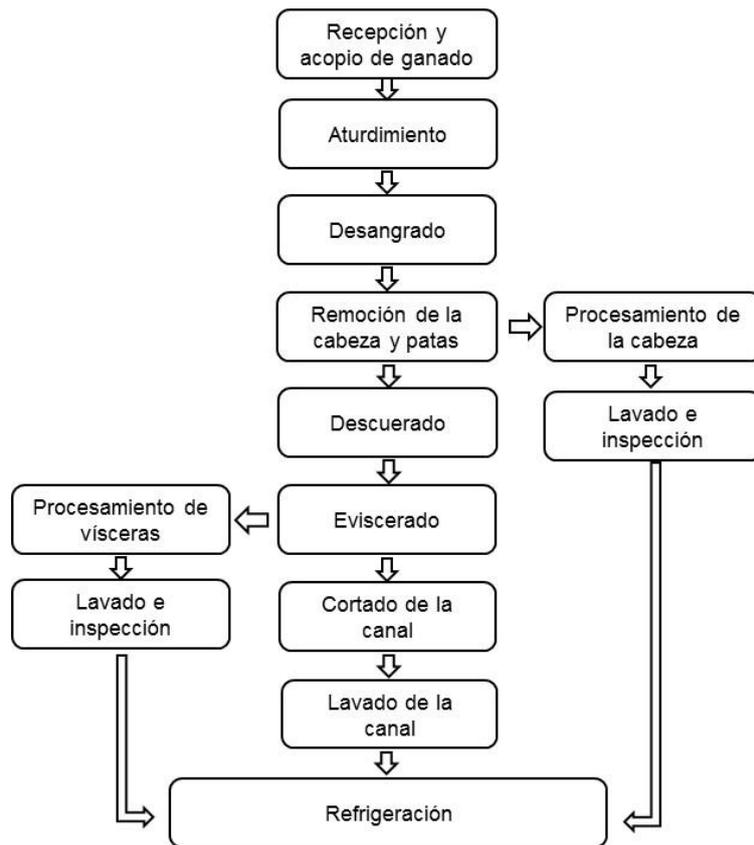


Figura 14. Diagrama de flujo para el sacrificio de ganado bovino (Peña *et al.*, 2007).

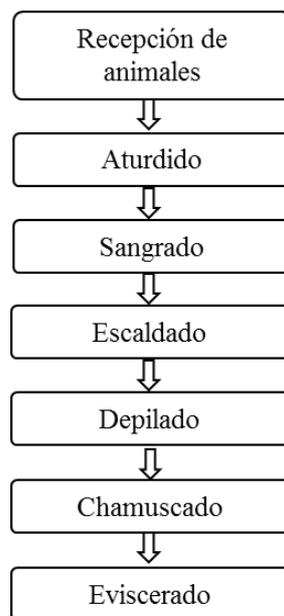


Figura 5. Diagrama de flujo de una línea de sacrificio de porcinos (López y Casp, 2004).

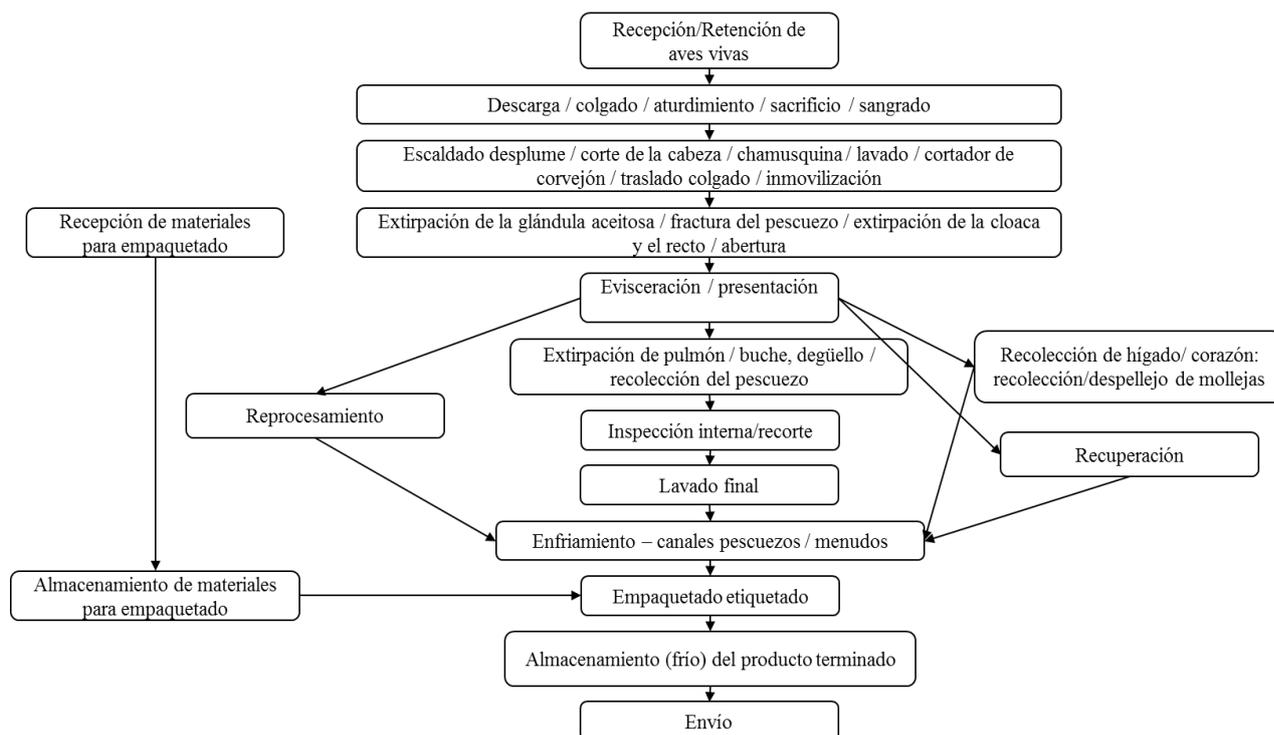


Figura 6. Diagrama de flujo para el sacrificio de aves (USDA, 1999).

2.9. Métodos de diagnóstico de *Listeria spp.*

Los métodos convencionales de diagnóstico bacteriológico son laboriosos, requieren tiempo y no es posible identificar todas las cepas aisladas, por lo cual la información que brindan es limitada y dificulta la toma de decisiones. El desarrollo y la automatización de los métodos de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) abren una oportunidad para su aplicación como herramientas analíticas en microbiología y control de calidad de los alimentos, debido a su rapidez, alta sensibilidad y eficiencia para la detección temprana de los patógenos (González y Rojas, 2005).

Lo anterior concuerda lo comentado por Allaert y Escolá (2002) y Torres *et al.* (2005) quienes mencionan que la identificación de *L. monocytogenes* desde décadas pasadas se realiza por métodos convencionales, los cuales requieren, mínimo de 5 días para declarar si un alimento esté libre de *Listeria* y 10 días adicionales para reconocer la especie *monocytogenes*; sin embargo, en la industria de alimentos estos métodos no permiten tomar decisiones rápidas, lo que causa un incremento en el costo del producto final por los períodos largos de cuarentena antes de su liberación.

Por otro lado, debido a las características de la PCR (especificidad, sensibilidad, velocidad, límite de detección y selectividad), se ha incrementado el uso de esta tecnología para estandarización y validación como prueba de diagnóstico para detectar patógenos (Malorny *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004.). La detección oportuna y confiable de varios patógenos bacterianos en cualquier fase de la cadena cárnica, es un paso importante hacia su control, monitoreo y prevención.

En México existen métodos convencionales y herramientas moleculares como es el caso de las PCR aprobadas internacionalmente para el diagnóstico de *Listeria monocytogenes*, las cuales en su mayoría están basadas en normas internacionales, como las normas ISO 11290-1/2, la FDA (2016, BAM: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*, capítulo 10), la OIE (2004. Capítulo 2.10.14 del Manual de la OIE sobre animales terrestres) y el Codex Alimentarius (CAC/GL 61 – 2007).

Las metodologías para el aislamiento de *L. monocytogenes* y su cuantificación de los alimentos se han basado en el cultivo tradicional en caldos de enriquecimiento selectivos y medios de agar, seguido de pruebas fisiológicas con el fin de clasificarlo a nivel de especie. Recientemente, con el desarrollo de métodos basados en la biología molecular, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha utilizado ampliamente, no sólo para la detección específica de *Listeria spp.* y *L. monocytogenes*, sino también con fines de cuantificación (Cocolin y Rantsiou, 2016).

Las especies de *Listeria* son los principales agentes patógenos transmitidos por los alimentos y son los agentes causantes de la listeriosis, una infección grave con altas tasas de mortalidad. El desarrollo de métodos rápidos para detectar la presencia potencial del patógeno *Listeria* es importante, particularmente en la industria alimentaria (Rosimina *et al.*, 2016).

En las Figuras 7 y 8 se muestran los resúmenes generales de las Normas Oficiales Mexicanas que hacen referencia a la determinación de *Listeria monocytogenes* en alimentos para consumo humano. El presente trabajo tiene su base en la NOM-143-SSA1-1995. Bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*. Sin embargo, también se menciona la reciente norma NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos y toxinas microbianas, en la cual se contemplan los principales patógenos que ocasionan problemas de salud para las personas, en ella podemos encontrar la determinación y aislamiento de

Salmonella spp, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, Enterococos fecales en agua y otros patógenos y toxinas importantes.

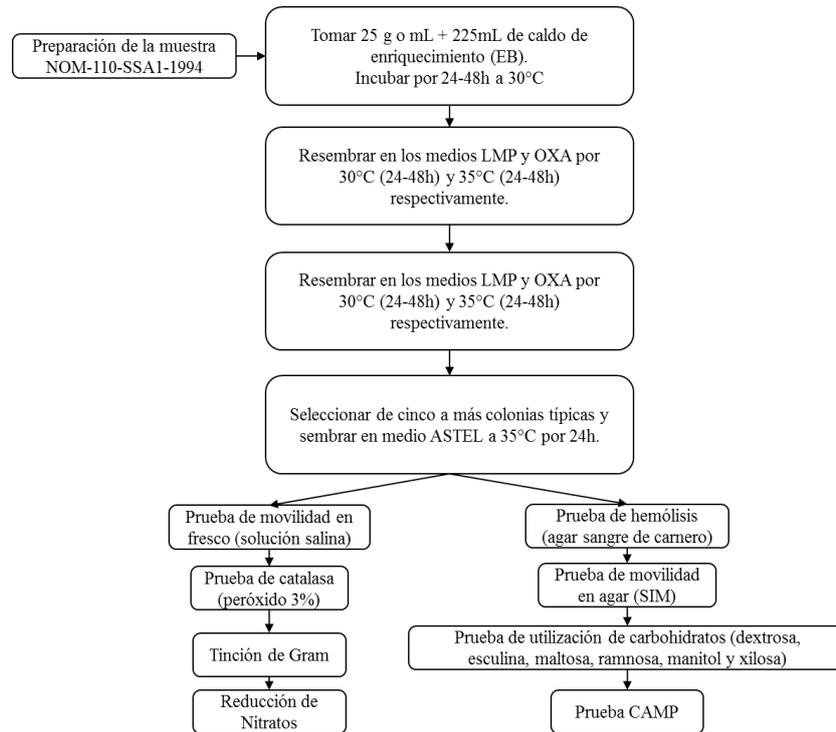


Figura 7. Resumen general de la norma NOM-143-SSA1-1995.

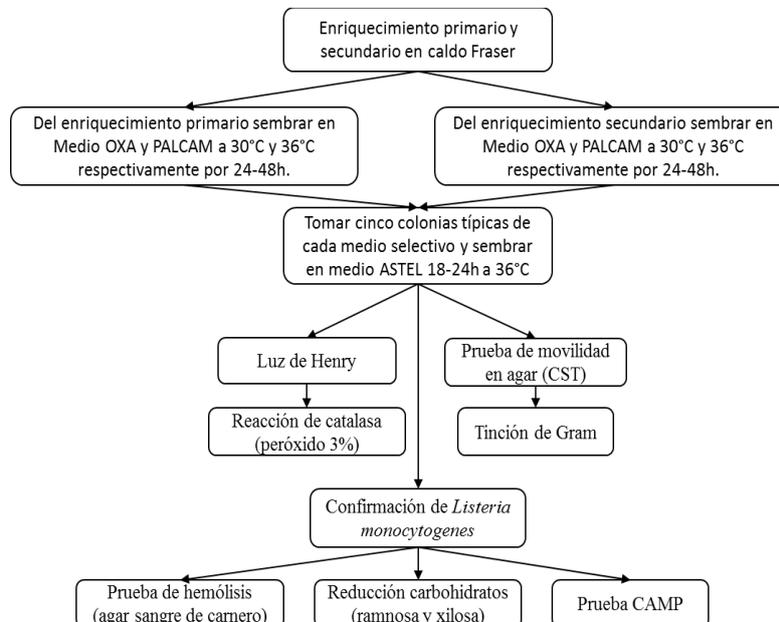


Figura 8. Resumen general de la norma NOM-210-SSA1-2014.

En la norma NOM-210-SSA1-2014 (Figura 8), la parte que especifica el aislamiento de *L. monocytogenes* recae en el Apéndice C Normativo. Método de referencia para el aislamiento de *L. monocytogenes*, el cual tiene como fundamento la Norma Internacional ISO 11290 Microbiología de los alimentos y alimento para animales - Método horizontal para la detección y recuento de *L. monocytogenes*. Parte 1: Método de detección. 1a. edición (1996). Por lo que algunos caldos de enriquecimiento y medios selectivos varían; sin embargo, los principios de la norma anterior son similares a la norma NOM-143-SSA1-1995 es decir, en ambas hay aislamiento, identificación y caracterización.

La reacción en cadena de la polimerasa, permite amplificar secuencias específicas de ADN y ARN, de tal manera que es posible detectar copias únicas de genes, las cuales se pueden manipular posteriormente. El procedimiento consiste en realizar ciclos repetitivos de desnaturalización del ADN molde, el alineamiento de dos oligonucleótidos con las secuencias complementarios al ADN de interés, y la extensión mediante la actividad de una ADN polimerasa. Ambos oligonucleótidos se alinean en los extremos del fragmento del ADN molde que se desea amplificar, de tal manera que después de la síntesis de la cadena complementaria se desnaturaliza con calor el dúplex resultante para repetir unas 20 veces este ciclo, lo que da lugar a una amplificación exponencial de 2^{30} veces aproximadamente (Arredondo, 1993).

Lo anterior concuerda con lo mencionado por Rodríguez y Barrera (2004) y Tamay *et al.* (2013), al señalar que la PCR es un método *in vitro* de síntesis de ADN con el que un segmento particular de éste es específicamente amplificado millones de veces al ser delimitado por un par de cebadores o iniciadores que lo flanquean. Su copiado se logra en forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable. Así se obtienen en cuestión de horas millones de copias de la secuencia deseada del ADN.

Las metodologías para el aislamiento de *L. monocytogenes* y su cuantificación en los alimentos se han basado en el cultivo tradicional en caldos de enriquecimiento selectivos y medios de agar, seguido de pruebas fisiológicas con el fin de clasificarlo a nivel de especie. Recientemente, con el desarrollo de métodos basados en la biología molecular, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha utilizado ampliamente, no sólo para la detección

específica de *Listeria spp.* y *L. monocytogenes*, sino también con fines de cuantificación (Cocolin y Rantsiou, 2016).

Rosimina *et al.* (2016) mencionan que la exploración de la biología molecular en microbiología de los alimentos ha permitido el desarrollo de métodos que no se basan en la capacidad del microorganismo de crecer en material sintético. Las técnicas moleculares son la base en la detección de material genético (ADN o ARN) que es único para los microorganismos en cuestión, y por esta razón, se caracterizan por una alta especificidad. En este sentido, la PCR es uno de los métodos más rápidos e importantes para la detección sensible y específica de microorganismos patógenos. Las especies de *Listeria* son los principales agentes patógenos transmitidos por los alimentos y son los agentes causantes de la listeriosis, una infección grave con altas tasas de mortalidad. El desarrollo de métodos rápidos para detectar la presencia potencial de *Listeria* es importante, particularmente en la industria alimentaria.

La proteína p60 es una proteína extracelular de 60 kDa con actividad hidrolasa de la mureína, involucrada en la formación del septum durante la división celular y responsable de la invasión *Listeria* en fagocitos no profesionales. El gen *iap* codifica la proteína asociada a la invasión p60 que es común en todas las especies de *Listeria*; una comparación anterior de secuencias de ADN indicó que es conservado y que ciertas porciones del gen son específicas para cada especie; por lo tanto, basándose en esto, una combinación de sólo cinco cebadores permite la detección específica y la diferenciación de especies de *Listeria*. Un cebador es derivado al extremo conservado 3' que es específico para todas las especies de *Listeria*, los otros cuatro cebadores son específicos para *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. grayi* y las tres especies agrupadas *L. ivanovii*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri*, respectivamente (Bubert *et al.*, 1999; Villegas *et al.*, 2010).

Los genes house-keeping *prs* y *ldh* flanquean el grupo *prs-prfA-plcA-hly-mpl-actA-plcB-orfX-orfZ-orf B-orfA-ldh*, que consiste en la conocida 9,6 kb PrfA que son un grupo de genes reguladores de virulencia (o patogenicidad de *Listeria* 1, LIPI-1). El gen *prs* codifica la enzima fosforribosil pirofosfato sintetasa (318 aminoácidos). Encontrado en todas las especies de *Listeria* y se puede utilizar para la determinación de *Listeria* (Liu, 2013).

Por otro lado, el gen que codifica para listeriolisina O, *hlyA*, tiene una secuencia de aminoácidos deducida de la proteína que se compone de 504 aminoácidos y contiene un residuo de cisteína único que es esencial para la actividad citolítica. La localización de las inserciones de transposones dentro del gen *hlyA* en varios mutantes no hemolíticos y avirulentos sugiere fuertemente que esta región del cromosoma bacteriano es esencial para la virulencia de *Listeria monocytogenes* (Cossart *et al.*, 1989).

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Desarrollar una técnica de PCR para la detección rápida y eficiente de *Listeria monocytogenes* en muestras de pollo, res y cerdo.

3.2. Objetivos específicos

- Evaluar la presencia de *Listeria monocytogenes* en la carne de pollo, res y cerdo distribuidos en puntos de venta de la Ciudad de Texcoco de Mora, Estado de México.
- Estandarizar y validar la técnica de PCR para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne de pollo, res y cerdo.

IV. HIPÓTESIS

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) permite analizar muestras de carne sospechosas de *Listeria monocytogenes* de manera más rápida y eficiente disminuyendo los falsos negativos y falsos positivos en comparación con la técnica convencional de usada en la norma NOM-143-SSA1-1995.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Localización

La recolección de muestras se realizó en centros comerciales, tianguis y carnicerías ubicadas en la Ciudad de Texcoco, ubicado en la región oriente del Estado de México, con coordenadas geográficas 19.30° N, 98.53° O.

Por otro lado, los análisis microbiológicos y moleculares se llevaron a cabo en el Laboratorio de Nutrición Animal del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, perteneciente al Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad Ganadería, ubicado en el km 36.5 de la Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México.

5.2. Muestreo

Para realizar el muestreo de los productos cárnicos, se delimitó la Ciudad de Texcoco, posteriormente se realizó un censo de las carnicerías, tiendas de autoservicio, expendios de carnes (pollo, res y cerdo) y tianguis de la zona. Los muestreos se realizaron en tres periodos; el primero tuvo lugar el 5 de octubre, el segundo el 26 de octubre y el tercero el 16 de noviembre del 2015. Cada muestreo se realizó entre las 10:00 y 11:00 horas. Las muestras de carne tomadas se procesaron como lo indica la norma NOM-109-SSA1-1994.

Para el cálculo del tamaño de muestra óptimo se utilizó la fórmula recomendada para el muestreo estratificado (asignación general) según Castillo (2005) por tipo de establecimientos (tianguis, carnicerías y supermercados):

$$n \geq \frac{\sum_{i=1}^L \frac{U_i^2 \cdot P_i \cdot q_i}{w_i}}{N^2 \cdot \left[\frac{d}{Z_{1-\alpha/2}} \right]^2 + \sum_{i=1}^L 4_i \cdot P_i \cdot q_i}$$

Donde:

P_i = Proporción estimada para el estrato i .

w_i = Fracción de observaciones asignadas al estrato i .

d = Máximo de error permisible.

$Z_{1-\alpha/2}$ = Valor de la distribución normal al $1- \alpha/2$.

U_i = Número de unidades de muestreo en el estrato i .

$N = U_1 + U_2 + \dots + U_i$ = total de unidades de muestro.

L = Total de estratos.

Para la toma de muestras se siguieron las especificaciones de la norma NOM-143-SSA1-1995, Bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*; la norma NOM-109-SSA1-1994, Bienes y servicios. Procedimientos para la toma; manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

Una vez recolectadas las muestras de los establecimientos, estas fueron identificadas y transportadas como lo indican las normas antes mencionadas, y se trasladaron al Laboratorio de Nutrición Animal para su análisis microbiológico con base a la norma NOM-143-SSA1-1995, Bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*.

5.3. Cepas control

Para llevar a cabo un buen control en el registro y desarrollo de la metodología indicada en la norma NOM-143-SSA1-1995 se utilizaron cultivos puros de *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Rhodococcus equi* (ATCC 6939), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 25902) y *Proteus vulgaris* (ATCC 6898) provenientes del cepario del Laboratorio de Bacteriología Médica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

Para preservar la cepa de *Listeria monocytogenes* se inoculó una asada (3 mm de ϕ) previamente estéril en caldo de enriquecimiento y caldo soya tripticaseína (EB y CSTEL estériles) respectivamente con 15% de glicerol, se incubaron a 35 °C por 24 y 48 h. Pasado el periodo de incubación, se tomó una alícuota de 1 mL vertiéndose en tubos Eppendorf de 2 mL anticipadamente rotulados debidamente y se procedió a su almacenamiento a -20 °C. Para el caso de las cepas puras restantes se siguió el mismo procedimiento pero exclusivamente con CSTEL.

5.4. Inoculación de muestras de carne

La inoculación artificial de una de las muestras de carne de pollo, res y cerdo (control positivo) se llevó a cabo primeramente descartando la posibilidad que fueran positivas para *Listeria monocytogenes* por medio de la técnica de PCR. Una vez realizado el ensayo, se procedió a contaminar el producto resultante de mezclar 25 g de carne y 225 mL de caldo EB con 100 µL de la cepa ATCC 19115 almacenada a -20 °C. El procedimiento fue el que establece la norma NOM-143-SSA1-1995; esto se realizó con el objetivo de observar el comportamiento del desarrollo de las colonias típicas de *Listeria monocytogenes* a lo largo de las pruebas que determina la norma en cuestión.

5.5. Detección de *Listeria monocytogenes* por la norma NOM-143-SSA1-1995

Una vez recibidas las muestras en el Laboratorio de Nutrición Animal se procedió al enriquecimiento de las muestras de la siguiente manera: se tomó una muestra representativa de carne, tanto de la superficie como del interior (25 g en total), se colocó en un vaso de licuadora con aspas estériles con 225 mL de caldo de enriquecimiento EB previamente estéril, se licuó hasta homogeneizar (aproximadamente 1.5 min), después se vertió el contenido en envases de dilución estériles de 500 mL, se incubó a 30 °C por 48 h.

En el proceso de aislamiento, se tomó 0.1 mL de la mezcla enriquecida e inoculada por 48 h, y se resembró en medio OXA por 24 y 48 h dependiendo del crecimiento de las colonias, en el medio OXA, la NOM indica que las colonias de *Listeria* son negras con halo negro, algunas colonias pueden aparecer con halo con un tono café oscuro que se definen mejor a los siete días de incubación. Se tomaron cinco colonias típicas desarrolladas en el medio selectivo y se resembraron en agar soya tripticaseína con extracto de levadura (ASTEL), posteriormente se incubaron a 35 °C por 24 h.

Una vez desarrolladas las colonias en el medio ASTEL se almacenaron a 4 °C y fueron utilizadas como inóculo para realizar las pruebas de identificación.

Las pruebas de identificación físicas y bioquímicas fueron las mismas que indica la norma NOM-143-SSA1-1995 (Figura 7 y Cuadro 8).

- Prueba de movilidad en fresco (solución salina 0.85%)
- Prueba de catalasa (peróxido 3%)

- 🕒 Tinción Gram
- 🕒 Prueba de hemólisis (agar sangre de carnero al 5%)
- 🕒 Prueba de movilidad en agar (medio SIM)
- 🕒 Prueba de utilización de carbohidratos
- 🕒 Prueba de reducción de nitratos
- 🕒 Prueba de Cristie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP)

Las pruebas de reducción de nitratos y reducción de carbohidratos fueron realizadas mediante el kit comercial MICRO-ID[®] *LISTERIA* (REMEL) Microbiological Identification System.

5.6. Detección de *Listeria monocytogenes* por medio de PCR

La técnica de PCR desarrollada para la determinación de *Listeria monocytogenes* en muestras de carne recolectadas se basó en la amplificación de los genes *iap* y *prs*.

El gen *iap* codifica la proteína asociada a la invasión p60 que es común en todas las especies de *Listeria*; ciertas porciones del gen son específicas para cada especie; por lo tanto, basándose en esto, una combinación de sólo cinco cebadores permite la detección específica y la diferenciación de especies de *Listeria*. Un cebador es derivado al extremo conservado 3' específico para todas las especies de *Listeria*, los otros cuatro cebadores son específicos para *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. grayi* y las tres especies agrupadas *L. ivanovii*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri*, respectivamente (Bubert *et al.*, 1999; Villegas *et al.*, 2010).

El gen *prs* codifica la enzima fosforribosil pirofosfato sintetasa (318 aminoácidos). Encontrado en todas las especies de *Listeria* y se puede utilizar para la determinación de *Listeria* (Liu, 2013).

5.7. Extracción de ADN de las muestras de carne

Se recolectó 1 mL del producto homogeneizado con el caldo de enriquecimiento incubado a 35 °C por 48 h (apartado de enriquecimiento de la norma NOM-143-SSA1-1995) en tubos Eppendorf de 1.5 mL previamente identificados y se almacenaron en refrigeración.

La extracción del ADN de las muestras de carne refrigeradas se llevó a cabo mediante el protocolo establecido por el Kit Wizard® Genomic ADN Purification (PROMEGA). Se analizó la calidad y la concentración del ADN hidratado con un Espectrofotómetro-Fluoroscpectrometro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific), aunado a esto, las muestras de ADN se corrieron en un gel de agarosa al 1% y en una cámara de electroforesis con TBE 1X como buffer de corrida a 90 V, con el objetivo de comparar la calidad y la cantidad del ADN.

5.8. Control positivo y negativo

El control positivo de la corridas en la PCR estuvo representada por el ADN extraído de un cultivo puro de *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) tomado del stock conservado a -20 °C, sembrado en CSTEEL. Para el control negativo se extrajo ADN de un cultivo puro de *Escherichia coli* (ATCC 25902). La extracción de ADN de los controles se realizó con base al protocolo del Kit Wizard® Genomic ADN Purification (PROMEGA, USA).

5.9. Iniciadores para la identificación de *Listeria monocytogenes* y *Listeria sp.*

En el Cuadro 10 se muestran los iniciadores utilizados en la PCR para la amplificación de los genes *iap* y *prs* (Doumith *et al.*, 2004; Callejo *et al.*, 2008; Lozano *et al.*, 2013; Cocolin y Rantsiou, 2016) en las muestras de carne de pollo, res y cerdo colectadas de los expendios del tianguis, carnicerías y supermercados.

Cuadro 10. Iniciadores para la amplificación de genes en la determinación de *Listeria spp* y *Listeria monocytogenes*.

| Iniciador | Secuencia de bases | Gen | Pares de bases | Autor |
|-----------|------------------------------|------------|----------------|--|
| Mar 1 | 5'-GGGCTTTATCCATAAAATA-3' | | | |
| Mar 2 | 5'-TTGGAAGAACCTTGATTA-3' | <i>iap</i> | 453 | Lozano <i>et al.</i> , 2013; Cocolin y Rantsiou, 2016. |
| PRS-F | 5'-GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG-3' | | | |
| PRS-R | 5'-CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG-3' | <i>prs</i> | 370 | Doumith <i>et al.</i> , 2004; Callejo <i>et al.</i> , 2008. |

5.10. Condiciones de la técnica de PRC

5.10.1. Amplificación del gen *iap*

En la PCR desarrollada se emplearon los iniciadores Mar 1, Mar 2, para la amplificación del gen *iap* a partir del ADN extraído de las muestras de carne. El volumen final de la reacción fue de 15 μ l, conteniendo 10X taq (1X), MgCl₂ (1.5 mM), dNTP (0.2 mM, mezcla de las cuatro bases), Mar 1 + Mar 2 (0.25 μ M) y 0.6 U de Taq (BIOLASE™ ADN polimerasa, 500 U), más 2 μ l de ADN de muestras (\pm 120 ng en promedio). Para llevar a cabo la reacción se utilizó un termociclador BIO-RAD C1000 Touch con las siguientes condiciones : 95 °C por 1 min, seguidos por 35 ciclos compuestos por 30 s a 94°C, 20 s a 53 °C, 30 s a 74 °C y un paso final de extensión de 8 min a 74 °C.

5.10.2. Amplificación del gen *prs*

En la PCR se emplearon los iniciadores PRS F y PRS R para la amplificación del gen *prs*. El volumen final de la reacción fue de 15 μ l, conteniendo 10X taq (1X), MgCl₂ (1.5 mM), dNTP (0.2 mM, mezcla de las cuatro bases), PRS F + PRS R (0.1 μ M) y 0.7 U de Taq (BIOLASE™ ADN polimerasa, 500 U), más 2 μ l de ADN de las muestras (\pm 120 ng en promedio). Para llevar a cabo la reacción se utilizó un termociclador BIO-RAD C1000 Touch con las siguientes condiciones: 94 °C por 1 min, seguidos por 32 ciclos compuestos por 40 s a 94°C, 1.15 min a 64 °C, 1.15 min a 72 °C y un paso final de extensión de 7 min a 74 °C.

5.11. Electroforesis

La reacción final de la PCR de las muestras de carne fue depositada en los carriles del gel de agarosa (LONZA) al 2%, la mezcla final fue de 10 μ l (6 μ l de reacción y 4 μ l de 5X Green goTaq). El gel cargado se sumergió en TBE 1X como buffer de corrida y se corrió a 120 V por 80 min. Posteriormente, el gel se tiñó con bromuro de etidio a una concentración de 1.0 μ g mL⁻¹ durante 15 min, posteriormente, para visualizar los fragmentos amplificados se irradia con UV mediante el uso del transiluminador A323 (Bio-Imaging).

5.12. Variables evaluadas

5.12.1. Especificidad y sensibilidad relativa

En el Cuadro 11 se incluye el procedimiento y las fórmulas para el cálculo de la especificidad y sensibilidad relativa con la cual se comparan los resultados de la prueba en las muestras inoculadas y muestras no inoculadas.

Cuadro 11. Cálculo de la especificidad (E) y sensibilidad (S) relativa.

| | | Muestras evaluadas | | |
|----------------------|----------|--------------------|--------------|-------|
| | | Inoculada | No inoculada | Total |
| Resultados de la PCR | Positiva | a | b | a+b |
| | Negativa | c | d | c+d |
| | Total | a+c | b+d | n |

López y Fernández (2001).

$$S = \frac{a}{(a + c)}$$

$$E = \frac{d}{(b + d)}$$

5.12.2. Índice de McNemar

Caravaca *et al.* (2000) y Canal (2011) hacen referencia a que el índice de McNemar se utiliza para decidir si puede o no aceptarse que determinado tratamiento induce un cambio en la respuesta de los elementos sometidos al mismo. Para ello se clasifica un grupo de individuos entre dos categorías mutuamente excluyentes, indicadas por + (positivo) y - (negativo). Pasado un estímulo o intervención es posible que alguno de estos individuos cambie de categoría, de manera que la tabla de frecuencias que se obtuvo se presenta en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Tabla para el cálculo del índice McNemar

| | | Después | | |
|-------|----------|----------|----------|-------|
| | | Positivo | Negativo | Total |
| Antes | Positivo | a | b | a+b |
| | Negativo | c | d | c+d |
| | Total | a+c | b+d | n |

La proporción de individuos con la característica positiva antes de la evaluación fue $p_1 = \frac{a+b}{n}$ y después de ésta fue $p_2 = \frac{a+c}{n}$. Es de interés contrastar si la diferencia entre esas dos proporciones es cero (hipótesis nula) frente a que p_1 y p_2 sean diferentes ($p_1 - p_2 = \frac{b-c}{n} \neq 0$). Para ello, se puede observar en las celdas b y c que son las que muestran discordancia entre las dos mediciones, contrastando si el número de individuos que tras la intervención han dejado de presentar la característica + (b) es el mismo que el (c), es decir han dejado de presentar la característica.

El estadístico de prueba que permite contrastar si existen diferencias significativas entre las frecuencias esperadas es:

$$T_1 = \frac{(|b - c| - 1)^2}{b + c} \approx X_{(1)}^2$$

En este caso se rechaza la hipótesis nula si $X_{(1)}^2$ es mayor que $X_{1-\frac{\alpha}{2}}^2(1g.l)$

5.12.3. Índice de acuerdo (Kappa)

Se utilizó el índice Kappa (López y González, 2001) para evaluar la concordancia o reproducibilidad de las metodologías comparadas en este estudio (método microbiológico vs PCR) cuyo resultado es categórico y cuyo cálculo se reduce a la siguiente fórmula:

$$k = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

Donde, P_o = proporción de acuerdos observados y P_e = proporción de acuerdos esperados en la hipótesis de independencia entre los observadores. La independencia implica claramente

que $k = 0$. El valor cero de esta medida implica que el acuerdo es igual al esperado por azar (ausencia de acuerdo). Si $k = 1$ entonces hay acuerdo perfecto. Podría tomar valores negativos raras veces cuando el acuerdo es menor que el debido al azar (Aguilera, 2005).

En el Cuadro 13 podemos observar el grado de acuerdo que establece la metodología Kappa según los autores señalados, que va del “sin acuerdo” al “casi perfecto”.

Cuadro 13. Escala de interpretación del índice Kappa.

| Valor de Kappa (k) | Grado de acuerdo |
|--------------------|------------------|
| < 0.00 | Sin acuerdo |
| 0.00-0.20 | Insignificante |
| 0.21-0.40 | Mediano |
| 0.41-0.60 | Moderado |
| 0.61-0.80 | Sustancial |
| 0.81-1.00 | Casi perfecto |

López y González, 2001; Aguilera, 2005; Armendáriz y Barreiro, 2013.

5.12.4. Teorema de Bayes o redes Bayesianas

El teorema de Bayes permite incorporar cambios en el grado de creencia sobre los sucesos aleatorios a medida que adquirimos nueva información ya que representa un conjunto de incertidumbres asociadas teniendo en cuenta las relaciones de independencia condicional que se establecen entre ellas (Díaz y de la Fuente, 2006; López *et al.*, 2007).

Para el presente experimento se utilizó la siguiente notación:

$P(\text{PCR} + / M+) = P(\text{PCR} + \cap M+) / P(M+) =$ Probabilidad de que la técnica de PCR sea + dado que el método microbiológico es +.

$P(\text{PCR} + \text{M}-) = P(\text{PCR} + \text{M}-) / P(\text{M}-)$ = Probabilidad de que la técnica de PCR sea positiva (+) dado que el método microbiológico es negativo (-).

5.12.5. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en carne de res, pollo y cerdo, y por tipo de establecimiento (tianguis, carnicerías y supermercados)

Esta variable se calculó de acuerdo con el comando FREQ (SAS 9.2, 2008) con un $\alpha = 0.05$. El objetivo de este análisis fue determinar la calidad microbiológica de la carne con base a la prevalencia de *Listeria monocytogenes*; asimismo, evaluar la incidencia de este microorganismo por el tipo de establecimiento.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Validación de la técnica de PCR

6.1.1. Concentración mínima de ADN

Para llevar a cabo la determinación de la concentración mínima de ADN, se realizó un ensayo de diluciones con la cepa pura de *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) para detectar la mínima cantidad de ADN en la cual los iniciadores pudieran alinearse con la hebra base y llevar a cabo la amplificación de los genes *iap* y *prs*. Los iniciadores fueron: Mar 1-Mar 2 (453 pb) para *Listeria monocytogenes* y PRS F-PRS R (370 pb) de *Listeria spp*, respectivamente.

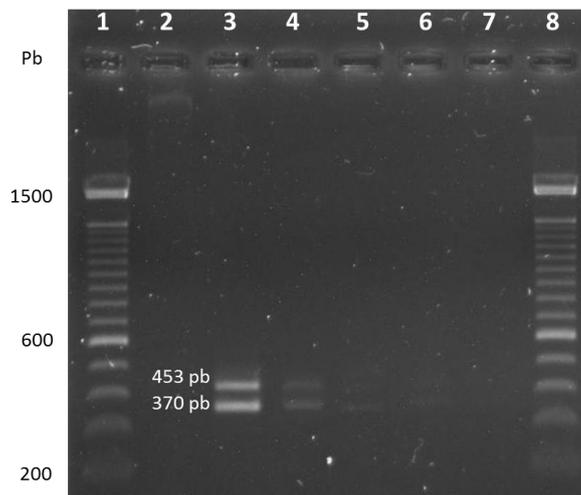


Figura 15. Detección mínima de ADN por PCR para los genes *iap* (*Listeria monocytogenes*) y *prs* (*Listeria spp*) por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Carril: 1) Marcador 100 bp DNA Ladder Invitrogen; 2) Control negativo; 3) Dilución 10⁻¹, 4) Dilución 10⁻²; 5) Dilución 10⁻³; 6) Dilución 10⁻⁴, 7) Dilución 10⁻⁵, 8) Marcador 100pb Ladder.

En la Figura 9 se aprecia que a partir de la dilución 10⁻⁵ no se registró señal de amplificación de los iniciadores (Mar 1-Mar 2 y PRS F-PRS R), mostrando que la concentración mínima detectable por medio de la técnica de PCR fue en la dilución 10⁻⁴ (3 ng μL^{-1}). Estos resultados son inferiores a los reportados por López y Mejía (2012), en donde evaluaron dos métodos de extracción de ADN para *Listeria monocytogenes*, solventes orgánicos y PBS más

Twin 20, y encontraron una concentración mínima de ADN detectable de $0.44 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ y $0.53 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, respectivamente.

Por otro lado, Amagliani *et al.* (2007) al comparar la detección de *Listeria monocytogenes* con el uso de kits comerciales, reportaron concentraciones mínimas detectables de ADN de 5.3, 2.3 y $1.9 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ para los kits de extracción comerciales Qiagen, Diatheva y Gentra, respectivamente; sin embargo, la pureza del ADN fue de 1.64, 1.36 y 1.25, respectivamente, y resultó baja para estos métodos. Los valores bajos de pureza fueron atribuidos por los autores a la contaminación con otras partículas, las cuales podría ser proteínas, al tener efectos inhibidores sobre la ADN polimerasa.

En el Cuadro 14 se presentan las concentraciones de ADN extraído de las diluciones y las UFC equivalentes. El método de extracción por medio del kit comercial Wizard[®] Genomic ADN Purification (Promega, USA) permitió observar una concentración de ADN por debajo de las referencias citadas, las cuales posibilitan la amplificación de los genes *iap* y *prs*, ya que la pureza (relación 260/280) del ADN extraído de las muestras inoculadas, en promedio fue de 1.80, resultando por arriba del reportado por Amagliani *et al.* (2007).

En relación a la pureza del ADN amplificado, Liu (2008) menciona que las muestras contienen múltiples sustancias que interfieren con los procesos de amplificación de los ácidos nucleicos (posiblemente a través de la inhibición de la ADN polimerasa termoestable, la degradación y el secuestro de los ácidos nucleicos disponibles). En efecto, algunas de estas sustancias que impiden la reacción de la polimerasa de ADN en alimentos pueden ser compuestos fenólicos, glucógeno, iones de calcio, la grasa y otras sustancias orgánicas.

Cuadro 14. Concentración de ADN extraído y UFC mL^{-1} de *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115).

| Dilución | Concentración de ADN (ng mL^{-1}) | Relación 260/280 | UFC mL^{-1} |
|-----------|---|---------------------|----------------------|
| 10^{-1} | 109.3 | 1.94 | 209 |
| 10^{-2} | 51.7 | 1.84 | 26 |
| 10^{-3} | 26.2 | 1.97 | 3 |
| 10^{-4} | 3 | 1.69 | 0 |
| 10^{-5} | 0 | -0.48 | 0 |

Por otro lado, se determinó la ecuación de regresión del experimento en la cual se asocia la concentración de ADN con las unidades formadoras de colonias, observándose una $r^2 = 0.9693$. La ecuación fue la siguiente:

$$y = 18.92341 e^{0.023x} - 40$$

6.1.2. Especificidad y sensibilidad relativa de los iniciadores Mar 1-Mar 2 y PRS F-PRSR en la técnica de PCR

Como resultado de la amplificación de los genes *iap* y *prs* de las muestras inoculadas y sin inocular con *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 100% para ambos casos, esto se puede observar en la Figura 10-a en donde todas las muestras que presentan la contaminación intencional con *Listeria monocytogenes* amplificaron la región de los genes mencionados, y por otro lado, en la Figura 10-b se aprecia que las muestras contaminadas con *E. coli* (ATCC 35922) no presentaban señal. Lo anterior indica que los primers MAR1-MAR2 y PRS1-PRS2 son altamente específicos para la amplificación de los genes *iap* y *prs*, respectivamente, como se muestra en el Cuadro 15.

Cuadro 15. Análisis de la sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR para detección de *Listeria monocytogenes*.

| | | Muestras analizadas | | |
|----------------------|--------------|---------------------|----------------|-----------|
| | | Inoculada* | No inoculada** | Total |
| Resultados de la PCR | Presencia | 5 | 0 | 5 |
| | Ausencia | 0 | 5 | 5 |
| | Total | 5 | 5 | 10 |
| | | S= 1 | E= 1 | |

*Inoculadas con cepa pura de *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115).

**Inoculadas con cepa pura de *E. coli* (ATCC 35922).

Los resultados obtenidos concuerdan con lo mencionado con Wuenscher *et al.* (1993) ya que el gen *iap* codifica un polipéptido de 484 aminoácidos que contienen una secuencia señal de 27 aminoácidos, los cuales producen un polipéptido de 47.5 a 60 kDa, esencial para la supervivencia de la bacteria denominado p60 en la cual un residuo de cisteína en la parte C-terminal de p60 que se conserva en todas las proteínas de tipo p60 de las otras especies de *Listeria* es esencial para ambas actividades. En el estudio, el gen *iap* no pudo ser inactivado sin una pérdida de viabilidad celular, lo que indicó que la p60 sea una proteína esencial de limpieza para *L. monocytogenes* y probablemente también para otras especies de *Listeria*.

Estos datos sugieren que p60 posee una actividad de mureína-hidrolasa requerida en un paso tardío durante la división celular.

Por otra parte, Fagundes *et al.* (2008) menciona que el mecanismo de patogenicidad en *L. monocytogenes* se relaciona con la presencia de la proteína p60 asociada a la invasión codificada por el gen *iap*. La región que codifica un dominio central de la proteína p60 se caracteriza por la presencia de una secuencia de repetición en tándem (TRS) de ACAAAT, que corresponden a los aminoácidos treonina y asparagina (TN). Este dominio se utiliza para determinar la variación molecular entre las cepas de *L. monocytogenes*.

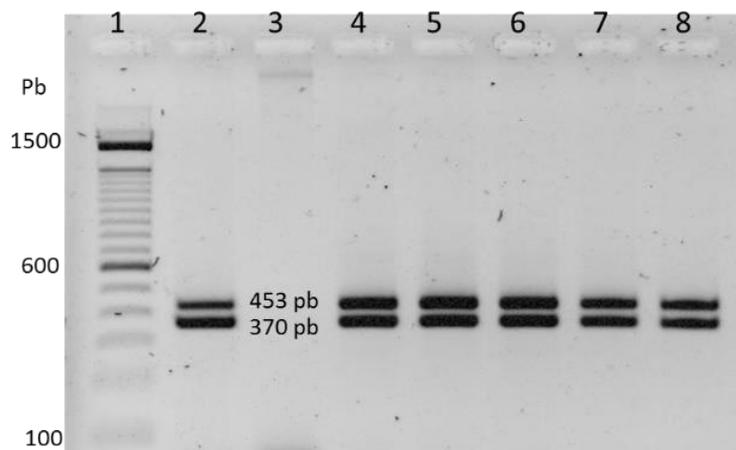


Figura 10-a. Amplificación de los genes *iap* (453 pb) y *prs* (370 pb) para muestras positivas a *Listeria monocytogenes*. Carril 1: Marcador 100 bp DNA Ladder Invitrogen, Carril 2: Control positivo, Carril 3: Control negativo a *E. coli* (ATCC 35922), Carril 4-8: ADN de *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115).

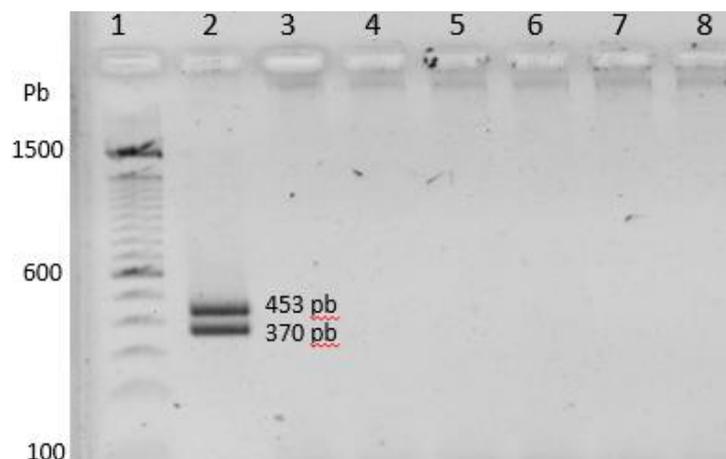


Figura 16-b. Amplificación de los genes *iap* (453 pb) y *prs* (370 pb) para muestras negativas *Listeria monocytogenes*. Carril 1: Marcador 100 bp DNA Ladder Invitrogen, Carril 2: control positivo de *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), Carril 3: control negativo, Carril 4-8: muestras inoculadas con la cepa pura de *E. coli* (ATCC 35922).

6.1.3. Comparación del método microbiológico establecido en la NOM-143-SSA1-1995 y la técnica de PCR para la identificación de *Listeria monocytogenes* en carne de pollo, res y cerdo

En el Cuadro 16 se muestran los resultados obtenidos del análisis de las muestras de carne de pollo, en donde se puede apreciar el índice Kappa y los resultados el teorema de Bayes obtenidos por periodo de muestreo. Los primeros dos índices establecen la concordancia entre el método microbiológico de la NOM-143-SSA1-1995 y la técnica de PCR, por otro lado el teorema de Bayes establece las probabilidades condicionales de ambas metodológicas con respecto a los resultados positivos y negativos, en otras palabras, la probabilidad de que la PCR detecte una muestra negativa o positiva, cuando el método microbiológico detecte o no la misma.

Cuadro 16. Índice de Kappa y el Teorema de Bayes obtenidos al comparar el método microbiológico con la técnica de PCR para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne de pollo, res y cerdo.

| Indicadores/carne | Periodos de muestreo | | | | | | | | |
|-------------------|----------------------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|
| | P1 | | | P2 | | | P3 | | |
| | Pollo | Res | Cerdo | Pollo | Res | Cerdo | Pollo | Res | Cerdo |
| Índice Kappa | 0.8 | 0.88 | 1 | 0.89 | 0.88 | 1 | 0.85 | 1 | 0.7 |
| Teorema de Bayes | 0.125 | 0.08 | 0.1 | 0.125 | 0.08 | 0.1 | 0.125 | 0.08 | 0.1 |

El índice de Kappa (Cuadro 16) para los tres periodos de muestreo es similar, estableciendo una concordancia de acuerdo con el Cuadro 13 “casi perfecta”. Por consiguiente, el resultado del índice de McNemar no rechaza la igualdad entre ambos métodos, al no detectar diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Poutou *et al.* (2005) determinaron el grado de concordancia entre el método Gold Estándar y la técnica de PCR con un intervalo de confianza del 95%, para la detección de *Listeria monocytogenes* en carnes crudas de res y pollo, donde se obtuvo 98.43% de concordancia, implicando que el valor predictivo positivo obtenido para el método de PCR, indicó que existe una confiabilidad del 100% para detectar las muestras positivas con este enteropatógeno. Asimismo, el valor predictivo negativo obtenido para el método alterno PCR, indicó que existe una confiabilidad del 100% para detectar las muestras negativas en muestras de carne de pollo. Este valor es similar al encontrado por Ramírez *et al.* (2010)

cuando compararon un método microbiológico tradicional con la técnica de PCR para la detección de *Listeria monocytogenes* en queso blanco criollo, obteniendo un índice de Kappa de 1.

Para el caso de la carne de res, el índice Kappa estuvo en el rango de concordancia de 0.81 a 1.0 y se interpreta con un grado de acuerdo equivalente a “casi perfecto”, es decir, no se observan diferencias ($p < 0.05$), por lo que el índice de McNemar no rechaza la igualdad entre los métodos microbiológicos y la técnica de PCR.

Asimismo, Burbano *et al.* (2011) determinaron el grado de concordancia entre el método tradicional y la técnica de PCR para la determinación de *Listeria monocytogenes* en leche por medio del índice de Kappa, obteniendo el 85% de concordancia haciendo alusión a la importancia del tiempo de trabajo para la identificación del patógeno. Por otro lado, encontraron que la concordancia obtenida para el método por PCR fue de 100% entre la respuesta obtenida por el método de referencia y el método alterno con muestras idénticas para carne de res.

Los resultados obtenidos en el análisis de la carne de cerdo son similares en los dos primeros periodos (P1 y P2; Cuadro 16) con un índice de concordancia del 100%, que, de acuerdo con Armendáriz y Barreiro (2013) corresponde a un grado de acuerdo “casi perfecto”. Para el P3 el índice de Kappa, la concordancia fue de 0.7.

Esta diferencia entre los índices de Kappa obtenidos en este estudio puede explicarse acorde a lo comentado por el AINIA (2014), ya que es posible obtener resultados falsos positivos debido a la detección de bacterias no viables. No obstante, tanto la etapa inicial de preenriquecimiento de las muestras minimizan esta posibilidad. De forma adicional, esta técnica permite realizar análisis complementarios sobre la misma porción de muestra mediante técnicas tradicionales de aislamiento en cultivo, por lo que la posibilidad de obtener un falso positivo con respecto al método de referencia es nula. Por otra parte, existen alimentos que pueden inhibir la reacción de PCR y por tanto dar resultados falsos negativos. Sin embargo, los controles de calidad que se incluyen y, sobre todo, el control endógeno permite conocer si se ha podido producir esta inhibición y, en caso afirmativo, realizar análisis complementarios mediante técnicas de cultivo.

Rosas (2014) obtuvo una concordancia de 88% entre los métodos de detección para *Salmonella typhimurium* en carne de cerdo, res y pollo. Lo anterior es un ejemplo en el cual evalúan el grado de acuerdo de los métodos convencionales y la técnica de PCR, dando como resultado que la técnica de PCR es una garantía confiable para la determinación de patógenos en alimentos y que utiliza el índice Kappa como valor decisivo.

Por otro lado, Plaza y Morales (2015), en su estudio de análisis microbiológico en quesos frescos cuyo objetivo era determinar la ausencia o presencia de *Listeria* y *Salmonella*, encontraron un índice de concordancia que iba de 0.87 a 1.0 para *Listeria* dependiendo el tipo de establecimiento, y para el caso de *Salmonella* en el rango de 0.9 a 1.0.

De acuerdo con Rodríguez y Crespo (1999), el teorema de Bayes hace referencia a aquellas situaciones donde una vez producido un suceso B, se trata de calcular si el mismo es debido a una causa A. En otras palabras aplicadas en la comparación de las metodologías evaluadas en este experimento, con este teorema se busca la probabilidad de que la técnica de PCR encuentre un valor positivo, dado que el método microbiológico encuentre un valor positivo. O por el contrario, encontrar la probabilidad de que la técnica de PCR detecte un valor positivo, dado que el método convencional detecte un valor negativo.

En el caso particular de la carne de pollo, res y cerdo los resultados de dicho teorema se encuentran en el Cuadro 16, con valores de 0.125, 0.08 y 0.1, respectivamente. Lo anterior se puede interpretar de la siguiente manera:

- a) Para la carne de pollo, implica que cuando el método microbiológico de la NOM-143-SSA1-1995 detecta una muestra positiva de *Listeria monocytogenes*, la técnica de PCR detectará también al 100%. Sin embargo, cuando el método convencional no detecta la presencia del patógeno, la técnica de PCR alcanzará a detectar en un 12.5% más.
- b) Por otro lado, según los resultados obtenidos para la carne de res, el teorema de Bayes indica que cuando el método microbiológico detecta una muestra positiva de *Listeria monocytogenes*, la técnica de PCR detectará también al 100%. Sin embargo, cuando el método convencional no detecta la presencia del patógeno, la técnica de PCR alcanzará a detectar en un 8% más.
- c) Finalmente, para la carne de cerdo cuando el método microbiológico detecta una muestra positiva de *Listeria monocytogenes*, la técnica de PCR detectará también al

100%. Sin embargo, cuando el método convencional no detecta la presencia del patógeno, la técnica de PCR alcanzará a detectar en un 10% más.

La variación de los resultados de ambas técnicas evaluadas en este estudio también fue observada y discutida por el AINIA (2014) en donde se menciona la presencia de falsos positivos y negativos derivados de las células muertas. Esto concuerda con lo establecido por Candrian (1995) ya que las células pudiesen estar dañadas debido a los productos de saneamiento, almacenamiento y en general a la metodología para la toma de muestra.

A pesar de que existen pocos trabajos en los cuales utilizan la metodología del Teorema de Bayes aplicado a la microbiología de alimentos, es una herramienta confiable que nos permite tener un mejor valor predictivo de la presencia de patógenos (Rosas 2014; Gutiérrez *et al.*, 2010).

Las redes bayesianas se usan en microbiología de los alimentos para determinar el crecimiento o ausencia de *Escherichia coli* con base a variables ambientales como la temperatura, entre otros (Hajmeer y Basheer, 2003). Por otro lado, Kelly *et al.* (2010) utilizaron las redes Bayesianas para determinar las variables que permiten predecir la ocurrencia de bacterias (coliformes fecales y totales y estreptococos fecales) en la Bahía de Banderas, Nayarit, México.

Carlin *et al.* (2000) utilizaron el Teorema de Bayes para identificar *Bacillus cereus* y *Clostridium botulinum* como los principales riesgos de contaminación en una evaluación de exposición en la cual consistió en la determinación de la prevalencia de bacterias formadoras de esporas (SFB, por sus siglas en inglés) peligrosas en alimentos refrigerados y cocidos que contengan vegetales y en hortalizas sin procesar, e identificación de SFB representativos de la comunidad bacteriana en alimentos refrigerados y cocidos que contengan hortalizas, y determinaron parámetros de resistencia al calor y factores que afectan la resistencia al calor, la cinética de crecimiento de las SFB en sustrato vegetal y de la influencia de factores controladores.

6.2. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en carne de pollo, res y cerdo distribuidas en puntos de venta de la Ciudad de Texcoco

La importancia de conocer la incidencia de *L. monocytogenes* en los establecimientos dedicados a la venta de productos cárnicos frescos, radica en el riesgo de contraer listeriosis, ya que como menciona Castañeda *et al.* (2014), es una enfermedad transmitida por alimentos

(ETA) que cobra importancia por su impacto clínico, alta tasa de mortalidad y el efecto económico derivado de los brotes asociados con el consumo de alimentos. En México, las fallas en los sistemas de vigilancia epidemiológicos son causa de información imprecisa sobre la incidencia de la listeriosis y sobre su caracterización como ETA.

En la Figura 11 se presentan los resultados de la incidencia de *Listeria monocytogenes* en carne de pollo, res y cerdo distribuida en puntos de venta de la ciudad de Texcoco con valores de 65, 62, y 67% de las muestras analizadas en el P1, P2, P3, respectivamente. Podemos observar que la incidencia de este microorganismo no varió conforme pasa el tiempo, y se explica debido a que los periodos de muestreo tuvieron un intervalo de 15 días. Independientemente del periodo de análisis, los porcentajes de incidencia determinados fueron elevados, y estuvo relacionado con el hecho de que el mayor número de muestras analizadas provienen de establecimientos que carecen de medidas higiénicas en el proceso de la carne como lo es en tianguis (comercio informal) y carnicerías.

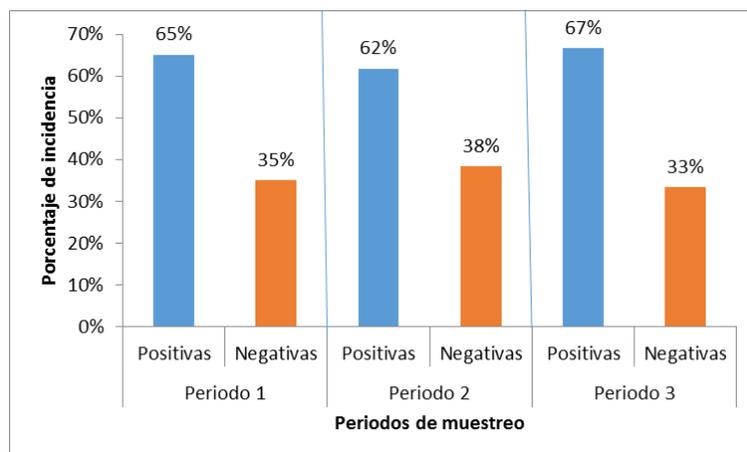


Figura 171. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en carne de pollo, res y cerdo en puntos de venta de la Ciudad de Texcoco, durante tres periodos de muestreo.

Lawrence y Gilmour (1994) al analizar productos de aves de corral durante 6 meses, encontraron que en toda la sala de procesamiento de la carne cruda y cocida, el 46 y 29%, respectivamente de las muestras estaban contaminadas con *Listeria spp.*, mientras que el 26 y el 15% contenían *L. monocytogenes*, respectivamente. Sin embargo, determinaron que durante todo el período de muestreo, los productos crudos y cocidos finales analizados, el 91 y 8% resultaron positivas a *Listeria spp.*, mientras que el 59 y 0% contenían *L.*

monocytogenes, respectivamente. Aunque no se detectó *L. monocytogenes* en los productos cocidos, la presencia de *Listeria spp.* en la sala de procesamiento de los productos cárnicos analizados, destaca el riesgo de contaminación que existe durante el proceso e incluso en el procesamiento posterior de la carne.

En un experimento similar, Elmali *et al.* (2015) buscando aislar *Listeria spp.* y *Listeria monocytogenes* en carne de ala de pollo por medio de la PCR, mediante los genes *prs* y *hly*, determinaron que de un total de 120 muestras (60 piezas envasadas envueltas con película de estiramiento en placas de espuma de poliestireno y 60 piezas sin embalar), *Listeria spp.* fue aislada en 57 (47.5%) de las 120 muestras y por otro lado, 54 de los 57 aislamientos fueron identificados como *L. monocytogenes*.

Asimismo, Barrientos *et al.* (2015) buscando determinar la presencia de *Listeria monocytogenes* en canales porcinas, recolectaron muestras de 88 superficies de canales procedentes de un centro de beneficio y determinaron que el $13.9 \pm 6.1\%$ de las canales resultaron positivas a *L. monocytogenes*, debido a la deficiencia en la aplicación y control de las buenas prácticas de manufactura y operaciones sanitarias estándares en el centro de beneficio.

6.2.1. Incidencia de *Listeria monocytogenes* por periodo y tipo de carne.

La incidencia de la bacteria en el tipo de carne está relacionada con el tipo de manejo sanitario del establecimiento al manipular el producto fresco, tanto en los centros de sacrificio, transporte y en los puntos de venta al consumidor (Elmali *et al.*, 2015; Barrientos *et al.*, 2015).

En la Figura 12 se observa que en el P1, la carne de res registró mayor incidencia de *Listeria monocytogenes* con 70%, seguido de la carne de pollo (65%) y la carne de cerdo (60%). Para el P2, se observó un patrón de incidencia de la bacteria similar al P1, donde la carne de res presentó 70% de contaminación por *Listeria monocytogenes*, la carne de pollo con 60% y la carne de res 55%.

En el tercer periodo de muestreo (P3) la carne de pollo representa el mayor porcentaje de incidencia con 80%, seguida de la carne de res con 68% y 50% para la carne de cerdo. En

promedio para los tres periodos de muestreo se registró 68, 69 y 55% para la carne de pollo, res y cerdo, respectivamente.

La alta presencia del microorganismo en los diferentes muestreos llama la atención, ya que posiblemente esté relacionado con el tipo de establecimiento. En este estudio se analizaron dos puestos informales (tianguis), cuatro supermercados y 12 carnicerías, éstas últimas contienen el mayor número de muestras analizadas, por lo que los porcentajes de incidencia se relacionan con la cantidad de muestras por establecimiento.

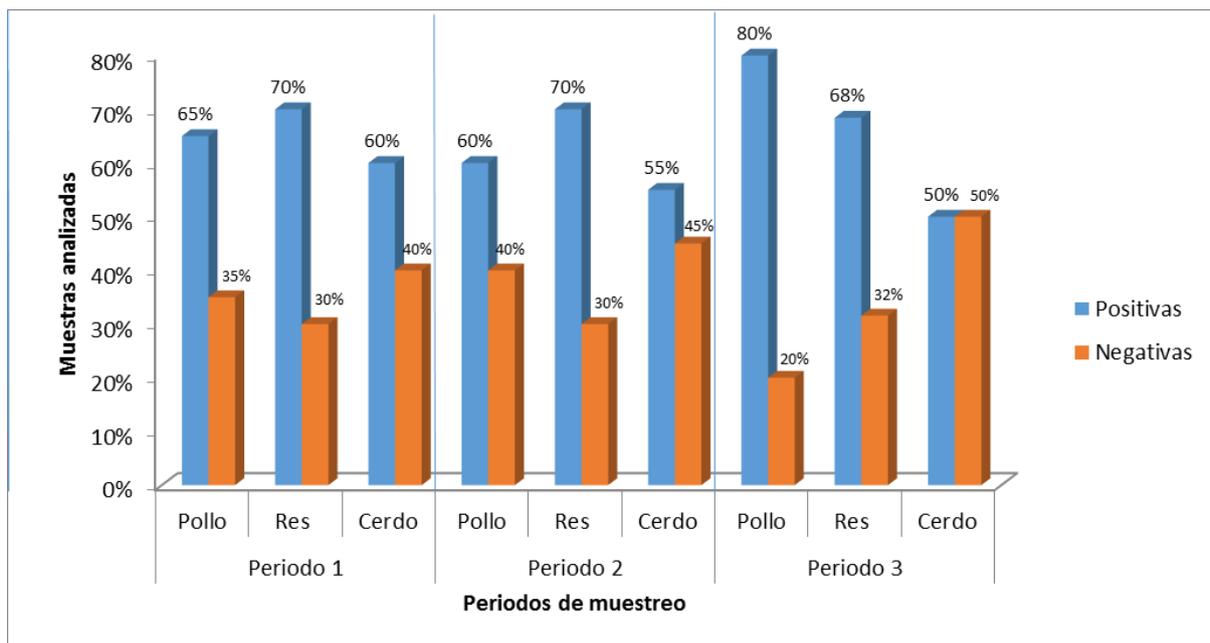


Figura 182. Incidencia de *Listeria monocytogenes* por periodo de muestreo y tipo de carne distribuidas en puntos de venta de la Ciudad de Texcoco.

Heredia *et al.* (2001) analizaron 81 muestras de carne molida provenientes de tiendas minoristas en el área metropolitana de Monterrey, México determinando que más del 75% de las muestras contenían arriba de 10^5 microorganismos mesófilos totales por gramo, y más del 40% tenían 10^6 coliformes totales por gramo. Los coliformes fecales estaban presentes en la mayoría de las muestras. Por otro lado, observaron que el 62% de las muestras tenían *Listeria spp.*, y *L. monocytogenes* en 16%, concluyendo que la calidad microbiológica de la carne molida analizada fue insatisfactoria y el producto podría ser una causa importante de intoxicación alimentaria. En contraste Tovar (2005) mencionan que *Listeria monocytogenes* se ha aislado de leche cruda en 45% de las muestras analizadas, en 19.5% de la carne de cerdo, en 60% de aves de corral, en 79% de carne molida de res.

González y Vázquez (2008) al analizar la presencia de *Listeria monocytogenes* en carnes de res cruda que se comercializa en supermercados, encontraron que, de seis supermercados analizados, cinco presentaron condiciones de almacenamiento y manipulación deficiente de los productos, ya que de los muestreos que realizaron se identificaron 57/126 equivalente a un 45% de las muestras totales analizadas, lo cual les dio pauta para determinar que no se están cumpliendo con los requisitos de inocuidad y calidad. Estos datos son similares a los reportados por Lozano *et al.* (2013) quienes estudiaron la presencia de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Yersinia enterocolitica* en carne de res, mexicana e importada, adquirida en supermercados en tres ciudades de México y encontraron 27.78% muestras positivas a *L. monocytogenes*, 8.89% a *Salmonella* y 28.89% a *Y. enterocolitica*, cuando se analizaron por PCR.

Foerster *et al.* (2012) al determinar la presencia de *Listeria monocytogenes* en heces de bovinos y humanos y carne molida, encontraron baja incidencia en heces de bovinos (0.4%) pero alta presencia en carne de res molida (37%), destacando que las cepas de carne molida (80%) mantenían alta similitud (> 95%) con una cepa aislada de heces humanas.

En lo que respecta a la incidencia en la carne de pollo, los valores encontrados en el experimento resultaron superiores a los reportados por Cruz *et al.* (2012), quienes determinaron la prevalencia de *Listeria sp.* y *Listeria monocytogenes* en muestras de pollo crudo congelado, utilizando el método microbiológico establecido en la norma NOM-143-SSA1-1995 y la técnica de PCR, determinando 17.1 y 1.4% de incidencia de *Listeria spp.* y *Listeria monocytogenes*, respectivamente, con la técnica de PCR. Los autores atribuyen esta baja prevalencia a las condiciones de manejo del producto y su preparación; sin embargo, no descartan la ausencia de bacterias viables con la capacidad de infectar al consumidor.

Valores más elevados fueron reportados por Aarnisaloa *et al.* (2008) en un trabajo donde se evaluó el faenado y procesamiento de pollo (piernas marinadas) en el cual encontró una incidencia de 34% de *Listeria monocytogenes* equivalente a 2 UFC g⁻¹, con un índice de confiabilidad (IC) de 95%. A pesar de la presencia del microorganismo en carne de pollo, los autores lo consideraron como bajo y el riesgo de contraer listeriosis insignificante. Estos datos son similares a los reportados por Elmali *et al.* (2015) donde encontraron *Listeria monocytogenes* en el 45% de alas de pollo.

Pérez *et al.* (2008) obtuvieron 43% de muestras positivas para *Listeria spp.* en un estudio en el cual analizaron canales de pollo obtenidas de una distribuidora en Bogotá, Colombia, y asociaron la presencia del organismo a las deficiencias en los sistemas de tecnología de limpieza de la planta de beneficio y/o contaminación con utensilios durante el despiece.

Seifi (2012) en un estudio donde determinaron la prevalencia y los factores de riesgo potenciales para la contaminación con *Listeria monocytogenes* en pollos de engorda Iraníes, encontraron 52 y 48% de prevalencia en la zona costera y en las zonas con pendientes, respectivamente, determinando que en las naves que utilizaban agua de fuentes privadas, el valor era mayor que en naves que usaban agua oficialmente aprobadas.

En lo que concierne a la incidencia de *L. monocytogenes* en carne de cerdo, Gamboa *et al.* (2011) determinaron la prevalencia de esta bacteria en canales de cerdo, cortes de carne y derivados (chorizo, salchicha y jamón) y obtuvieron 10% de aislamientos de *L. monocytogenes* en muestras de canales, 76% en carne de desposte, 5% en jamón, 3% en chorizo y 6% en salchicha, concluyendo que la prevalencia encontrada fue de 3.7 y 33.9% en carne en canal y cortes de carne, respectivamente, mientras que la prevalencia en los derivados fue chorizo 4.0%, jamón 6.13% y salchicha 7.69%.

Por otro lado, Yan *et al.* (2010), en un estudio donde analizaron un total de 2,177 muestras de alimentos para detectar la presencia de *Listeria monocytogenes*, encontraron que la contaminación con *L. monocytogenes* se presentó en 4.13% de las muestras que representaban diversos productos alimenticios. El patógeno se aisló principalmente de alimentos congelados elaborados a base de harina de trigo o productos de arroz (10.32%) y productos de carne cruda (6.28%). Dentro de la carne cruda analizada el 11% pertenecía a carne de cerdo fresca.

Según la Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria (2006), menciona que la prevalencia de *Listeria monocytogenes* en carnes difiere significativamente, en algunos estudios han citado tasas de prevalencia de hasta el 92% de los productos analizados. También han descrito que la presencia de esta bacteria en las canales se atribuye a su contaminación durante el desollado y que un número elevado de animales de abasto (11 a

52%) se consideran portadores sanos. Ellos atribuyen que la presencia de *Listeria* en los mataderos puede ser endémica, particularmente en efluentes y suelos.

6.2.2. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en carne de pollo, res y cerdo por tipo de establecimiento (tianguis, carnicerías y supermercados)

En la Figura 13 se presentan los resultados de la incidencia de *Listeria monocytogenes* en carne de pollo, res y cerdo por tipo de establecimiento (tianguis, carnicerías y supermercados) distribuidas en la Ciudad de Texcoco y se observa que la mayor cantidad de casos positivos detectados por medio de la técnica de PCR en el P1 fue en los tianguis 100%, 78% en carnicerías y en los supermercados el 8%. Para el P2 de muestreo la incidencia de esta bacteria en los tianguis fue de 100%, 70% en carnicerías y en los supermercados el 15%. Algo similar ocurre en el P3 en donde en los tianguis se encontró una incidencia de 86%, 78% en carnicerías y en los supermercados el 23%. En resumen, el 84.7% de las contaminaciones por *Listeria monocytogenes* provienen de tianguis y carnicerías y el 15.3% de supermercados.

Como se observa en la Figura 13, el comportamiento de los casos positivos para *Listeria monocytogenes* no varía tanto por el periodo de muestreo; sin embargo, se observa que los establecimientos como son las carnicerías y los puestos informales (tianguis) representan el mayor riesgo de contraer una enfermedad de tipo infecciosa derivado de las carencias en los procedimientos de higiene y sanitización de los establecimientos, entre otras causas no menos importantes. Cabe señalar que estos establecimientos se llevan a cabo la mayor venta de carne al consumidor y que lamentablemente no cumplen con lo establecido en las normas mexicanas.

Por otro lado, los supermercados de cadenas comerciales internacionales no quedan exentos de deficiencias en los procedimientos para el manejo de la carne; un claro ejemplo es la incidencia de *Listeria monocytogenes* presentes en las carnes analizadas, las cuales a pesar de estar obligadas a cumplir las normas mexicanas y en algunos casos, las normas internacionales.

Lozano *et al.* (2013) realizaron un estudio para detectar la presencia de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Yersinia enterocolitica* en carne de res mexicana e importada,

adquirida en supermercados, de tres ciudades de México. Los autores detectaron *Listeria monocytogenes* el 26.7% en carnes de origen nacional, en la Ciudad de México detectaron el 17.5% en carnes importadas y el 10% en carnes nacionales. Por otro lado, en Tabasco observaron que el 5% de las carnes importadas presentaban el microorganismo y el 25% de las carnes nacionales lo contenía.

En la Figura 14, se aprecian algunos procedimientos erróneos en la manipulación de la carne y que representan alto riesgo de infección para los consumidores.

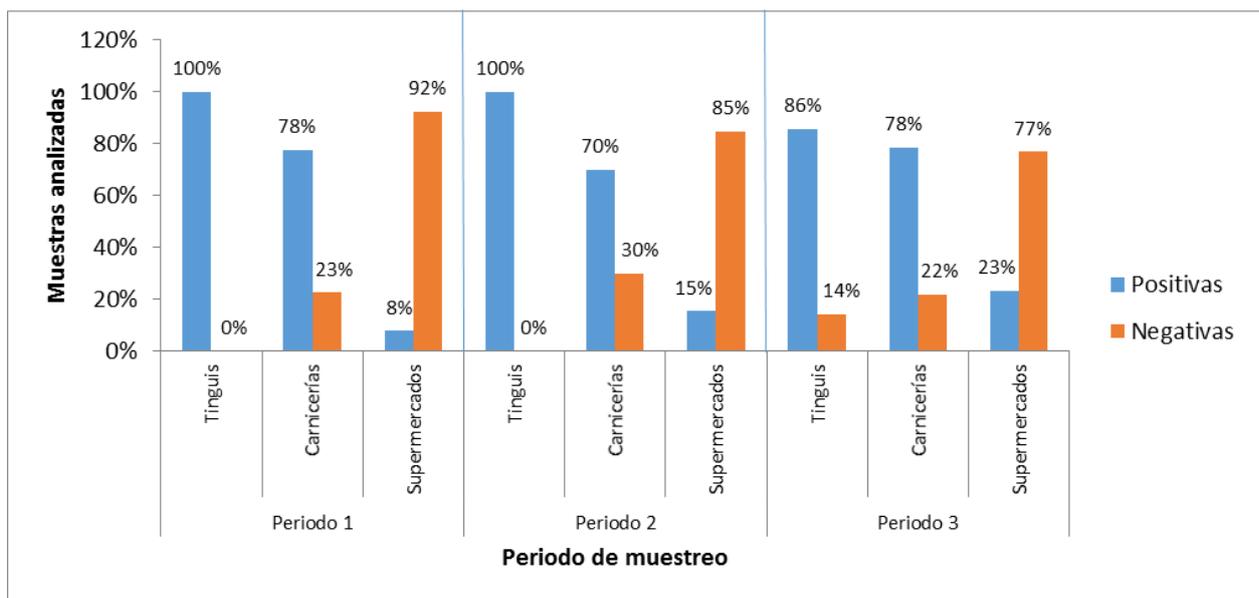


Figura 13. Presencia de *Listeria monocytogenes* en carne de pollo, res y cerdo por tipo de establecimiento distribuidas en la Ciudad de Texcoco.

Sánchez (2003) en un estudio obtuvo el 0.5% de incidencia de *Listeria monocytogenes* y 6% de *Listeria innocua* en producto terminado, mientras que en la materia prima, sólo el 3% para el patógeno *Listeria monocytogenes*. En las superficies vivas e inertes se detectó 3 y 36% de incidencia para *L. innocua*, respectivamente y la ausencia de *L. monocytogenes*. En agua potable y aire no se detectó ninguna de las dos especies, mientras que en agua residual se presentó un 100% de *L. innocua*.

La presencia de microorganismos patógenos en los sitios de proceso de la carne es crítica, al relacionarse con la higiene del establecimiento; así se estableció en el estudio realizado por Sanmarcos *et al.* (1997), donde detectaron la presencia de *Salmonella*, *Listeria* y *Yersinia* en ambientes, superficies de trabajo, equipo y manipuladores de mataderos, encontrando 11.1% en cuchillas, 6.25% en tablas de picar y 5.6% en pisos, para *Salmonella spp*; para

Yersinia enterocolitica se encontró 16.7% en pisos y 12.5% en tablas de corte; *L. monocytogenes* se detectó en un 13.3% en estropajos de pisos y 7.1% de recipientes para lavado de manos, además de otras especies de *Listeria* encontradas en estropajos de pisos y paredes y tablas de corte.

Maldonado *et al.* (2005) realizaron un estudio para observar la relación costo-beneficio de la implementación de dos tipos de controles de inocuidad y calidad alimentaria (HACCP e ISO 9000) en el cual evaluaron el grado de adopción de los controles antes mencionados en rastros TIF. Ellos encontraron que de los 39 mataderos analizados el 18% tenían el sistema HACCP, 57% estaban por implementarlo o tenían planes de hacerlo, mientras que el 25% restante manifestaron nulo interés en adoptarlo. Los mataderos que exportan y que también proveen a nichos del mercado nacional con mayor demanda en calidad, fueron los primeros que adoptaron la metodología HACCP.



Figura 194. Proceso y técnicas para el procesamiento de productos cárnicos empleados en carnicerías y tianguis de la Ciudad de Texcoco: a) Enjuague de pollos sacrificados, b) Despique de carne de res con restos de excretas, c) Utensilios, básculas, refrigeradores, paredes y empleados con mínimos requerimientos de higiene.

A pesar de la alta incidencia de *Listeria monocytogenes* en el trabajo realizado, las concentraciones de ADN extraído de las muestras analizadas van en un rango promedio de 103.4 a 132.4 ng μL^{-1} , y relacionándolos con el Cuadro 14, corresponde a un promedio de

2.09×10^{-3} UFC mL⁻¹, cantidad por debajo de la mínima requerida para ocasionar una infección en el ser humano (10^4 - 10^9 UFC g⁻¹; FVSA, 2006; Domínguez, 2010); sin embargo, como se ha discutido con anterioridad, las personas con mayor riesgo de contraer listeriosis son las mujeres embarazadas, ancianos, personas inmunocomprometidas y neonatos.

En el contexto de que todos estamos expuestos a contraer una ETA por cualquier causa o motivo, ya sea derivado de fuentes de contaminación potenciales como lo son los productos cárnicos y/o vegetales, o contagiarnos derivado de la mala manipulación de los cárnicos en el hogar, la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2014) publica las cinco claves para la inocuidad de los alimentos, las cuales consisten en:

- a) Mantenga la limpieza
 - Lávese las manos antes de preparar alimentos y a menudo durante la preparación
 - Lávese las manos después de ir al baño
 - Lave y desinfecte todas las superficies y equipos usados en la preparación de alimentos
- b) Proteja los alimentos y las áreas de cocina de insectos, mascotas y de otros animales (guarde los alimentos en recipientes cerrados)
 - Separe alimentos crudos y cocinados
 - Separe siempre los alimentos crudos de los cocinados y de los listos para comer
 - Use equipos y utensilios diferentes, como cuchillas o tablas de cortar, para manipular carne, pollo y pescado y otros alimentos crudos.
 - Conserve los alimentos en recipientes separados para evitar el contacto entre crudos y cocidos
- c) Cocine completamente
 - Cocine completamente los alimentos, especialmente carne, pollo, huevos y pescado
 - Hierva los alimentos como sopas y guisos para asegurarse que ellos alcanzaron 70 °C (158 °F). Para carnes rojas y pollos cuide que los jugos sean claros y no rosados. Se recomienda el uso de termómetros.
 - Recaliente completamente la comida cocinada
- d) Mantenga los alimentos a temperaturas seguras
 - No deje alimentos cocidos a temperatura ambiente por más de 2 horas
 - Refrigere lo más pronto posible los alimentos cocinados y los perecibles (preferiblemente bajo 5 °C (41 °F))

- Mantenga la comida caliente (arriba de los 60 °C (140 °F))
- No guarde comida mucho tiempo, aunque sea en la heladera. Los alimentos listos para comer para niños no deben ser guardados
- No descongele los alimentos a temperatura ambiente
- e) Use agua y materias primas seguras
 - Use agua tratada para que sea segura
 - Seleccione alimentos sanos y frescos
 - Para su inocuidad, elija alimentos ya procesados, tales como leche pasteurizada
 - Lave las frutas y las hortalizas, especialmente si se comen crudas
 - No utilice alimentos después de la fecha de vencimiento

VII. CONCLUSIONES

Con base a los objetivos de este trabajo se concluye lo siguiente:

La técnica de PCR desarrollada resultó más sensible que el método microbiológico establecido en la NOM-143-SSA1-1995 para la detección de *Listeria monocytogenes*, resultando 12.5, 8 y 10% más sensible en carne de pollo, res y cerdo, respectivamente, que el método convencional.

Por otro lado, los iniciadores Mar1-Mar2, PRSF-PRSR fueron específicos (E=1 y S=1), para la amplificación de los genes *iap* y *prs* de *Listeria monocytogenes* y *Listeria spp.* A pesar de los resultados obtenidos en el presente estudio, estas metodologías deben ser complementarias para poder dar un diagnóstico exacto y confiable de *Listeria monocytogenes*.

Las carnes con mayor incidencia de *Listeria monocytogenes*, en orden de importancia, fueron la de res, pollo y cerdo. El tipo de establecimiento influyó en la contaminación de los productos cárnicos, y fueron las carnicerías y los tianguis los que presentaron la mayor incidencia de este microorganismo.

,

VIII. LITERATURA CITADA

- Aarnisalaloa K., Vihavainen E., Rantalac L., Maijalad R., Maija-Liisa S., Hielmb S., Tuominend P., Rantad J., and Raaskaa L. 2008. Use of results of microbiological analyses for risk-based control of *Listeria monocytogenes* in marinated broiler legs. *International Journal of Food Microbiology* 121(3): 275–284.
- Aguilera P., A. M. 2005. Análisis de tablas de contingencia bidimensionales. Universidad de Granada. España. 37p.
- AINIA. 2014. Detección de microorganismos patógenos mediante PCR a Tiempo Real. <http://www.ainia.es/>
https://www.ainia.es/html/sites/09/pdf/deteccion_patogenos_pcr.pdf
- Akutsu I., R., C., R. Assunção B., E. I. Barbosa C., K. L. Oliveira S, and W. Coelho A. 2005. Adequacy of good manufacturing procedures in foodservice establishments. *Revista de Nutrição*. 18(3): 419-427.
- Allaert V., C., y M. Escolá R. 2002. Métodos de análisis microbiológicos de alimentos. Ediciones Díaz de Santos, 2002 - 272 p.
- Amagliani G., Giammarini C., Omiccioli E., Brandi G., and M. Magnani M. 2007. Detection of *Listeria monocytogenes* using a commercial PCR kit and different DNA extraction methods. *Food Control* 18:1137–1142.
- AMEG. 2015. <http://www.ameg.org.mx/estadisticas/boletin/>
- Ananou S., M. Maqueda, M. Martínez B., and Valdivia E. 2007. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology A. Ed. Méndez-Vilas. 476 p.
- Armendáriz I., y E. Barreiro Z. 2013. Detección de *Salmonella spp.* Mediante PCR en muestras de embutidos, cereales y superficies inertes. Tesis de Licenciatura. Escuela superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador. 121p
- Arredondo P., R. 1993. La reacción en cadena de la polimerasa, PCR: un impacto reciente en la biología molecular. *BEB. Boletín de educación bioquímica*. 12(1): 3-14.
- Autio T., S. Hielm, M. Miettinen, M. Jöberg A., Aarnisalalo K., and Björkroth J. 1999. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Appl Environ Microbiol* 65:150-155.

- Barrientos H., E., Lucas L., D. Ramos D., M. Rebatta T., and T. Arbaiza F. 2015. Presence of *Listeria monocytogenes* in pig carcasses in Lima, Peru. *Rev Inv Vet Perú*. 26(1): 135-139.
- Bover C., S., y M. Garriga T. 2014. Investigación sobre las condiciones que determinan el crecimiento y la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries. Barcelona, España. 79p.
- Bubert A., Hein I., Rauch M., Lehner A., Yoon B., and Goebel W. 1999. Detection and differentiation of *Listeria spp.* by a single reaction based on multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol*; 65 (10):4688-4692.
- Burbano E., M., K. Carrascal A., Mercado M., y Poutou R. 2011. Validación de PCR para *Listeria monocytogenes* en Leches. *Alimentos Hoy*. 10(10): 1-10.
- Callejo R., Prieto M., Martínez C., Aguerre L., Rocca F., y Martínez G. 2008. Manual de Procedimientos: Aislamiento, identificación y caracterización de *Listeria monocytogenes*. Servicio Bacteriología Especial, Departamento de Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. 39p.
- Canal D., N. 2011. Comparación de proporciones. *Revista SEDEN*. 11: 149-164.
- Candrian U. 1995. Polymerase chain reaction in food microbiology. *J. Microbiol. Metho*. 23: 89-95.
- Caravaca G., Villar C., Mosquera M., Corral E., Piñero B. y López E. 2000. Concordancia diagnóstica entre atención primaria y atención especializada al evaluar *nevus melanocíticos*. *SEMERGEN*. 26:428-431.
- Carlin F., Girardin H., Peck M., C. Stringer S., C. Barker G., Martínez A., Fernandez A., Fernandez P., M. Waites W., Movahedi S., van Leusden F., Nauta M., Moezelaar R., Del Torre M., and Litman S. 2000. Research on factors allowing a risk assessment of spore-forming pathogenic bacteria in cooked chilled foods containing vegetables: a FAIR collaborative Project. *International Journal of food microbiology* 60(2-3): 117-135.
- Castañeda R., G., C. Eslava C., Castro del C. N., J. León F., y Q. C. Cristóbal C. 2014. Listeriosis en México: importancia clínica y epidemiológica. *Salud Pública Mex*. 56:654-659.
- Castillo L. 2005. Elementos de muestreo de poblaciones. 3ra. Ed. Departamento de Parasitología Agrícola. Chapingo, Universidad Autónoma Chapingo, México. 267p

- CDC; Centro de Control y Prevención de Enfermedades. 2015. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública. Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Instituto Nacional de Salud. 69 p.
- Cervantes T., L., y A. Valencia C. 2008. Diseños de Planes de Alimentación para el Escolar y Buenas Prácticas de Higiene. Secretaria de Educación Pública. México D.F. 128p.
- Cocolin L., S., and Rantsiou K. 2016. Listeria: Detection. Reference Module in Food Science Encyclopedia of Food and Health. 556–560p.
- Codex alimentarius*. 2004. CAC/GL 61 – 2007. Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in foods. 28p.
<http://www.fao.org/docrep/005/y1579s/y1579s02.htm>
- Codex Alimentarius*. 2015. Código internacional recomendado de prácticas - principios generales de higiene de los alimentos.
- Cortés S., A., J., G. Aguilera M., and G. Castro E. 2015. Foodborne diseases, probiotics and health. Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences. Vol. 3 (Aceptado para su publicación).
- Cossart P., F. Vicente M., Mengaud J., Baquero F., J. C. Pérez D., and Berche P. 1989. Listeriolysin 0 Is Essential for Virulence of *Listeria Monocytogenes*: Direct Evidence Obtained by Gene Complementation. Infection and immunity. 57(11): 3629-3636.
- Cruz P., W., L., G. Rivera S. S. Ávila A., R. Cantú R., E. Garza G., G. Sierra J., S. Téllez L. y V. Bocanegra G. 2012. *Listeria sp.* y *Listeria monocytogenes* en pollo congelado: detección por NOM-143-SSA1-1995 y PCR de expendios comerciales de Matamoros y Reynosa, Tamaulipas, México. CienciaUat. 23(1): 41-47.
- De la Fuente S., N. y J. Barboza C. 2010. Inocuidad y bioconservación de alimentos. Universidad de Guanajuato; Acta Universitaria. 20 (1): 43-52.
- Díaz C., y de la Fuente I. 2006. Dificultades en la resolución de problemas que involucran el teorema de Bayes. Un estudio exploratorio en estudiantes españoles de Psicología. Educación matemática. 18 (2): 75-94.
- Díaz R., M., M. García G., J. Jiménez G., y A. Villanueva C. 2016. Inocuidad en alimentos tradicionales: el queso de Poro de Balancán como un caso de estudio. Estudios Sociales. 25(47): 89-111.
- Domínguez C., M. 2010. Listeriosis. Una zoonosis emergente de transmisión alimentaria. Monografía XXXI: Aspectos higiénicos de los alimentos microbiológicamente seguros. Real Academia Nacional de Farmacia. 38p.

- Doumith M., Buchrieser C., Glaser P., and M. Jacquet C. 2004. Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*. 42(8): 3819–3822.
- Elmali M., H. Can Y., and Hilmi Y. 2015. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in poultry meat *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 35(4): 672-675.
- Endrikat S., Gallagher D., Pouillot D., Quesenberry H., LaBarre D., and Schroeder C M. 2010. A comparative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in prepackaged versus retail-sliced deli meat. *Journal of Food Protection*. 73:612-619.
- Espaze E., P., Rocourt J., and L. Courtieu A. La Listeriósé en France en 1998. Etude à Partir des Souches Adressées au Centre National de Référence. *Bulletin Epidémiologie Hebdomaire*. 3: 9-10.
- Fach P., Perelle S., Dilasser F., Grout J., Dargaignaratz C., and Botella L. 2002. Detection by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay of *Clostridium botulinum* in fish and environmental samples from a coastal area in northern France. *Appl Environ Microbiol*. 68: 5870-5876.
- Fagundes M., J., Einsfeldt K., A. P. Guedes F., Costa M., and Frazzon J. 2008. Molecular analysis of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* isolated from cheeses in Rio Grande do Sul, Brazil. *Braz J Microbiol* 39(1): 169–172.
- FAO. 2003. Gestión de riesgos biológicos en la alimentación y la agricultura: Ámbito de aplicación e importancia. Consulta técnica sobre la gestión de riesgos biológicos en la alimentación y la agricultura. Bangkok, Tailandia, 13-17 de enero 2003. p. 3-5.
- FAO. 2009a. Análisis de riesgos relativos a la inocuidad de los alimentos. Guía para las autoridades nacionales de inocuidad de los alimentos. Roma. 129 p.
- FAO. 2009. Enfermedades Transmitidas por Alimentos y su impacto socioeconómico. Estudio de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua. Roma. 194p.
- FAO. 2015. Perspectivas alimentarias, resumen de mercado. Octubre 2015.
- FAO/OMS. 2003. Gestión de riesgos biológicos en la alimentación y la agricultura: Ámbito de aplicación e importancia. Consulta técnica sobre la gestión de riesgos biológicos en la alimentación y la agricultura. p. 3-5
- FAO-STAT. 2012. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- FDA. 2015. Las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos: lo que necesitan saber los consumidores. <http://www.fda.gov/Food/ResourcesForYou/Consumers/ucm250640.htm>

<http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/informational/en-espanol/hojasinformativas/enfermedades-por-alimentos/enfermedades-transmitidas-alimentos>
FDA. 2016. BAM: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*, capítulo 10.

<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071400.htm>

FSIS-USDA. 2016. Export Certification Checklist:

<http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/international-affairs/exporting-products/export-checklist>

<http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/international-affairs/exporting-products/export-library-requirements-by-country/Mexico>

Foerster C., Vidal L., Troncoso M., and Figueroa G. 2012. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from cattle and ground beef by pulsed-field gel electrophoresis. *Revista Argentina de Microbiología*. 44: 195-200.

FSAI. 2005. The control and management of *Listeria monocytogenes* contamination of food. Food Safety Authority of Ireland. 104p.

Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria (FVSA). 2006. *Listeria monocytogenes*. Ed. Elika. 28p.

Gamboa M., A., S. Buitrago M., K. Pérez P., M. Mercado R., R. Poutou P., and A. Carrascal C. 2011. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in pork-meat and other processed products from the Colombian swine industry. *Revista MVZ Córdoba*. 17(1): 2827-2833.

Gaucín D., M. Ramírez E., y F. J. Hernández V. 2014. El PIB agropecuario en 2013.

<http://eleconomista.com.mx/columnas/agro-negocios/2013/02/25/pib-agropecuario-2012>

Godfray H., C., J., R. Beddington J., R. Crute I., Haddad L., Lawrence D., F. Muir J., Pretty J., Robinson S., M. Thomas S., and Toulmin C. 2010. Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science*. 327: 812-818.

González F., T., y R. A. Rojas H. 2005. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud pública Méx.* 47(5): 388-390.

González H., V., S., y F. J. Vásquez DEL C. 2008. Identificación de *Listeria monocytogenes* en carne de res cruda comercializada en los principales supermercados del área metropolitana de San Salvador. Tesis de Licenciatura. San Salvador, el Salvador, Centro América. 116p.

- Hajmeer M., N. and A. Basheer I. 2003. A hybrid Bayesian–neural network approach for probabilistic modeling of bacterial growth/no-growth interface. *International Journal of Food Microbiology*. 82(3): 233-243.
- Heredia N., García S., Rojas G., Salazar L. 2001. Microbiological condition of ground meat retailed in Monterrey, Mexico. *J Food Prot*. 64:1249-1251.
- Hernández C., C., M. Aguilera A., y G. Castro E. 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enf Inf Microbiol*. 31 (4): 137-151.
- Hielm S., Björkroth J., Hyytiä E., and Korkeala H. 1998. Prevalence of *Clostridium botulinum* in finish trout farms: Pulsed-field gel electrophoresis typing reveals extensive genetic diversity among type E isolates. *Appl Environ Microbiol*. 64:4161-4167.
- INEGI.2014.
<http://www.inegi.org.mx/sistemas/BIE/CuadrosEstadisticos/GeneraCuadro.aspx?s=est&nc=597&c=25586>
- ISO 11290. 1996. Microbiología de los alimentos y alimento para animales - Método horizontal para la detección y recuento de *L. monocytogenes*. Parte 1: Método de detección. 1a. edición. 16p.
- Kelly G., L., L. Plata R. and Guerrero G. 2010. Bacteria prediction by means of bayesian nets in bahia de Banderas, Mexico. *e-Gnosis* 8(5): 1-27.
- Kopper G., Calderón G., Schneider S., Domínguez W., and Gutiérrez G. 2009. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico (Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua). INFORME TÉCNICO SOBRE INGENIERÍA AGRÍCOLA Y ALIMENTARIA. FAO. 187 p.
- Laguna Del E., P., G. M. Lledó I., R. Ríos G. y I. Pintos P. 2013. Meningitis por *Listeria monocytogenes* en adultos. *Rev Neurol*. 56: 8-13.
- Lawrence L., M., and Gilmour A. 1994. Incidence of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* in a Poultry Processing Environment and in Poultry Products and Their Rapid Confirmation by Multiplex PCR. *Applied and environmental Microbiology*. 60(12): 4600-4604.
- Li Y., and Mustapha A. 2004. Development of a polymerase chain reaction assay to detect enteric bacteria in ground beef. *Food Microbiol*. 21:369-375.
- Liu D. 2008. Handbook of *Listeria monocytogenes*. CRC Press. Taylor and Francis Group. Boca Raton, FL. 541p.

- Liu D. 2013. Molecular Approaches to the Identification of Pathogenic and Nonpathogenic *Listeriae*. *Microbiology Insights*. 6 59–69.
- López D., A., L., y C. Mejía G. 2012. Evaluación de métodos de extracción de ADN para detección de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos. *Revista MVZ Córdoba*. 17(3): 3169-3175.
- López G., y S. Fernández P. 2001. Medidas de concordancia: el índice Kappa. *Revista Epidemiología clínica y Bioestadística*. 6: 169:171.
- López P., J., J. J. García G., L. Fuente S., y S. E. de la Fuente S. 2007. Las redes bayesianas como herramientas de modelado en psicología. *Anales de Psicología*. 23(2): 307-316.
- López V., R., and A. Casp V. 2004. *Tecnología de mataderos*. Ed. Mundi-Prensa. España. 413p.
- Low J., C., Wright F., McLauchlin J., and Donachie W. 1993. Serotyping and Distribution of *Listeria* Isolates From Cases of Ovine Listeriosis. *Vet Rec*. 133: 165-166.
- Lozano R., M., J. Martínez B., R. Hernández C., C. Bonilla C., R. Méndez M., J. Núñez E., Echeverry A., and Brashears M. 2013. Detección de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Yersinia enterocolitica* en carne de res en puntos de venta en México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 4(1):107-115.
- Maldonado S., E., P. A. Martínez H., Henson S., A. Caswell J., J. A. Cadena M., y F. Copado B. 2005. Costos y beneficios asociados a la implementación de los controles de inocuidad y calidad alimentaria: HACCP e ISO 9000 en los mataderos mexicanos. *Revista Científica*. 15(4): 353-360.
- Malorny B., T. Tassios P., Radstrom P., Cook N., Wagner M., y Hoorfar J. 2003. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol*. 83:39- 48.
- Martino T., K., Leyva V., Puig Y., Machin M., Aportela N., and Ferrer Y. 2010. *Bacillus cereus* y su implicación en la inocuidad de los alimentos. Parte I. *Revista Cubana de Salud Pública*. 36(1): 128-138.
- Marzocca M., Marucci P., Sica M., y Álvarez E. 2004. Detección de *Listeria monocytogenes* en distintos productos alimenticios y en muestras de ambientes de una amplia cadena de supermercados de la ciudad de Bahía Blanca, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. 36: 179-181.
- Mehmet E., H. Can Y., and Hilmi Y. 2015. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in poultry meat. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 35(4): 672-675.

- Millemann Y., Gaubert S., Remy D., and Colmin C. 2000. Evaluation of IS200-PCR and comparison with other molecular markers to trace *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype *yphimurium* bovine isolates from farm meat. J Clin Microbiol. 38:2204-2209.
- Mouwen J. y Prieto M. 1998. Aplicación del sistema ARICPC-HACCP a la industria cárnica. Ciencia y Tecnología Alimentaria. 2(1):42-46.
- NOM-109-SSA1-1994, Bienes y servicios. Procedimientos para la toma; manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- NOM-143-SSA1-1995, Bienes y Servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*.
- NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos y toxinas microbianas.
- ODCE-FAO. 2014. Mercado de Ganados y Carnes Proyecciones 2023. Noviembre 2014.
- OIE. 2004. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (mamíferos, aves y abejas). <http://www.oie.int/doc/ged/D6509.PDF>
- OMS, 2016. http://www.who.int/topics/foodborne_diseases/es/
- OMS. 2014. Prevención de las enfermedades transmitidas por los alimentos: Las cinco claves para la inocuidad de los alimentos. Departamento de Inocuidad de los Alimentos, Zoonosis y Enfermedades de Transmisión Alimentaria. Folleto informativo.
- OPS/OMS.2015.
http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10837%3A2015-clasificacion-peligros&catid=7886%3Ahacpp-peligros-contenidos&Itemid=41450&lang=es
- Enrique J. Orihuel I., E., R., Bertó N., J., J., Canet G., y F., Lorenzo C. 2011. El control de *Listeria monocytogenes* persistente en industrias alimentarias. Seguridad e Higiene Alimentaria. Reporte técnico. 6p.
- Parrilla C., M., C. *et al.* 1993. Brotes de toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario. Salud Pública de México. 35(5): 456-463.
- Peña R., A., Torrescano E., A. Sánchez E., P. Camou J., y H. Gonzáles R. 2007. Rastros para ganado bovino. Capítulo 3. En Buenas Prácticas en la Producción de Alimentos. Gardea-Béjar, A., Gonzáles, G.A., Higuera-Ciapara, I., Cuamea-Navarro, F. (Editores). CIAD-TRILLAS, pp. 89-118.

- Pérez C., L., J. F. Núñez E., D. A. Villagómez Z., M. Nicoli T., y M. Rubio L. 2005. Inocuidad bacteriológica en camarón para exportación en México. *Veterinaria México*. 36(4): 411-423.
- Pérez R., C., M. Mercado R., y A. Carrascal C. 2008. Incidencia de *Listeria spp.* en carcasas de pollo congelado en un supermercado del nororiente de Bogotá. *Ciencias Biomédicas*. 6(10): 141-146.
- Pieri F., A., R. Mansur J., N. Nascentes G., L. A. Nero., and M. A. Scatamburlo M. 2010. Antimicrobial activity of autoclaved and non-autoclaved copaiba oil on *Listeria monocytogenes*. *Cienc. Rural*. 40(8): 1797-1801.
- Plaza I., L., y M. Morales R. 2015. Análisis Microbiológico en quesos frescos que se expenden en supermercados en la Ciudad de Guayaquil. Determinando la presencia o ausencia de *Listeria* y *Salmonella*. Tesis de Maestría. Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción-Ingeniería de Alimentos. Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL). Guayaquil, Ecuador. 236p.
- PORCIMEX. 2016. Boletín estadístico. <http://www.porcimex.org/estadisticas.htm>
- Poutou R., M., Burbano S., Sierra K., Torres A., Carrascal K. y Mercado M. 2005. Estandarización de la extracción de ADN y validación de la PCR múltiple para detectar *Listeria monocytogenes* en queso, leche, carne de res y pollo. *Universitas Scientiarum*. 10(2): 61-78.
- Ramírez M., L., G., Morón de Salim A., A. Y. Alfieri G., and Gamboa O. 2010. Detection of *Listeria monocytogenes* in white cheese by polymerase chain reaction (PCR). *Arch Latinoam Nutr*. 60(3):254-60.
- Rocourt J., Cossart P. 1997. *Listeria monocytogenes*. En: DOYLE, M., BEUCHAT, L. y MONTVILLE, T. (eds.). *Food Microbiology: fundamentals and frontiers*. Editorial American Society for Microbiology. Pp. 337-352.
- Rodríguez B., A., y R. Crespo M. 1999. Introducción a la estadística básica para enfermería nefrológica. *Revista de la Sociedad Española de Enfermería Nefrológica*. 7(1): 20-34.
- Rodríguez S., I., y H. Barrera S. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*. 7(3): 323-335.
- Rojas H., R., A., y T. González F. 2006. Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa *Bioquímica*, 31(2): 69-76.

- Rosas E., M. 2014. Estandarización y Validación de la técnica de PCR para el diagnóstico de *Salmonella thyphimurium* en carne de cerdo, res y pollo. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. Méx. 71p.
- Rosas G., A., y M. Acosta V. 2001. Manual de manejo higiénico de los alimentos. México, D.F.: Secretaría de Salud. 68p.
- Rosimina A., A., Min-Ju K., In-Sun J., Soo-Hwan S., and Keun-Sung K. 2016. Simultaneous detection of pathogenic *Listeria* including atypical *Listeria innocua* in vegetables by a quadruplex PCR method. *LWT - Food Science and Technology*. 69: 601–607.
- SAGARPA. 2016. Boletín: Crece consumo per cápita de carne de cerdo: Confederación de Porcicultores Mexicanos;
<http://sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2014B942.aspx>
- Sánchez V., F., J. 2003. Detección de *Listeria monocytogenes*, *Listeria spp.*, en puntos críticos establecidos en una planta procesadora de productos congelados para consumo rápido Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León, México. 60p.
- Sanmarcos M., L., Ripabellis G., Ruberto A., Lannitto G. and M. Grasso C. 1997. Prevalence of *Salmonellae*, *Listeriae* y *Yersinia* in the slaughterhouse environment and work surfaces, equipment and workers. *J. Food Prot.* 60: 367- 371.
- SAS. 2008. SAS/STAT 9.2. User's Guide. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA, 104 p.
- Scheu P., Berghof K., and Stahl U. 2009. Detection of pathogenic and spoilage microorganisms in food with the polymerase chain reaction. *Food Microbiol.* 15:13-31.
- Schöbitz R., Ciampi L., and Nahuelquin Y. 2009. *Listeria monocytogenes*: un peligro latente para la industria alimentaria. *Agro Sur* 37(1): 1-8.
- Schuchat A., Swaminathan B. and V. Broome C. 1991. Epidemiology of Human Listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 4(2):169-183.
- Seeliger H., P., R., and Jones D. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Sneath P H A, Mair N S, Sharpe M E, Holt J G. Baltimore, Williams and Wilkins. 2: 1235-1245.
- Seifi S. 2012. Prevalence and risk factors for *Listeria monocytogenes* contamination in Iranian broiler flocks. *Acta Scientiae Veterinariae*. 40(4): 1-6
- SFA-SAGARPA. 2011. Perspectivas de largo plazo para el sector agropecuario de México. 51p.
- SIAP-SAGARPA. 2015. <http://www.siap.gob.mx/ganaderia-resumen-municipal-pecuario/>
- SIAP-SAGARPA.2014. <http://www.siap.gob.mx/resumen-nacional-pecuario/>

- SINAVE. 2014. Boletín: ¿Qué es la intoxicación alimentaria bacteriana?. Vigilancia Epidemiológica. Número 14 | Volumen 31 | Semana 14 | Del 30 de marzo al 5 de abril del 2014. 68p.
- SINAVE. 2015. Boletín Epidemiológico. Número 24 | Volumen 32 | Semana 24| Del 14 de junio al 20 de junio de 2015. 64p.
- SINAVE. 2016. Boletín Epidemiológico. Número 44 | Volumen 33 | Semana 24| Del 12 de junio al 18 de junio de 2016. 68p.
- SSA. 2015. <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2015/sem14.pdf>
- Swaminathan B., Cabanes D., Zhang W., and Cossart P. 2007. *Listeria monocytogenes*. In M. P. Doyle & L. R. Beuchat (Eds.), Food microbiology: fundamentals and frontiers (chap. 3, pp. 457-491). Washington: ASM Press.
- Taeymans, D.1995. New technologies for ensuring the quality, safety and availability of food. Rev Alimen, Nutrc y Agricult. (15): 24-31.
- Tafur G., Mc A. 2009. La inocuidad de alimentos y el comercio internacional. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 22(3): 330-338.
- Tamay D., L., Ibarra C. y Velasquillo C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Tecnología en salud. 2(2): 70-82.
- Thimothe J., K. Nightingale K., Gall K., N. Scott V., and Wiedmann M. 2004. Tracking of *Listeria monocytogenes* in Smoked Fish Processing Plants. Journal of Food Protection. 67(2):328-341.
- Torres K., P. Sierra R., Carrascal A., y Mercado M. 2005. Patogenesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonotico emergente. Revista MVZ Córdoba 10(1): 511-543.
- Tovar P., G., I., I. Castillo R., E. I. Quiñónez R., O. R. Rodas S., y C. Vázquez S. 2005. Listeria. Una aproximación práctica al microorganismo. Revista Digital Universitaria. 6(4): 1-8.
- UNA. 2015. Boletín: Crecerá 2.5% la avicultura mexicana en 2015; <http://www.una.org.mx/index.php/panorama/crecera-2-5-la-avicultura-mexicana-en-2015>.
- USDA. 1999. Modelo HACCP general para el sacrificio de aves. Food Safety and Inspection Service (FSIS). Washington, D.C. Revisión 1. 49p.

- Villegas M. 2010. Caracterización molecular de cepas clínicas de *Listeria monocytogenes* aisladas en el Hospital Madre Niño San Bartolomé de Lima durante el período 2001-2005. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 92p.
- Wuenschel M., D., Köhler S., Bubert A., Gerike U., and Goebel W. 1993. The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity. J Bacteriol. 175(11): 3491-501.
- Yan H., B. Neogi S., Mo Z., Guan W., Shen Z., and Zhang S. 2010. Prevalence and characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes* isolates in Hebei province of Northern China, 2005-2007. Int J Food Microbiol. 144: 310-316.