

**Efecto de la intervención múltiple en la
sobrevivencia de *Escherichia coli* productora
de toxina Shiga en carne molida de res**

Johana Khaterine Torres Yaselga

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2013

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Efecto de la intervención múltiple en la
sobrevivencia de *Escherichia coli* productora
de toxina Shiga en carne molida de res**

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Johana Khaterine Torres Yaselga

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2013

Efecto de la intervención múltiple en la sobrevivencia de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en carne molida de res

Presentado por:

Johana Khaterine Torres Yaselga

Aprobado:

Mayra Márquez, Ph.D.
Asesora Principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Departamento de Agroindustria
Alimentaria

Adela Acosta, Dra. C.T.A
Asesora

Raúl Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Efecto de la intervención múltiple en la sobrevivencia de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga en carne molida de res

Johana Khaterine Torres Yaselga

Resumen: En las últimas décadas los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos asociados al consumo de productos cárnicos se atribuyen a que contienen *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC). Se evaluó la eficiencia de la intervención múltiple en la reducción de STEC inoculada en recortes de carne utilizados para la producción de carne molida. La carne se inoculó por inmersión con una mezcla de seis cepas de STEC. Se evaluaron cuatro tratamientos: agua; solución de ácido láctico al 4.5% (AL); cultivo de bacterias ácido lácticas *Lactobacillus acidophilus* NP51 (BAL) y la combinación de ácido láctico y bacterias ácido lácticas (AL+BAL). Los tratamientos se aplicaron por inmersión durante 10 segundos. En la combinación pasó 5 segundos en AL y 5 segundos en BAL. Los trozos de carne inoculada fueron triturados, empacados al vacío y refrigerados a 4 ± 1 °C en tres porciones diferentes para evaluar a los 0, 3, 5 días. Se diluyó en serie en caldo tripticasa soya suplementado con novobiocina y se sembró en agar MacConkey a 37 °C durante 24 horas. El estudio se repitió tres veces. El factor tiempo de almacenamiento no resultó ser un factor importante en la supervivencia ($P = 0.1632$), mientras que entre los tratamientos sí hubo diferencia significativa. Los más eficientes fueron AL+BAL con una sobrevivencia media de $3.178 \pm 0.204 \log_{10}\text{UFC/g}$ y AL con $3.360 \pm 0.152 \log_{10}\text{UFC/g}$. Se determinó que AL+BAL tiene una alta eficacia en la reducción de STEC. Se recomienda validar las características físicas de los mejores tratamientos.

Palabras clave: ácido láctico, antimicrobianos, bacterias ácido lácticas, STEC.

Abstract: In recent decades, outbreaks of foodborne illness associated with the consumption of meat products containing Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC). Evaluations were made on the reducing of multiple intervention efficiency of STEC, inoculated on meat trimmings used for ground meat production. The meat was inoculated by immersion with a mixture of six STEC strains. Four treatments were evaluated: water, lactic acid solution at 4.5% (LA), lactic acid bacteria *Lactobacillus acidophilus* NP51 (LAB) and the combination of lactic acid and lactic acid bacteria (LA + LAB). All treatments were immersed equally for ten seconds. In the combination treatments spent five seconds in AL and five seconds in BAL. The inoculated meat pieces were grinded, vacuum packed and refrigerated at 4 ± 1 °C in three different portions for evaluating at 0, 3, 5 days. Decimal dilutions of samples were prepared in trypticase soy broth supplemented broth with novobiocin and plated on MacConkey agar at 37 °C for 24 hours. The study was repeated three times. The storage time factor was not an important factor in survival ($P = 0.1632$), while among the treatments a significant difference existed. The most efficient were LA + LAB with an average survival of $3.178 \pm 0.204 \log_{10}\text{CFU/g}$ and LA with $3.360 \pm 0.152 \log_{10}\text{CFU/g}$. It was found that LA + LAB has high efficacy in reducing STEC. It is recommended to validate the physical characteristics of the best treatments.

Keywords: antimicrobial, lactic acid, lactic acid bacteria, STEC.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	v
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
4 CONCLUSIONES.....	13
5 RECOMENDACIONES.....	14
6 LITERATURA CITADA	15

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Distribución de los tratamientos experimentales.....	5
2. Supervivencia de <i>E. coli</i> productora de toxina Shiga en carne molida almacenada a 4 °C y al vacío después de aplicar los tratamientos con agua, ácido láctico (AL), bacterias ácido lácticas (BAL) y combinación de AL+BAL en recortes de carne con una carga inicial de $5.773 \pm 0.003 \log_{10}\text{UFC/g}$	10

Figuras	Página
1. Diagrama de flujo del análisis.....	8

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son las que causan la mayoría de trastornos en el tracto intestinal, con dolores abdominales, diarrea y vómito generalmente. Estas son provocadas por la ingestión de alimentos o agua que contienen considerables cantidades de agentes patógenos. Los más frecuentes son bacterias, virus o sus toxinas. Además se producen por productos tóxicos, químicos y físicos, las mismas que se generan por el crecimiento o duplicación de estas (Bravo Martínez 2004).

Las ETA pueden provocar infección, intoxicación o toxiinfección. La infección se produce por la ingesta de alimentos contaminados con microorganismos patógenos vivos, que una vez consumidos se siguen desarrollando dentro del organismo. La intoxicación se produce por el consumo de alimentos que contienen sustancias tóxicas como veneno o toxinas, producidas por las bacterias que se han reproducido en él antes de su consumo (García Ortiz *et al.* 2011). Mientras que la toxiinfección se produce por el consumo de alimentos que contiene gran cantidad de microorganismos, que luego de ser ingeridas, producen toxinas dentro del organismo (Bravo Martínez 2004).

Estas enfermedades pueden atacar a una persona, uno o más miembros de la familia, o a un gran número de personas provocando brotes de toxiinfección. Un brote es la aparición de varios casos de la misma enfermedad producidos por el mismo alimento. Esto implica que un alimento llegue a un número importante de personas y que contiene una considerable cantidad de agentes patógenos. Una situación de estas provoca alarma y es un parámetro para detectar que en algún lugar determinado hay uno o varios problemas relacionados con la alimentación (Riesco Rodríguez 2011).

En el siglo XXI las ETA todavía siguen constituyendo uno de los principales retos de la Salud Pública. En Estados Unidos de América se estima que solo el costo anual de todas las ETA es de 5 a 6 millones de dólares (Rivas *et al.* 2008). Los factores que producen ETA se dividen en tres categorías: primero el abuso del tiempo de exposición y mal manejo de temperatura, la contaminación cruzada es uno de los factores más comunes y por otra parte la equivocada manipulación de alimentos y mal lavado de equipo (Bravo Martínez 2004).

Entre las bacterias más estudiadas causantes de las ETA son: *Salmonella enteritidis* en huevos, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 en carnes y vegetales, *Listeria monocytogenes* en carne, quesos y productos listos para el consumo, *Campylobacter jejuni* y *Yersinia enterocolítica* en carne de cerdo y aves, *Shigella dysenteriae* en agua y *Enterobacter sakazakii* en productos lácteos deshidratados (Cervantes Turribiales *et al.* 2008).

Otras de las bacterias causantes de las ETA son *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC) las mismas que se encuentran en la carne de ganado vacuno. En general la prevalencia de estas bacterias se encuentra en carne molida, salchichas, cortes comerciales no especificados y en canales. La contaminación en la canal generalmente se da en la extracción de piel y tracto gastrointestinal en las plantas empacadoras de carne. La presencia de estas bacterias también se causa por los procedimientos pre y post cosecha de ganado vacuno y canales respectivamente (Hussein y Bollinger 2005).

Estas bacterias sobreviven a temperaturas de refrigeración y congelación. La dosis infecciosa actual es desconocida, la mayor parte de investigaciones indican que se necesita una pequeña cantidad de *E. coli* para producir una enfermedad grave y hasta la muerte (USDA 2013). En consecuencia a esto se tomaron varias acciones como la modificación de la legislación de Estados Unidos. Se modificó la temperatura de cocción de las hamburguesas, ya que la utilizada era insuficiente para destruir esta bacteria. Además se creó el sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos (HACCP) en la industria cárnica tanto dentro del país como los que exportan hacia él (Michanie 2003).

Escherichia coli es probablemente el organismo procariota más estudiado por el ser humano. Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* una bacteria encontrada mayormente en el intestino del hombre y de animales de sangre caliente. Fue detallada la primera vez por Theodore von Escherich, bacteriólogo alemán en 1885. Es un bacilo corto Gram-negativo (negativo a la tinción Gram), catalasa-positivo, oxidasa negativo y anaerobio facultativo. Gran parte de las cepas fermentan lactosa y glucosa, otras tienen fermentación lenta de este azúcar mientras que otras son anaerogénicas. Su motilidad es por medio de flagelos que rodean su cuerpo. Por su alta especificidad es considerado como un buen indicador de contaminación fecal (Romero Cabello 2007).

Las cepas de *E. coli* se diferencian serológicamente de acuerdo a sus antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K). Los antígenos somáticos no se distinguen en la fracción antigénica de la endotoxina, se encuentran en la pared celular formando un complejo polisacárido. Se conocen 153 antígenos O conocidos internacionalmente, estos son termo estables soportan una temperatura de 100 a 121 °C, al momento de serotipificar es el primer grupo que se debe nombrar. Internacionalmente se conocen 51 grupos de antígenos flagelares de H1 a H53, la mayoría son de naturaleza proteica, termolábiles y no todas las cepas de *E. coli* las poseen. Se conocen 91 antígenos capsulares de K1 a K91 son termolábiles se encuentran rodeando a la célula formando una cápsula (Figueroa *et al.* 1984).

Los mecanismos patogénicos de la *E. coli* son: enterotoxigénica, enteropatógena, enterohemorrágica, enteroinvasiva. *E. coli* enterotoxigénico (ETEC) produce la llamada diarrea del viajero es acuosa con poca fiebre. Ataca principalmente la porción proximal del intestino delgado de niños y adultos. *E. coli* enteropatógena (EPEC) es responsable de la diarrea infantil es acuosa o con sangre, ataca las microvellosidades de todo el intestino, los alimentos más asociados con estos patógenos son la carne cruda y el pollo. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) produce una enfermedad llamada disentería bacilar, están relacionadas con *Shigella spp*, atacan las células epiteliales del intestino produciendo esta enfermedad (Sánchez Rodríguez *et al.* 2011, Pascual Anderson *et al.* 2000 y FDA 2013).

E. coli enterohemorrágica (EHEC) produce diarrea sanguinolenta, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico (SUH). Estos microorganismos se han convertido en un problema en la inocuidad alimentaria. Durante las últimas décadas debido al gran número de brotes notificados y casos esporádicos de infección se atribuyó a consumo de carne de res molida mal cocida y otros productos como carne de res asada o ahumada, salchichas, y productos fermentados como el salami. Este grupo producen altas cantidades de una o más grandes toxinas que atacan al recubrimiento del intestino aquí se encuentran la *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) (Sánchez Rodríguez *et al.* 2011, Pascual Anderson *et al.* 2000, FDA 2013 y Hussein y Bollinger 2005).

La infección por STEC fue reconocida por primera vez, en Michigan y Oregon. Se originó un brote de colitis hemorrágica ocasionado por el consumo de hamburguesas de la cadena “Jack in the box”, la misma que correspondió al serotipo O157:H7. Desde entonces este serotipo ha sido asociado a numerosos brotes de enfermedades en diferentes partes del mundo. Este brote produjo 700 enfermos, 4 muertos y tuvo un costo de 110 millones de dólares (Gómez *et al.* 2000).

Además de la carne de res, existen otras vías de infección de STEC como en las verduras, productos lácteos (yogurt, queso semicrudo y leche cruda), mayonesa, jugos de fruta no pasteurizados, brotes de alfalfa agua potable contaminada, contacto de persona a persona y de animales a personas por el contacto con la materia fecal (Hussein y Bollinger 2005 y Margall *et al.* 1997). Dentro de los parámetros que tolera *E. coli* para su el desarrollo y crecimiento son pH: mínimo 4.4, óptimo de 6 a 7 y máximo 9.0; temperatura: mínima de 7 a 8 °C, óptima 35 a 40 °C y máxima de 44 a 46 °C y actividad de agua: mínima de 0.95, óptima de 0.995 (Michanie 2003).

La nueva norma regulatoria para control de productos cárnicos en Estados Unidos define a las STEC como las *E. coli* que presentan una combinación del serogrupo O y los genes que definen la patogenicidad de la *E. coli* enterohemorrágicas. Han sido identificados más de 50 tipos de *E. coli* enterohemorrágicas relacionadas con enfermedades en humanos, pero hay 7 que son los principales causantes de los diferentes brotes estas son: O26, O45, O111, O103, O145, O121, O157 (Da Costa 2011).

Es por esto que la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) ha recomendado el tratamiento térmico para asegurar la eliminación de STEC de los alimentos, como la pasteurización de la leche a (72 °C durante 16.2 s) y en los alimentos cárnicos principalmente en la hamburguesas a 68.3 °C determinándolo como un punto crítico de control. (Rivas *et al.* 2008). El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) indica que las bacterias mueren con una cuidadosa cocción es por esto que recomiendan asegurarse que la temperatura interna de la carne molida se mantenga a 160 °F (71.1 °C) (USDA 2013).

Los factores que se pueden tomar en cuenta para inhibir el crecimiento microbiano en la mayoría de los productos cárnicos se dividen en alta y baja intensidad. Dentro de los de alta intensidad se encuentran disminución de agua disponible (actividad acuosa) y adición de antimicrobianos (nitritos, nitratos, humo y CO₂). Entre los factores de baja intensidad

se encuentran la temperatura de almacenamiento, aumento del contenido de iones H⁺ (pH), menor suministro de oxígeno (potencial redox), presencia de microflora competitiva (bacterias ácido lácticas) (García Garibay *et al.* 2004). Estudios recientes se encuentran evaluando la efectividad de estos sistemas intervención para mejorar la inocuidad de la carne de ganado vacuno. La mayoría de intervenciones microbianas se han centrado en canales y cueros de res.

La inhibición consiste en impedir el crecimiento de los microorganismos que se encuentran presentes en la mayoría de alimentos, apartando los diferentes factores que intervienen en el desarrollo óptimo para su crecimiento. Los métodos combinados consisten en la combinación de barreras o técnicas, las mismas que resultan ineficientes por separado para proteger el alimento mientras que en conjunto pueden lograr impedir el desarrollo de los microorganismos (Calleja *et al.* 2010).

Para lograr una estabilidad o reducción microbiana en los alimentos se basa en la combinación de diversos factores de conservación, que los microorganismos son incapaces de vencer. Este efecto obstáculo fue introducido por primera vez por Leistner (1992). El efecto tiene una alta importancia en la conservación de alimentos, en el control de las alteraciones microbianas e intoxicaciones alimentarias. Leistner (1992) muestra que el concepto obstáculo indica las interacciones con temperatura, actividad de agua, pH, potencial redox, etc., las mismas que son de vital importancia en para la estabilidad microbiana de los alimentos (Calleja *et al.* 2010).

El rociado con soluciones de ácido láctico en las canales es un tratamiento de descontaminación ampliamente utilizado en plantas empacadoras de carne de ganado vacuno en América del Norte (Youssef *et al.* 2013). En los recortes de carne aún no existe una implementación comercial con estas soluciones. Sin embargo, se están evaluando una serie de posibles intervenciones entre los tratamientos más utilizados incluyen diversas combinaciones como múltiples lavados con agua, ácido láctico, ácido peracético a diferentes temperaturas, aerosoles de agua caliente (65 y 82 °C) y aire caliente (510 °C). (Koochmaraie *et al.* 2005)

Existen otros factores que pueden inhibir el crecimiento de *E. coli* como la intervención de bacterias ácido lácticas en carne de ganado vacuno (generalmente en carne molida). La mayoría de estos cultivos son concentrados congelados. Varios estudios combinan las bacterias ácido lácticas con empacados al vacío y con temperaturas de refrigeración indicando que pueden ser intervenciones importantes para el control de patógenos transmitidos por los alimentos (Smith *et al.* 2005).

Los objetivos de este estudio fueron:

- Determinar la eficacia de la intervención múltiple (biológica y química) en la reducción de la STEC no-O157 inoculados artificialmente en recortes de carne utilizados para la producción de carne molida
- Identificar si el tiempo de almacenamiento es un factor influyente en la reducción de *E. coli* productora de toxina Shiga.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo entre marzo y abril de 2013 en los Laboratorios de Inocuidad Alimentaria del International Center for Food Industry Excellence (ICFIE) en el campus de “Texas Tech University” (Lubbock, TX, EE.UU.)

Se utilizaron suministros de laboratorio tales como equipo de protección personal (bata, guantes, gafas de seguridad, protectores faciales, etc.), balanzas, cristalería, vortex, toallas de papel, incubadoras, autoclaves, campanas de seguridad, contadores de colonias, picador de alimentos, sellador al vacío, frigorífico, vitrina.

Tratamientos. Todas las muestras fueron asignadas al azar a los tratamientos y se comparó a los tratamientos de acuerdo a la sobrevivencia obtenida, el agua actuó como control del experimento.

Diseño experimental. Se usó bloques completos al azar (BCA) evaluándose cuatro tratamientos con tres repeticiones y tres medidas repetidas en el tiempo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Distribución de los tratamientos experimentales.

Tratamiento	Días de evaluación		
	0	3	5
Ácido Láctico	√	√	√
Cultivo de Bacterias Ácido Lácticas	√	√	√
Combinación de Ácido Láctico y Cultivo de Bacterias Ácido Lácticas	√	√	√
Control (agua)	√	√	√

Los pasos generales del procedimiento experimental fueron los siguientes y se resumen en la Figura 1.

Preparación del inóculo. Las seis cepas utilizadas fueron *E. coli* productora de toxina Shiga O26, O45, O103, O111, O145, O121 de origen bovino, estas se encontraban previamente aisladas en Caldo Trypticase Soya (TSB) con diez por ciento de glicerol, perteneciente a la colección del laboratorio, esta se encuentra en congelación a -80 °C.

Se tomaron con un asa el equivalente a diez microlitros de cada una de las seis cepas. Cada una de las cepas se colocó por separado en seis tubos de nueve mililitros de TSB

suplementada con novobiocina (8mg/mL). Los tubos fueron incubados a 37 ± 2 °C durante 18-24 horas, se tomaron 167 μ L de cada uno de los seis tubos para un total de 1000 μ L y se diluyó en 999 ml de Buffered Peptone Water (BPW), fueron preparados dos litros de cultivo.

Fueron adquiridos de un supermercado local los recortes de carne de lotes diferentes, eran cubos de 4 a 5 cm por lado aproximadamente. Los recortes fueron inoculados en los dos litros de cóctel de STEC no-O157 mediante inmersión durante 10 segundos. Se dividió en cinco porciones iguales para cada tratamiento las mismas que pesaron aproximadamente 200 g esperando tener una concentración entre $5 \log_{10}$ UFC/g y $6 \log_{10}$ UFC/g.

Para reforzar la eficiencia de adhesión de las bacterias y evitar contaminación se llevó a la cámara de flujo laminar durante 20 minutos en una tabla plana con medidas de 20×25 cm, cubierta con papel aluminio. Se tomó una porción de la carne inoculada y fue molida con un picador de alimentos doméstico, el cual fue desinfectado con Lysol®.

Se tomó un gramo de la porción de carne inoculada y se diluyó en nueve mililitros de caldo tripticasa soya suplementado con novobiocina (mTSB + n) por diluciones en serie y se sembró en placas igualmente en serie en agar MacConkey por duplicado. Estas fueron incubadas a 37 ± 2 °C durante 18-24 horas y contadas las colonias en UFC/ml y se convirtieron en \log_{10} UFC/g.

Preparación de los tratamientos. Fueron previamente esterilizados cuatro recipientes metálicos.

Agua (control). Se colocaron dos litros de agua destilada en un recipiente con probetas esterilizadas y fueron cubiertos con papel aluminio hasta el momento de la inmersión de la carne.

Ácido Láctico (AL). Alícuotas de 100 ml de ácido láctico al 85% fueron puestos en 1900 ml de agua destilada obteniendo una concentración de 4.5%. Se cubrió el recipiente con papel aluminio hasta el momento de la inmersión de la carne.

Cultivo de Bacterias Ácido Lácticas (BAL). Se pesó un gramo de bacterias ácido lácticas NP51 (*Lactobacillus acidophilus*) por cada 1000 ml de BPW. Se prepararon dos litros de cultivo de bacterias ácido lácticas y se incubaron a 37 ± 2 °C durante 18 horas. Se vertió en el recipiente metálico y se cubrió con papel aluminio hasta el momento de la inmersión de la carne.

Aplicación de tratamientos. Se aplicó la intervención antimicrobiana a temperatura ambiente (25 °C) a cada porción de recortes de carne en cada tratamiento (AL, BAL, AL+BAL, y el control agua) mediante inmersión durante 10 segundos. En el caso de AL+BAL se puso 5 segundos en BAL e inmediatamente 5 segundos en la dilución de AL. Para reforzar la eficiencia del tratamiento y evitar contaminación se llevó a la cámara de flujo laminar durante 20 minutos en una tabla plana con medidas de 20×25 cm, cubierta con papel aluminio.

Los recortes de carne de cada porción fueron molidos con un picador de alimentos doméstico, diferente para cada tratamiento para evitar posible contaminación, los mismos que fueron desinfectados con Lysol. Se dividió en tres porciones de 67 g aproximadamente para cero, tres y cinco días. Fueron sellados con una empacadora al vacío doméstica durante 20 s. Se colocó las muestras en refrigeración directa a 4 ± 1 °C en un exhibidor de carnes por cero, tres, y cinco días.

Diluciones y siembras. Se diluyó un gramo de carne molida en nueve mililitros de caldo tripticasa soya suplementado con novobiocina (mTSB + n) por diluciones en serie y se sembró en placas igualmente en serie en agar MacConkey por duplicado. Fueron incubadas a 37 ± 2 °C durante 18-24 horas y contadas las colonias en UFC/ml y se convirtió en \log_{10} UFC/g.

Análisis estadístico. Se realizó un ANDEVA, con procedimiento lineal general (GLM) para evaluar la significancia del modelo, la interacción entre tratamiento y tiempo para evaluar la influencia del tiempo y se usó una prueba Tukey para definir el mejor tratamiento con un nivel de significancia de 95%. Los datos se analizaron usando el Programa Estadístico SAS[®] 9.3 Statistical Analysis System.

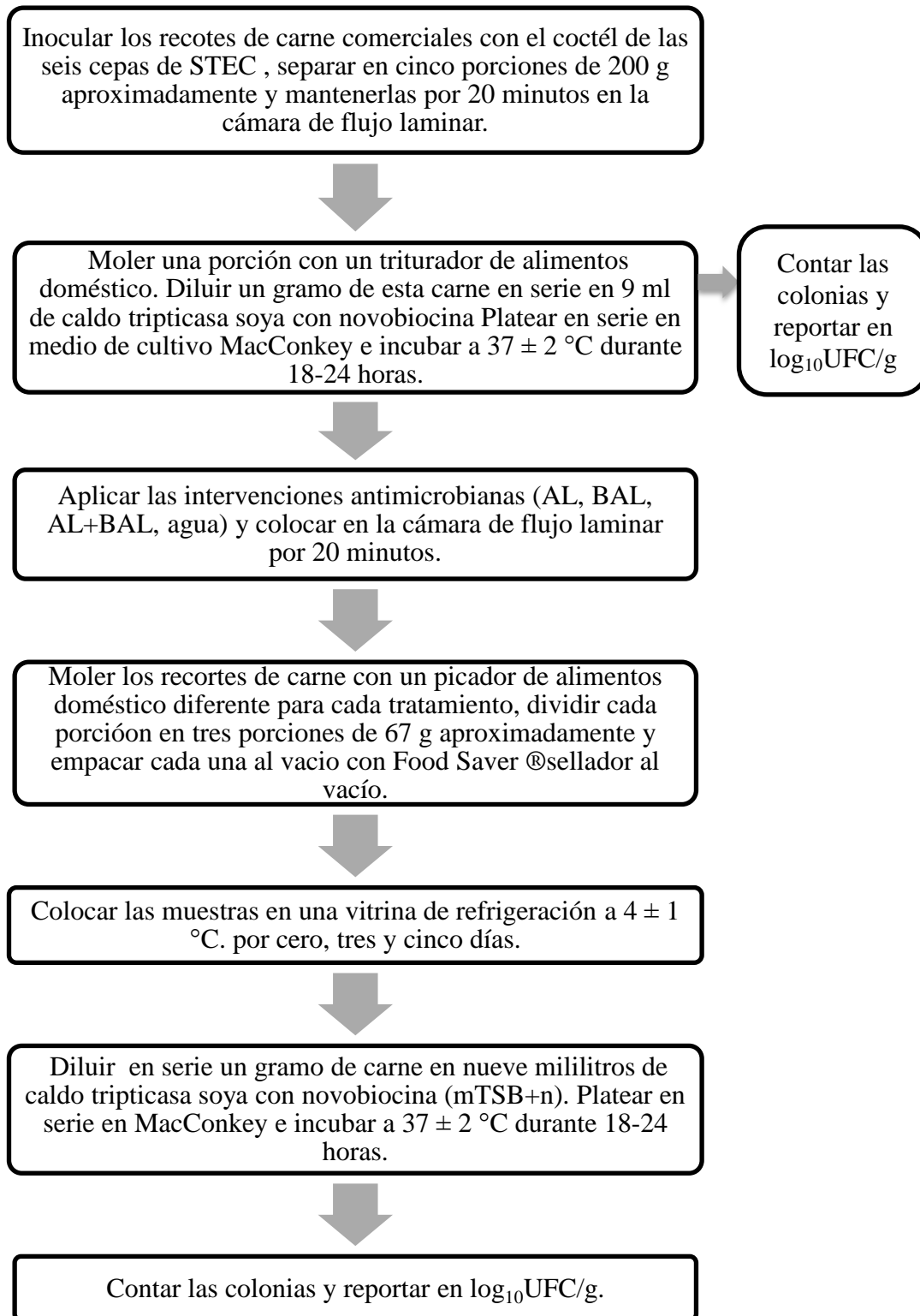


Figura 1. Diagrama de flujo del análisis.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de llevar a cabo el estudio de acuerdo al diagrama de flujo de la Figura 1, se determinó que la carga inicial alcanzada por la carne inoculada durante el experimento fue de $5.773 \pm 0.003 \log_{10}\text{UFC/g}$ promedio de las tres repeticiones. Se comprobó que únicamente con 10 s de inmersión de la carne inoculada en cada uno de los tratamientos se logró reducir $2.112 \log_{10}\text{UFC/g}$ promedio de todos los tratamientos. Wolf *et al.* (2012) indican que estas reducciones se podrían atribuir a un efecto de lavado o inmersión, lo que no ocurre si se aplica el tratamiento en spray. Al momento de la inmersión, la carne puede adsorber el tratamiento en la superficie, lo que permite una exposición más larga del patógeno con la intervención proporcionando una mayor inhibición de patógenos.

Wolf *et al.* (2012) realizaron un estudio donde compararon la efectividad de aplicación de ácido láctico por inmersión y spray para reducir la carga microbiana de *E. coli*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* productora de toxina Shiga. En este estudio su objetivo de carga inicial en los pedazos de carne fue de $4 - 5 \log_{10}\text{UFC/g}$ con un coctel de $6 - 7 \log_{10}\text{UFC/g}$, luego de muestrear y cuantificar obtuvieron una carga microbiana inicial de $5 - 6 \log_{10}\text{UFC/g}$ en la superficie de los pedazos de carne.

En el Cuadro 2 se observa la reducción de la carne almacenada en una vitrina con temperaturas de refrigeración de 2 a 4 °C. Los tratamientos aplicados fueron los siguientes: 4.5% de ácido láctico (AL), bacterias ácido lácticas NP51 (*Lactobacillus acidophilus*) (BAL), mezcla de ácido láctico y bacterias ácido lácticas (AL+BAL) y el control agua destilada. Las muestras se tomaron a cero, tres y cinco días después de la aplicación del tratamiento.

En el Cuadro 2 se observa que todos los tratamientos redujeron *Escherichia coli* productora de toxina Shiga. No hubo interacción significativa entre el tiempo y el tratamiento ($P = 0.1632$) es decir que no hubo diferencia significativa del día 0 al día 5 al igual que Cutter y Rivera (2000). Ellos no encontraron una influencia significativa al día 5 y 8 indicando que el tiempo es corto mientras que a partir del día 12 se observaron una diferencia significativa.

Cuadro 2. Sobrevivencia de *E. coli* productora de toxina Shiga en carne molida almacenada a 4 °C y al vacío después de aplicar los tratamientos con agua, ácido láctico (AL), bacterias ácido lácticas (BAL) y combinación de AL+BAL en recortes de carne con una carga inicial de $5.773 \pm 0.003 \log_{10}\text{UFC/g}$.

TRT	Tiempo de evaluación (días)			
	0	3	5	
	Media \pm DE ($\log_{10}\text{UFC/g}$)	Media \pm DE ($\log_{10}\text{UFC/g}$)	Media \pm DE ($\log_{10}\text{UFC/g}$)	Media \pm DE ($\log_{10}\text{UFC/g}$)
Agua	3.933 ± 0.045^a	3.747 ± 0.003^a	4.275 ± 0.427^a	3.985 ± 0.144^a
AL	3.367 ± 0.010^b	3.631 ± 0.140^a	3.081 ± 0.011^{bc}	3.360 ± 0.152^b
BAL	4.004 ± 0.074^a	3.844 ± 1.285^a	4.046 ± 0.681^{ab}	3.965 ± 0.023^a
AL+BAL	3.509 ± 0.014^b	3.151 ± 0.053^a	2.873 ± 0.388^c	3.178 ± 0.204^b
C.V.	3.619	11.976	12.162	9.835

UFC: Unidades formadoras de colonia

AL: ácido láctico

BAL: Bacterias Ácido Lácticas

^{a-b} medias con diferente letra son significativamente diferentes por columnas (P<0.05).

DE: Desviación Estándar

C.V.: Coeficiente de Variación

En el día 0 se encontró diferencia significativa entre los tratamientos resultando más eficientes la mezcla AL+BAL y AL (4.5%) ya que lograron la menor sobrevivencia ($3.509 \log_{10}\text{UFC/g}$) mientras que BAL ($4.004 \log_{10}\text{UFC/g}$) y el control (agua) ($3.367 \log_{10}\text{UFC/g}$) resultaron menos eficientes. Para el día 3 no se encontró diferencia significativa los recuentos oscilaron entre 3.151 y $3.844 \log_{10}\text{UFC/g}$, mientras que en el día 5 se encontró diferencia significativa entre los tratamientos.

Los tratamientos más eficaces significativamente en el día 5 fueron la mezcla AL+BAL este logró la menor sobrevivencia con una media de $2.873 \pm 0.388 \log_{10}\text{UFC/g}$ y AL (4.5%) logró una sobrevivencia media de $3.081 \pm 0.011 \log_{10}\text{UFC/g}$, no hubo diferencia significativa entre los dos tratamientos. Sin embargo, AL no tuvo diferencia significativa con BAL las mismas que obtuvieron una media de sobrevivencia de $4.046 \pm 0.681 \log_{10}\text{UFC/g}$. Las BAL no tuvieron diferencia significativa con el control (agua) ya que este logró una sobrevivencia de $4.275 \pm 0.427 \log_{10}\text{UFC/g}$.

Los tratamientos más eficientes fueron la mezcla AL+BAL con una media de sobrevivencia de $3.178 \pm 0.204 \log_{10}\text{UFC/g}$ y AL (4.5%) con $3.360 \pm 0.152 \log_{10}\text{UFC/g}$ de sobrevivencia, no hubo diferencia significativa entre estos dos tratamientos. Las BAL y el control (agua) resultaron menos eficientes con una sobrevivencia de $3.178 \pm 0.204 \log_{10}\text{UFC/g}$ y $3.985 \pm 0.144 \log_{10}\text{UFC/g}$ respectivamente. Obteniendo lo esperado como mejor tratamiento la mezcla de AL+BAL ya que contiene ácido láctico el mismo que ha resultado más eficiente entre los ácidos orgánicos estudiados en varias investigaciones.

Cutter y Rivera (2000) trabajaron en la intervención de reducción para *Salmonella* Typhimurium DT 104 y *E. coli* productora de toxina Shiga (O111:H8, O157:H7, O26:H11) sobre superficies de carne. En esta investigación se trabajó con ácidos orgánicos como ácido láctico (2%), ácido acético (2%), agua, y agua caliente y fueron almacenados durante 35 días. Al aplicar agua con un almacenamiento de siete días se obtuvo una media de sobrevivencia de $3.815 \pm 0.305 \log_{10}\text{UFC/g}$. En el presente estudio se logró obtener una carga media de sobrevivencia similar con agua a los cinco días de $3.985 \pm 0.144 \log_{10}\text{UFC/g}$.

Los valores obtenidos en este estudio para la reducción de *E. coli* productora de toxina Shiga con agua fue de $1.831 \pm 0.136 \log_{10}\text{UFC/g}$. Estos valores fueron similares a los encontrados por Hajmeer *et al.* (2004) en el que evaluaron agua, cloruro de sodio y clorito de sodio acidificado con aplicación de spray para reducir *E. coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* en briskets de carne. Obtuvieron una reducción con agua de $0.8 \log_{10}\text{UFC/g}$ para *E. coli* O157:H7. Sin embargo, la diferencia encontrada se puede asumir que es por la superficie de contacto con el producto y la manera de aplicación del tratamiento de spray vs inmersión ya que por inmersión se logra una mayor eficiencia de tratamiento Wolf *et al.* (2012).

Koohmaraie *et al.* (2005) indican que en las intervenciones posteriores a la cosecha para reducir o eliminar los patógenos en la carne relacionados con ácido láctico da lugar a la continua disminución de poblaciones microbianas durante su almacenamiento en refrigeración. En la presente investigación se obtuvieron resultados similares, en la que los dos mejores tratamientos están relacionados con ácido láctico (Cuadro 2). En base a la reducción microbiana y aspectos de calidad concluyeron que para ofrecer beneficios potenciales de inocuidad en los alimentos provenientes de carne de res se debe aplicar combinaciones de tratamientos antimicrobianos sucesivamente.

Harris *et al.* (2005) trabajaron en la validación de ácidos orgánicos y el clorito de sodio acidificado para reducir *Escherichia coli* O157 y *Salmonella* Typhimurium en pedazos de carne la misma que es materia prima de la carne molida. En su investigación utilizaron ácido acético al 2 y 4%, ácido láctico al 2 y 4%. Se determinó que en la carne molida tuvo un mejor efecto el ácido láctico, el mismo que se utilizó en el presente trabajo. Logró reducir de 2.0 a $2.5 \log_{10}\text{UFC/g}$, al igual que en este trabajo se obtuvo una reducción de $2.456 \pm 0.171 \log_{10}\text{UFC/g}$. Sin embargo, entre las concentraciones utilizadas para el ácido láctico indicaron que no hubo una diferencia significativa.

Entre los ácidos orgánicos más utilizados como tratamiento de pre-molienda para el control de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* Typhimurium en recortes de carne son el ácido peracético y ácido láctico. Los mismos que fueron evaluados por separado después de una inmersión en agua. El ácido peracético logró una reducción de $0.7 \log_{10}\text{UFC/g}$ después de la inmersión mientras que el ácido láctico causó una reducción de $1.3 \log_{10}\text{UFC/g}$. Estos resultados indican que el ácido peracético (200 ppm a 43 °C) no es más eficaz que el ácido láctico (2% a 55 °C) cuando se aplica por métodos similares en la misma cantidad de tiempo. Sin embargo el ácido láctico al 4% reduce de $2.7 \log_{10}\text{UFC/g}$, en la investigación realizada se obtiene similar carga de reducción $2.456 \pm 0.171 \log_{10}\text{UFC/g}$ con ácido láctico a 4.5% (Ellebracht *et al.* 2005).

En otro estudio Smith *et al.* (2005) evaluaron la reducción de *Escherichia coli* y *Salmonella* en carne molida usando bacterias ácido lácticas NP51 y los impactos que tienen en las propiedades sensoriales. En este estudio evaluaron muestras en refrigeración a 5 °C y se muestrearon a los cero, cuatro, ocho y doce días. Las mismas que a los cuatro días no hubo diferencias significativas en los recuentos de sobrevivencia de patógenos mientras que a los ocho y doce días redujo entre 3 y 5 log₁₀UFC/g.

Smith *et al.* (2005) realizaron una segunda etapa en la misma investigación anterior, en la que las muestras estuvieron empacadas al vacío y almacenadas a temperaturas de refrigeración. Las bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus acidophilus* NP51) redujeron una carga media de 1.5 log₁₀UFC/g de *E. coli* O157:H7 después de 12 días de almacenamiento, similar a la carga media obtenida en la presente investigación de 1.851 ± 0.015 log₁₀UFC/g a los cinco días. Este estudio indicó que las bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus acidophilus* NP51) en la carne molida almacenada a temperaturas de refrigeración, pueden ser consideradas como una intervención importante para el control y disminución de patógenos transmitidos por alimentos con la presente investigación se puede dar afirmar que es correcto ya que las bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus acidophilus* NP51) las mismas que se encontraban a temperaturas de 4 ± 1 °C lograron reducir la carga de *E. coli* productora de toxina Shiga en carne molida.

Los resultados obtenidos de las diferentes intervenciones proporcionan varios beneficios en la industria cárnica como en las decisiones de los análisis de los planes de puntos críticos de control, buenas prácticas de fabricación y otro tipo de documentos de la planta. El estudio de diferentes métodos de intervenciones antimicrobianas podría permitir la efectividad a la industria de la carne aumentando así la seguridad de los productos y posteriormente la reducción de la incidencia de brotes de origen alimentario (Wolf *et al.* 2012).

4. CONCLUSIONES

- Se determinó que la intervención múltiple (biológica y química) de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus acidophilus* NP51) con ácido láctico al 4.5% y la solución de ácido láctico al 4.5% tienen el mismo efecto de reducción de *E. coli* productora de toxina Shiga llegando a una reducción final media al día 5 de 2.242 log₁₀UFC/g de en recortes de carne inoculados artificialmente utilizados para la producción de carne molida.
- Se identificó que las intervenciones estudiadas no fueron un factor influyente en la reducción a través del tiempo.

5. RECOMENDACIONES

- Medir el nivel de pH al que se encuentra cada uno de los tratamientos.
- Validar las características físicas de los mejores tratamientos obtenidos.
- En una investigación adicional se debería determinar los factores que tienen un impacto en la eficiencia de los tratamientos.
- Agregar agua caliente como tratamiento en la materia prima de la carne molida y observar la eficiencia que tiene.
- Aplicar al menos una de las intervenciones en recortes de carne y no solamente en canales y cueros que usualmente se utilizan en la industria cárnica.

6. LITERATURA CITADA

Bravo Martínez, F. 2004. El manejo higiénico de los alimentos. Ed. Limusa S.A. ed. México. 34 p.

Calleja, A.L., I.A. Lanzarote, J. Björkroth, R.C. González, Moragrega, R.C. Cocero M.J. Alonso, L.S. Cocolin, A.M. Díez Maté, R. Gavara Clemente, J. Gómez Estaca y B. Guamis López. 2010. Nuevas tecnologías de conservación y transformación de los alimentos. Ed. International Marketing & Communication S.A. ed. Madrid. 166 p.

Cervantes Turribiates, L.A., A. Chalte Valencia y K. Tapia Canacasco, 2008. Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) (en línea). Consultado el 2 de junio del 2013. Disponible en: http://basica.sep.gob.mx/tiempocompleto/pdf/alimentacion/ETAs_SEP_2008.pdf

Cutter, C.N. y M. Rivera Betancourt. 2000. Interventions for the Reduction of *Salmonella* Typhimurium DT 104 and Non-O157:H7 Enterohemorrhagic *Escherichia coli* on beef surfaces. *Journal of Food Protection*. 63(10):1326-1332.

Da Costa, L.H. 2011. Nueva norma para control de productos cárnicos en Estados Unidos (en línea). Consultado de 1 de junio del 2013. Disponible en: http://anetif.org/files/pages/0000000024/stec_regulatory_presentation_mayo_2012.pdf

Ellebracht, J.W. King, D.A. Castillo, A. Lucia, L.M. Acuff, G.R. Harris, K.B. Savell, J.W. 2005. Evaluation of peroxyacetic acid as a potencial pre-grinding treatment for control of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* on beef trimmings. *Meat Science* 70(1): 197-203.

FDA (Food and Drug Administration). 2013. Bad Bug Book Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. (en línea). Consultado el 7 de agosto del 2013. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM297627.p>

Figuroa, M. Vargas, L. Mendoza, L. Acevedo, O. Chavarría, M. Fonseca, E. Moya, F. 1984. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos en Centroamérica. Ed. EUNED. ed. Costa Rica. 686 p.

García Garibay, Quintero Ramírez, López Munguía. 2004. Biotecnología Alimentaria. Ed. Limusa, S.A. ed. México. 622 p.

García Ortiz, F. García Ortiz, P.P. Muela, G.M. 2011. Operaciones Básicas y servicios en restaurante y eventos especiales. Ed. Paraninfo. ed. España. 90 p.

Gómez, D. Miliwebsky, E. Fernández, P.C. Ameztoy, A.M. Baschkier, A. Manfredi, E. Zotta, M. Córdoba, M. Nario, F. Piquín, A. Rivas, M. Parma, A. 2000. Detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) en alimentos. (en línea). Consultado el 2 de junio del 2013. Disponible en: http://www.ine.gov.ar/publi_pdfs/PosterAlimentos.pdf

Hajmeer, M.N. Marsden, J.L. Fung, D.Y.C. Kemp, G.K. 2004. Water, sodium chloride and acidified sodium chloride effects on *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* on beef briskets. *Meat Science* 68(2): 277-283.

Harris, K. Miller, M.F. Loneragan, G.H. Brashears, M.M. 2005. Validation of the Use of Organic Acids and Acidified Sodium Chlorite To Reduce *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* Typhimurium in Beef Trim and Ground Beef in a Simulated Processing Environment. 2005. *Journal of Food Protection*. 69(8):1802-1807.

Hussein, H.S. Bollinger, L.M. 2005. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef. *Meat Science* 71(4):676-689.

Koohmaraie, M. Arthur, T.M. Bosilevac, J.M. Guerini, M. Shackelford, S.D. Wheeler, T.L. 2005. Post-harvest interventions to reduce/eliminate pathogens in beef. *Meat Science* 71: 79-91.

Leistner, L. 1992. Food preservation by combined methods. *Food Research International*. 25(2): 151.

Margall, N. Domínguez, A. Prats, G. Salleras L. 1997. *Escherichia coli* enterohemorrágica. *Revista Española de Salud Pública* 71(5).

Michanie, S. 2003. *Escherichia coli* O157:H7 La bacteria que disparó el HACCP en la industria de la carne. (en línea). Consultado el 2 de junio del 2013. Disponible en: http://bpm-haccp.com.ar/index_archivos/pdf/Escherichia-coli-O157-H7.pdf

Pascual Anderson, M.R. Calderón y Pascual, V. 2000. Microbiología Alimentaria Metodología Analítica para alimentos y bebidas. Ed. Díaz de Santos. ed. Madrid. 367 p.

Riesco Rodríguez, S. 2011. Seguridad, higiene y protección ambiental en hostelería. Ed. Paraninfo. ed. España. 210 p.

Rivas, M. Leotta, G. Chinen, I. 2008. Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos. (en línea). Consultado el 2 de junio del 2013. Disponible en: <http://fos.panalimentos.org/LinkClick.aspx?fileticket=Ih1lApW7G8c%3D&tabid=120&mid=460&language=es-ES>

Romero Cabello, R. 2007. Microbiología y Parasitología Humana. Ed. Médica Panamericana. ed. Argentina. 768 p.

Sánchez Rodríguez, J.A. Serrano Jiménez, Salud. Marfil Navarro, R. Jodral Villarejo, M. L. 2011. Patógenos emergentes en la línea de sacrificio de porcino. Ed. Díaz de Santos, S.A. ed. Madrid. 209 p.

Smith, L. Mann, J.E. Harris, K. Miller, M.F. Brashears, M.M. 2005. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in Ground Beef Using Lactic Acid Bacteria and the Impact on Sensory Properties. *Journal of Food Protection* 68(8): 1587-1592.

USDA (United States Department of Agriculture). 2013. Ground Beef and Food Safety (en línea). 9 de agosto del 2013. Disponible en: http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/food-safety-education/get-answers/food-safety-fact-sheets/meat-preparation/ground-beef-and-food-safety/ct_index

Wolf, M.J. Miller, M.F. Parks, A.R. Loneragan, G.H. Garmyn, A.J. Thompson, L.D. Echeverry, A. Brashears, M.M. 2012. Validation Comparing the Effectiveness of a Lactic Acid Dip with a Lactic Acid Spray for Reducing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and Non-O157 Shiga Toxigenic *Escherichia coli* on Beef Trim and Ground Beef. *Journal of Food Protection* 75(11): 1968-1973.

Youssef, M.K. Yang, X. Badoni, M. Gill, C.O. 2013. Survival of acid tolerant *Escherichia coli* O157:H7 on beef surfaces sprayed with 2% or 5% lactic acid. *Meat Science* 96(1): 120-125.