Facultad de Ciencias
Universidad de la República

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Tesina para optar por el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas.

Evaluación del crecimiento potencial de bacterias patógenas sobre medias reses vacunas en condiciones de maduración.

Estudiante:
Ana Laura García Fedullo

Orientador:
Dra. Caterina Rufo, PTP-Facultad de Química

Tribunal:
Dra. Alicia Gardiol
Dra. Caterina Rufo
Dra. Silvana Vero

Setiembre, 2010

Índice:

Lista de Abreviaturas 4

Resumen 5

1-Introducción 6

2- Aspectos sobre el Virus de la Fiebre Aftosa o FMDV (Foot and Mouth disease virus) 7

3- Procesos bioquímicos *post mortem* en músculo esquelético 9

3.1Carnes DFD 11
3.2Carnes PSE 11

4-Estimulación eléctrica como práctica para descenso del pH 12

5-Microorganismos patógenos en alimentos y afecciones en humanos 14

5.1-E.coli O157:H7 15
5.2-Salmonella spp 16
5.3-Listeria monocytogenes 17
5.4- Sistema Nacional VETA 18

6-Modelos matemáticos de crecimiento microbiano 19

7-Herramientas informáticas para la Microbiología Predictiva 21

8-Hipótesis y objetivos de trabajo 24

Hipótesis de trabajo 24
Objetivo general y específicos 25

9-Materiales y Métodos 26

Métodos de muestreo 26
Aplicación de estimulación eléctrica 26
Toma de medidas de ph y temperatura 26
Toma de muestras para recuentos 27
Siembra de E.coli/coliformes y Aerobios totales 30
Análisis de datos 31
Curvas 31
Test estadístico 31
Recuentos 31
Utilización de modelos terciarios de crecimiento 32

10-Resultados **34**

Enfriamiento de carcasa a nivel muscular **34**
Perfil de descenso de pH **36**
Curvas predictivas de crecimiento **38**
Recuentos de microorganismos indicadores **42**

11-Discusión **44**

12-Conclusiones finales **47**

13-Referencias **48**

Anexo I **53**

Anexo II **55**

Anexo III **59**

Lista de Abreviaturas

AOAC	Asociación Oficial de Química Analítica
ATP	Adenosín Trifosfato
ComBase Predictor	Common Database Predictor
DFD	Dry Firm Dark
EE	estimulada eléctricamente
EHEC	enterohemorragic *E.coli*
ETA	Enfermedades Transmitidas por Alimentos
FMDV	Foot and Mouth disease virus
l.dorsi	*longissimus dorsi*
log ufc/mL	logaritmo de unidades formadoras de colonias por mililitro
LV-ES≤ 100v	estimulación eléctrica de bajo voltaje, menor o igual a 100volts
m.o	microorganismo
NEE	no estimulada eléctricamente
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
PMP	Pathogen Modeling Program
PSE	Pale Soft Exudatives
SUH	Síndrome urémico hemolítico
STEC	shiga toxin producing E.coli
T	temperatura
t	tiempo
t_g	tiempo de generación
UE	Unión Europea
USDA	Departamento de Agricultura de EEUU
VETA	Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Transmitidas por Alimentos

Resumen

Los brotes de Aftosa registrados en el Uruguay durante 2001 modificaron los requisitos de importación por parte del USDA que comienza a exigir a Uruguay que las medias reses sean mantenidas en cámara durante 36hs a temperaturas entre +4ºC y +10ºC. Este tiempo de maduración sería necesario para garantizar la acumulación de ácido láctico, producto de la glicólisis anaerobia, que rige el descenso del pH a nivel muscular a valores ≤5.8 inactivándose así el virus. Sin embargo, al cumplirse con estos requisitos se estarían creando condiciones que permitirían la proliferación bacteriana incluyendo patógenos que pudieran estar presentes – *E.coli O157:H7, L. monocytogenes, Salmonella spp*-.

Diversos métodos permiten acelerar la glicólisis post mortem, siendo la estimulación eléctrica de bajo voltaje (LV-ES ≤ 100v) el más utilizado. La LV-ES permitiría reducir el tiempo de maduración y continuar con las siguientes etapas de producción, disminuyendo el riesgo de proliferación bacteriana y reduciendo la probabilidad de encontrar patógenos.

En este trabajo se estudió el efecto de la aplicación de LV-ES sobre el descenso del pH de las medias reses. Se analizó el crecimiento potencial de bacterias patógenas utilizando herramientas de Microbiología Predictiva. También se estudió la supervivencia de bacterias en la superficie de las medias reses mediante el recuento de microorganismos indicadores como *E.coli genérica*, coliformes y mesófilos.

Los ensayos fueron realizados *in situ* en las instalaciones frigoríficas. Se realizó el seguimiento a 66 novillos donde a un 50% se le aplicó LV-ES en la playa de faena inmediatamente luego del degüello. Durante un período de 36hs se tomaron, a distintos tiempos, medidas de pH, temperatura superficial y muscular (*l. dorsi)* en las medias reses almacenadas en cámara. Se evidenció un descenso de pH incrementado en las primeras horas *post mortem* en aquellas media reses con estimulación, llegando a valores menores a 5.8 incluso antes de las 24 horas.

Las curvas de crecimiento predictivas de patógenos fueron generadas con los portales Combase y PMP. Se demostró que aún en condiciones de bajas temperaturas y pH, los m.o son capaces de sobrevivir. Las condiciones fisicoquímicas permitirían que en 36 horas de crecimiento en medio líquido, *E.coli O157:H7* y *Salmonella spp* alcanzaran los máximos valores de densidad poblacional y que *L. monocytogenes* continuara en fase de crecimiento. Por último, se evaluó el crecimiento de m.o indicadores a 12hs y 30hs *post mortem*. A pesar de no existir diferencias significativas entre ambos valores, se observó que los m.o fueron capaces de sobrevivir.

Se concluyó que las actuales condiciones de maduración son innecesarias dado que el pH ≤5.8 ya se alcanza a las 24hs con LV-ES. Los recuentos de m.o indicadores muestran que una maduración prolongada no afectaría la capacidad de supervivencia de patógenos si estos existieran.

1-Introducción

A raíz de los brotes de fiebre Aftosa surgidos en el país en el año 2001, se comienza una campaña de vacunación intensiva contra el virus, donde el último brote es registrado en Agosto de ese año.

Como consecuencia de ello, y una vez retomado el comercio de carnes con Norteamérica, el Departamento de Agricultura de EEUU (USDA), establece nuevos requisitos para la exportación de este producto hacia ese país (USDA, 2002).

Los mismos, suponen mantener la res, luego de faenada y eviscerada, a temperaturas de cámara de entre +4ºC-+10ºC por 36hs, durante el proceso de *maduración* y el establecimiento *del rigor mortis*.

Estas exigencias son plenamente justificables, dado que con ellas se busca asegurar que se lleven a cabo los procesos metabólicos que dirigen el descenso del pH a valores por debajo de 6 y con ello se asegura la inactivación del virus de la aftosa.

Sin embargo, las consecuencias para la industria cárnica, que conlleva la aplicación de este criterio son evidentes, no sólo en términos locativos, gasto energético o alterando la dinámica del propio frigorífico, sino por sobretodo porque atentan contra la inocuidad de las carnes. Además de nuestro país, EEUU importa carnes de Australia y Nueva Zelanda, ambos países libres de Aftosa sin vacunación. Cuando un estudio comparó nuestras carnes con las provenientes de estos países, se evidenciaron recuentos mayores de microorganismos patógenos en carnes uruguayas (Bosilevac, J.M. 2007).

Procesos de maduración alternativos, como los propuestos por la normativa de UE y que suponen una maduración de 24hs a temperaturas de cámara entre +2ºC y +4ºC, permiten alcanzar igualmente valores de pH menores a 6.

Se pone en evidencia que las condiciones exigidas por el USDA son un factor de riesgo potencial para el crecimiento de bacterias patógenas.

El descenso del pH durante la maduración no sólo es importante debido a la inactivación del virus sino que su velocidad de descenso es uno de los factores que determina la terneza de la carne, siendo ésta una de las características más importantes de calidad sensorial.

Por ello, se han buscado formas de acelerar el descenso del pH que permitirían a su vez reducir el tiempo de maduración.

Entre ellas se han estudiado los efectos de la aplicación de la estimulación eléctrica inmediatamente después del degüello sobre la terneza de la carne.

De lo anterior expuesto se desprende, que uno de los principales intereses de la industria cárnica es encontrar métodos que permitan acelerar el descenso del pH, acortando los tiempos de maduración, interrumpiendo así la proliferación de bacterias patógenas. De ésta manera se lograría la unificación de criterios de exportación de carnes hacia EEUU y UE a la vez de incrementar la competitividad frente a otros países exportadores.

2- Aspectos sobre el Virus de la Fiebre Aftosa o FMDV (Foot and Mouth disease virus)

En la actualidad, el virus de la fiebre aftosa es endémico en regiones de Asia, África y América del Sur y se encuentra erradicado de Australia, Nueva Zelanda, Islandia y América del Norte entre otros(OIE, 2007).

Infecta principalmente a los miembros del orden Artiodáctila (mamíferos ungulados, como por ejemplo: cerdos, búfalos, ovinos), siendo el ganado, en casi todo los países afectados, el principal hospedero (OIE, 2007).

El FMDV es un virus ARN miembro del género Aphthovirus de la familia Picornaviridae del que existen siete serotipos – A, O, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3, ASIA-1 – los cuales no presentan inmunidad cruzada entre ellos; es decir la infección por uno de los serotipos no previene la

infección por otro de los serotipos indicados, pudiendo un mismo animal presentar infección por varios de ellos (OIE, 2007).

Se lo considera altamente infeccioso y de gran transmisibilidad, la misma ocurre por contacto directo o indirecto con animales o materia infectada (saliva, leche, materia fecal) por vía oral, respiratoria o por lesiones en la piel.

El período de incubación en el ganado puede variar de dos a siete días, dependiendo de la dosis infectiva del virus y de la ruta de infección. Durante este tiempo el virus replica en el área de naso-faringe. Unas horas después de la infección el virus llega a la sangre y se esparce hacia los pulmones, los ganglios linfáticos, músculos, etc (Sutmoller, 2001).

La enfermedad se manifiesta por fiebre alta, aparición de úlceras en la boca y ampollas en las pezuñas y la ubre. El animal enfermo deja de alimentarse, le cuesta mantenerse en pie y disminuye su producción de leche, también puede tener abortos, no aparease y disminuir su peso (OIE, 2007).

En condiciones de refrigeración o congelamiento el virus es capaz de persistir y sólo se inactiva con temperaturas superiores a 50ºC. Sobrevive en nódulos linfáticos y en la médula ósea a pH neutro pero es destruido en el músculo luego de establecido el rigor mortis cuando se alcanzan valores de pH menores a 6 (www.oie.int/eng/maladies/fiches/a_a010.htm#5).

Las restricciones que se aplican al comercio internacional del ganado cuando el virus es detectado, han llevado a los países exportadores a la aplicación de medidas preventivas como forma de controlar los brotes.

Dentro de las medidas de control utilizadas está la vacunación, actualmente practicada en nuestro país. Las vacunas son obtenidas a partir de virus inactivados. A pesar de estar vacunado, un animal igualmente puede contraer el virus y presentar o no síntomas de la enfermedad. Es por ello que resulta necesaria además la vigilancia de animales post-vacunación y el demostrar la ausencia del virus de modo de re-adquirir el status “libre de aftosa”.

Nuestro país mantiene el status de país libre de Aftosa con vacunación, desde el año 2005(http://www.oie.int/esp/info/es_fmd.htm#Liste#Liste).

3- Procesos bioquímicos *post mortem* en músculo esquelético

Luego del sacrificio del animal, los dos procesos bioquímicos con mayor importancia comercial para la industria cárnica son el *rigor mortis* y la *maduración*, que llevan a la transformación del músculo en carne.

El *rigor mortis* se caracteriza por la rigidez y la inextensibilidad de los músculos, el proceso de contracción que ocurre es igual al del músculo vivo pero en este caso irreversible.

Las cabezas de miosina quedan unidas a las fibras de actina como consecuencia del agotamiento del ATP (Bandman, 1992). En el músculo vivo, este nucleótido induce un cambio en la conformación de la cabeza de miosina que la hace menos afín al filamento de actina permitiendo el desplazamiento a lo largo del filamento.

La etapa de *rigor* no se alcanza simultáneamente en todas la fibras musculares sino que depende de las reservas de glucógeno existentes en cada una de ellas.

El proceso que guía el establecimiento del rigor mortis es el agotamiento del ATP y la acumulación de ácido láctico genera un descenso del pH.

Al cesar el aporte de oxígeno y nutrientes al músculo, éste debe pasar al metabolismo anaeróbico para transformar sus reservas de energía en forma de glucógeno, en ATP a fin de mantener la integridad y temperatura muscular. (Zimerman, 2006).

El nivel de glucógeno presente en el músculo puede verse influenciado por factores tanto hereditarios como de alimentación o stress que sufre el animal antes del sacrificio. El descenso del pH dependerá tanto del nivel de glucógeno en el músculo como del tipo de fibras musculares presentes, que pueden ser de contracción rápida (blancas, fibras anaeróbicas)

alcanzando valores de pH 5.5 o lentas (rojas, fibras aeróbicas) con valores de pH que no baja de 6.3 (Zimerman, 2006).

La *maduración* comienza una vez que se estableció el *rigor mortis* y corresponde a una etapa de conservación de la carne refrigerada a fin de obtener su ablandamiento. En general, ocurre por la degradación de proteínas estructurales (proteólisis).

Este ablandamiento es consecuencia, principalmente, de la acción de enzimas como las calpaínas I y II (calcio dependientes) que debilitan la unión de la actina al disco Z y de la catepsina L, que ataca el complejo actinomiosina y las troponinas (Hollung *et al*, 2007).

Las calpaínas resultan activadas debido a la alta concentración de Ca^{+2} en el citosol, como resultado del fallo en el bombeo de éste hacia el retículo por falta de ATP. La actividad de estas enzimas es pH dependiente y disminuye cuando éste es menor a 6.2. Sin embargo, la aplicación de ES junto con un régimen de enfriamiento rápido de la carcasa permite que la actividad de esta enzima no se vea afectada por el descenso del pH (Hwang *et al*, 2003). Las catepsinas, normalmente están confinadas a lisosomas y son liberadas por la disrupción de la membrana del lisosoma activándose en el citosol debido al descenso del pH (Hollung *et al*, 2007).

Tanto la tasa de enfriamiento de la carcasa como la velocidad de descenso de pH son dos variables críticas para el establecimiento del rigor mortis y el proceso de maduración, cuya interacción determina la calidad de la carne (Simmons et al, 2006).

La terneza óptima se obtiene cuando el *rigor mortis* ocurre a temperaturas de 15ºC (Hwang *et al*, 2003). Pero si la acidificación no se da de forma correcta, por ser muy rápida o muy lenta, el establecimiento de la etapa de *rigor mortis* se verá afectado desencadenando problemas de calidad en la carne.

Los problemas de calidad mas caracterizados son: carnes PSE (pale, soft, exudatives) y carnes DFD (dark, firm, dry) y sus nombres hacen referencia a las características físicas que presentan los músculos cuando son comparados con carnes normales.

3.1Carnes DFD

El pH se mantiene por encima de 6, el animal llega con muy poco glucógeno disponible. No se alcanza el punto isoeléctrico de las proteínas, las que tienden a aumentar la capacidad de enlace y por ende la capacidad de retener agua que queda dentro de las estructuras miofibrilares. Estas carnes son además oscuras, de consistencia firme y secas en su superficie (Zimerman, 2006).

3.2Carnes PSE

El pH disminuye rápidamente a valores por debajo de 6 cuando la temperatura es todavía alta. El stress agudo al que es sometido el animal en los instantes previos al sacrificio (debido a peleas, agresiones) que hace que el glucógeno sea consumido, acumulándose ácido láctico en el músculo. Este ácido no puede ser eliminado dado que el sacrificio es inmediato luego de su producción (Zimerman, 2006).

Estas condiciones llevan a la desnaturalización de proteínas y a la pérdida de retención de agua la que es eliminada hacia el espacio intercelular (Simmons et al, 2006).

De lo anterior se concluye que un manejo adecuado del animal previo a su sacrificio en conjunto con regímenes de enfriamiento adecuados, es crucial para asegurar la calidad de la carne ya que de éste dependerán las reservas de glucógeno en el músculo y por ende el nivel de descenso de ph.

4-Estimulación eléctrica como práctica para descenso del pH

Hasta el momento, el uso de la estimulación eléctrica se ha limitado a acelerar la glicólisis post mortem como forma de mejorar la terneza de la carne.

Al acelerarse la glicólisis se previene el acortamiento del músculo por frío (contractura severa a temperaturas bajas con pH alto y que muchas veces impide el ablandamiento) ya que la etapa de rigor se alcanza a temperaturas más elevadas. La práctica de estimulación eléctrica de bajo voltaje (LV-ES≤ 100v) busca emular las condiciones bioquímicas y fisiológicas del tejido muscular vivo tratándolo con impulsos eléctricos que induzcan la contracción muscular. Debe ser llevada a cabo durante la primera hora luego del sacrificio de modo de que aún exista cierta actividad nerviosa en los tejidos que permita transmitir el impulso (Hollung *et al*, 2007).

Los vínculos de la terneza con la estimulación no están del todo claros pero sí se observa mayor terneza y en tiempos más tempranos en aquellas reses estimuladas. Según Hwang *et al (2003),* esto es consecuencia del balance de fibras que entraron en rigor y las que no.

La utilización de LV-ES trae aparejado cambios físicos en las miofibrillas, incide sobre la tasa de proteólisis y la actividad enzimática (Hwang *et al, 2003)*, permitiendo, así, mantener la calidad sensorial de la carne, su terneza o color por ejemplo (Brito *et al* 2006).

En reses que fueron estimuladas se observó un aumento en la velocidad de degradación de las fibras musculares, evidenciada por el aumento de la degradación de proteínas de alto peso molecular como la titina y nebulina, además de troponina T (Bandman, 1992). La titina y la nebulina son proteínas que intervienen en la elasticidad de la miofibrilla por lo que su degradación podría contribuir a reducir la resistencia de la misma.

El aumento de la proteólisis podría deberse, como se ha propuesto, a la liberación de proteasas lisosomales, como la catepsina, hacia el citosol o a la acción de μ- calpaínas debido al aumento de Ca^{+2} intracelular a raíz de la estimulación, entre otras posibilidades(Hollung *et al*, 2007). Si bien la liberación de estas enzimas se ve acelerada con la estimulación, no existen aún, bases

suficientemente sólidas que vinculen la proteólisis con el aumento de terneza (Hwang *et al*, 2003).

La contracción muscular bajo los efectos de la LV-ES da lugar a la degradación acelerada de ATP y, como fue indicado con anterioridad, para compensar esta descomposición se consume de forma acelerada glucógeno bajo metabolismo anaerobio que lleva a la formación de ácido láctico y al descenso del pH.

Investigaciones llevadas a cabo en alpacas, demuestran que, efectivamente, la aplicación de estimulación eléctrica, permite reducir el valor del pH por debajo de 6 en las primeras 24 horas luego del sacrificio (Guerrero *et al*, 2004). Otra investigación reciente, esta vez aplicando ES en los músculos aductor y *longissimus dorsi* de bovinos, obtuvo resultados que verifican un descenso de pH más marcado en comparación con aquellos músculos no estimulados (Hollung *et al* 2007). Observaron además, que los distintos músculos, de un mismo animal, respondían de manera diferencial a la aplicación de la estimulación.

Como consecuencia de la estimulación eléctrica y del ácido láctico producido sería posible alcanzar valores de pH por debajo de 5.8 e inactivar el virus de la Aftosa en un tiempo menor. Por otro lado, el rigor mortis también se establecería en tiempos menores dando un comienzo anticipado a la etapa de maduración.

Si lo anterior expuesto sucede, una estadía de 36 horas de las medias reses en cámara se volvería innecesaria.

Mientras el proceso de descenso de pH ocurre, las temperaturas superficiales de las medias reses aún son lo suficientemente altas y podrían permitir el crecimiento microbiano en la superficie. Patógenos como *E. coli O157:H7, Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes* pueden crecer dentro del rango de temperatura y pH alcanzado durante la maduración de la media res, por lo que el disminuir el tiempo de cámara y por ende adelantar etapas posteriores de producción contribuirían a disminuir el riesgo potencial de encontrar estos patógenos en el producto final.

Las requerimientos exigidos a Uruguay, si bien son exitosos para inactivar el virus de la fiebre Aftosa, no consideran las consecuencias sobre otro tipo de microorganismos patógenos. La seguridad que se intenta alcanzar con estas medidas para el virus de la Aftosa, puede estar introduciendo condiciones que permitan la proliferación de otros patógenos por encima de los valores mínimos establecidos.

5-Microorganismos patógenos en alimentos y afecciones en humanos

Si bien todos los alimentos pueden ser causales de enfermedades vinculadas con bacterias patógenas, las carnes y sus productos particularmente, son una fuente importante de infecciones humanas (Norrung.B *et al* , 2007).

Así, la ingesta de microorganismos patógenos como de sus toxinas, aún en dosis pequeñas, puede derivar en enfermedades mayoritariamente gastrointestinales, siendo crucial asegurar la inocuidad y calidad de las carnes (MacDonald *et* al, 1999).

En general, la causa principal de infecciones o intoxicaciones se da por el consumo de alimentos contaminados, particularmente por cocción inadecuada de carne molida, por ejemplo.

Las enfermedades asociadas a patógenos en alimentos se clasifican en tres tipos: intoxicaciones, infecciones y toxicoinfecciones. Las intoxicaciones son debidas a la ingesta de alimentos con toxinas preformadas que resultan del crecimiento de la bacteria. Por otro lado, las infecciones son causadas por la ingesta de alimentos que contienen bacterias viables, como *Salmonella* y *Listeria*, que luego son capaces de establecerse y crecer en el hospedero. Por último, las toxicoinfecciones, son el resultado de la producción de toxina una vez dentro del húesped, por ejemplo *E.coli O157:H7* (Inst. of Food Technology, 2004).

Los principales patógenos que han sido asociados a cuadros clínicos debidos al consumo de alimentos son *E. coli O157:H7, Salmonella spp y Listeria monocytogenes (*Germini *et al,* 2009).

5.1-E.coli O157:H7

Es un bacilo gram-negativo de la familia *Enterobacteriaceae*, con flagelos pericítricos. En su nomenclatura, la “O” hace referencia a antígenos somáticos mientras que “H” corresponde a antígenos flagelares.

Este patógeno corresponde al serotipo más común de las cepas enterohemorrágicas procedentes de animales y que producen una toxina denominada shiga (Gill and Hamer, 2001).

En la literatura es común que se las denomine como cepas EHEC -enterohemorragic *E.coli*- o STEC -shiga toxic-producing *E.coli* (Ahmad and Zurek, 2006).

Si bien el grupo de cepas EHEC está integrado por otros serotipos, -O111 -O26 -O103 -O145, no está demostrado que éstos provengan de animales.

Se lo considera uno de los patógenos de alimentos más importantes debido a su baja dosis infectiva (< 10 ufc) (Carney *et al*, 2006).

El ganado es considerado, como un reservorio asintomático importante de este patógeno (Ahmad and Zurek, 2006).

La contaminación es común que ocurra durante el eviscerado o la remoción del cuero donde bacterias presentes en los intestinos o en el pelaje pueden alcanzar la carcasa. Una vez allí, el patógeno puede esparcirse por la manipulación durante la producción lo que incluso puede hacer aumentar la contaminación en el producto final (Carney *et al*, 2006).

En humanos*, E.coli O157:H7* es la principal causa de diarreas agudas, sanguinolentas y en fases más avanzadas, del síndrome urémico hemolítico (SUH) (Gadea *et al*, 2004).

En el caso del SUH, el patógeno, prolifera en la luz del colón del hospedero sin invadir la mucosa y produce dos toxinas Shiga, Stx1 y Stx2, principales factores de virulencia, codificadas por los genes *stx1* y *stx2*, respectivamente, localizados en profagos (Ahmad and Zurek, 2006)

Estas toxinas son capaces de ingresar al medio interno y unirse a sus receptores de las células endoteliales, renales o neurales, luego ingresan a estas células y desarrollan la patogenia interfiriendo con el funcionamiento normal del ribosoma (Gadea *et al*, 2004). La severidad de los síntomas está correlacionada con la cantidad de toxina ingerida (Ahmad and Zurek, 2006).

Si bien la letalidad en la fase aguda es baja, pueden persistir en niños secuelas a nivel neurológico, hemodinámicas o renales que con el tiempo lleven a la necesidad de un tratamiento dialítico crónico o transplante renal.

La prevalencia para *E.coli O157:H7* en carcasas vacunas es del 3% y del 2.4% en los recortes de carnes que luego son utilizados en productos de carne molida (*Carney et al*, 2006). En Uruguay, la prevalencia es 0.0137% en el producto final de exportación (Gil et al, 2004).

5.2-Salmonella spp

Es un bacilo gram-negativo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Son móviles debido a la presencia de flagelos pericitricos.

Presenta diferencias en cuanto a la especificidad del hospedero; mientras algunos serotipos no tienen una estricta adaptación a un hospedero y son capaces de producir enfermedades con diversas características en distintas especies animales y en el hombre, otros serotipos sí son específicos, como *S.gallinarum* para las aves o *S.typhi* en el caso del hombre.

Las Salmonelosis humanas, son probablemente las zoonosis más comunes, siendo los alimentos la vía más común de contagio.

Se las clasifica en dos grandes grupos: por un lado, las debidas a serotipos estrictamente humanos, que causan habitualmente síndromes tifoideos con presencia de bacterias en la sangre, y las debidas a serotipos ubicuos, que provocan diarrea, vómitos y fiebre. La duración y entidad de esta enfermedad es variable, dependiendo del estado general del hospedero (Inst. of Food Technology, 2004).

La infección comienza cuando la bacteria ingresa a las células epiteliales del lúmen del intestino por un proceso de endocitosis. Citotoxinas presentes en la pared celular bacteriana aparentemente facilitarían el ingreso a la célula. La translocación del endosoma permite que la bacteria sea liberada en la lámina propia. La secreción de la enterotoxina genera un eflujo de agua y electrolitos hacia el lúmen intestinal provocando diarreas.

Aquellas especies de *Salmonella* no tifoide, generalmente solo provocan respuesta inmune a nivel intestinal, sin embargo especies de *Salmonella* tifoide(*S. typhi, S. paratyphi*,) y otras cepas muy virulentas(*S. dublin* y *S. choleraesuis)* pueden invadir otros tejidos mas profundos a través de los vasos linfáticos o los capilares provocando una respuesta inmune mas severa(Inst. of Food Technology, 2004).

En aquellas salmonelosis que no presenten complicaciones, no se recomienda el uso de antibióticos debido que tiende a prolongar la etapa de portador.

5.3-Listeria monocytogenes

Es un bacilo gram-positivo, de la familia *Listeriaceae,* aerobio y móvil a 25º C pero inmóvil a 37º C por inactivación del flagelo. Es considerada una bacteria saprófita y oportunista.

Se encuentra muy ampliamente distribuída, pudiéndosele aislar de suelos, aguas residuales, vegetales y de una gran variedad de muestras procedentes de ensilados, plantas en descomposición, insectos, pájaros, ambientes domésticos, entre otros.

Su presencia en casi cualquier ambiente hace que el alimento pueda ser contaminado con posterioridad a su procesado o luego de un tratamiento listericida (Inst. of Food Technology, 2004).

Dos características son destacables de *L. monocytogenes*: el ser una bacteria psicrótrofa, capaz de crecer a temperaturas de 4º C y el de estar asociada a nichos ecológicos donde existe poca competencia (Valero *et al*, 2006).

Si bien no se encuentra adaptada al hombre como hospedador, es capaz de utilizar múltiples vías de infección (contacto con la piel, vías respiratorias), siendo la ingesta de alimentos contaminados la principal ruta de transmisión de la enfermedad.

La Listeriosis es causada principalmente por *Listeria monocytogenes,* pudiendo presentarse como una afección del sistema nervioso central (meningitis, encefalitis), septicemia u ocasionalmente como gastroenteritis febril (Gill.C, Hamer. D, 2001).

Mientras que sólo el 0.1/% de las ETAs son debidas a *L.monocytogenes* el 27% de las muertes son causadas por esta bacteria (Inst. of Food Technology, 2004).

Si bien el modo de infección no es bien conocido, se sugiere que el intestino delgado es el sitio de invasión primario. Luego, la infección de células fagocíticas, como macrófagos, permitiría la invasión de otros órganos y prolongaría el período de incubación de la enfermedad.

5.4- Sistema Nacional VETA

El recuento de patógenos se vuelve crítico a la hora de asegurar la inocuidad del producto estableciéndose como punto de control en técnicas de HACCP y estableciendo los gobiernos y entidades políticas regulatorias.

Controles relacionados con la inocuidad también involucran microorganismos indicadores como coliformes o mesófilos aerobios. Por ejemplo, dado que *E. coli* está vinculada con contaminación fecal, el hecho de realizar análisis de rutina para este microorganismo permite poder estimar la contaminación debida a otros microorganismos de origen fecal (Lindblad et al, 2007).

Desde 1995, nuestro país cuenta con el Sistema VETA (Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Transmitidas por Alimentos) e integra a todos los actores involucrados en el tema: Ministerio de Salud Pública, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Intendencias Municipales, Facultades de Medicina, de Agronomía, de Ciencias, O.S.E. Uno de sus objetivos fue la inclusión de las E.T.A. (enfermedades transmitidas por alimentos) en la lista de enfermedades de notificación obligatoria, a fin de identificar precozmente la ocurrencia de episodios de estas enfermedades y permitir una investigación oportuna.

Hacia el año 1999, la situación del Uruguay era la siguiente: se habían registrado en el país 33 brotes, cuya etiología fue bacteriana en 32. Dentro del origen bacteriano, más de la mitad de los brotes (56 %) había sido causado por *Salmonella* spp. En 13 de los 18 brotes de Salmonelosis, se remitieron las cepas al Centro Nacional de Salmonella para su tipificación, resultando en 10 *S.enteritidis*, en 1 *S.agona* y 2 *S. typhimurium*.

En 6 brotes (19 %), no se logró identificar ningún patógeno en concreto, pero si coliformes. *Staphylococcus aureus* fue causante 4 brotes (13 %), 2 brotes fueron por *Clostridium perfringens*, y completando el origen bacteriano con un brote cada uno, *Shigella spp*. y *Clostridium botulinum* (OPS/OMS, 1999).

En el año 2002, la Facultad de Medicina realizó el primer aislamiento de *E.coli O157:H7* de una niña de 16 meses con síndrome urémico hemolítico (SUH) tras haber ingerido carne de mulita. El SUH tiene frecuencias de 4-5 casos por cada 100.000 niños menores a 5 años. Hasta ese año, los serogrupos aislados de casos de SUH habían sido *O111*, *O26* y *O145* (Gadea *et al*, 2004).

Lamentablemente, en muchos casos no se cuenta con restos del producto contaminado, no se puede identificar concretamente el alimento o se realiza una notificación tardía del brote lo que dificulta el cumplimiento de las funciones del programa.

6-Modelos matemáticos de crecimiento microbiano

Tradicionalmente la seguridad microbiológica de los alimentos ha sido establecida a través de *challenge test* mediante los cuales se simulan, en el laboratorio, las condiciones ambientales en el alimento en referencia a su crecimiento. Sin embargo, se los ha criticado por ser caros, complejos, consumir demasiado tiempo en su ejecución, no proporcionar datos que puedan utilizarse posteriormente o brindar un nivel de certeza limitado en cuanto a la seguridad del alimento. (MacDonald et al, 1999)

Una metodología alternativa, es la utilización de modelos matemáticos.

Estos corresponden a expresiones matemáticas que permiten describir el número de microorganismos en un producto alimenticio o sistema dado bajo el condicionamiento de factores tanto extrínsecos (temperatura, humedad relativa, características de procesamiento o

almacenamiento) como intrínsecos (pH, $a_{w,}$ flora microbiana presente, presencia de sustancias antimicrobianas) (B.Marks,2008).

Estos modelos pueden describir tanto el crecimiento como la supervivencia o la inactivación de un microorganismo. Para los microorganismos patógenos en alimentos, todos los modelos de crecimiento ignoran la fase de muerte (B.Marks, 2008) y se basan en una curva de crecimiento sigmoide.

Como manera de simplificar y evitar confusiones que pueden surgir de las distintas clasificaciones existentes (modelos probabilístico o cinéticos, empíricos o mecanísticos), los autores Whiting y Buchanan (1993) citados por MacDonald (1999) propusieron un sistema de clasificación en modelos primarios, secundarios y terciarios.

Los modelos Primarios describen cambios en el número de microorganismos en función del tiempo bajo determinadas condiciones ambientales y de cultivo.

El número de microorganismos se obtiene directamente del recuento total de viables, utilizando medidas de nivel de sustrato, de producción de toxina o indirectamente por absorbancia, densidad óptica. Los datos, luego graficados en función del tiempo permiten obtener parámetros de interés biológico como fase lag, velocidad crítica de crecimiento, densidad máxima poblacional, etc.

Los *Modelos Secundarios* describen la relación existente entre parámetros cinéticos de crecimiento de un modelo primario (duración de fase lag por ej) frente a variaciones de condiciones cultivo o ambientales, por ejemplo temperatura, ph, aw (MacDonald *et al*,1999).

Por ejemplo, en el caso de productos congelados o refrigerados, el factor más importante es la temperatura ya que afecta la duración de la fase lag y el tiempo de generación (Shimoni et al, 2000). Entonces, para un microorganismo de interés, los efectos de la temperatura sobre el tiempo de generación, por ejemplo, pueden calcularse utilizando un modelo primario para el rango de temperatura requerido. Los datos obtenidos son luego integrados utilizando un modelo

secundario, de modo que el efecto de la temperatura sea descrito por una ecuación matemática y permita al usuario determinar el tiempo de generación para una temperatura determinada.

Por último, los modelos, tanto primarios o secundarios, puede combinarse con bases de datos para generar una herramienta informática o software para la predicción de curvas de crecimiento e inactivación para esos factores determinados, éstos son los llamados *Modelos Terciarios* (B.Marks, 2008) y que son descritos en detalle en la próxima sección.

7-Herramientas informáticas para la Microbiología Predictiva

Lo anterior expuesto, se engloba dentro de un área de la Microbiología tradicional que ha venido expandiéndose desde hace dos décadas denominada Microbiología Predictiva. Involucra diversas disciplinas como ser Química, Matemáticas y la propia Microbiología.

Utiliza la premisa de reproducibilidad y consistencia de la respuesta del microorganismo frente a factores ambientales similares (MacDonald-D. Sun,1999).

Actualmente las aplicaciones informáticas que existen y que son utilizadas como modelos terciarios, corresponden a portales de libre acceso como Pathogen Modeling Program (desarrollado por USDA) y Combase (desarrollado en colaboración entre distintos organismos como Institute of Food Research de UK, USDA, la Universidad de Tasmania en Australia) y están dirigidos exclusivamente al modelado de curvas para bacterias patógenas en alimentos (McMeekin *et al*, 2006)**.**

En ellos se puede seleccionar el “modelo” (en este caso microorganismo a utilizar) de la lista disponible, fijar valores para factores como pH, temperatura, etc y obtener la curva de crecimiento aproximada.

Los datos con los que se generan estas curvas, son obtenidos a partir de búsquedas bibliográficas, de ensayos de laboratorios (cuando no existen datos para un determinado

patógeno) o de investigaciones previas que luego vuelcan sus resultados, a modo de "donación" en la base de datos del portal.

El acceso a esta base de datos se puede realizar de forma independiente a la función de modelado.

Estos datos son combinados utilizando la ecuación modificada de Gompertz (modelo de crecimiento):

$$y = A \exp \{ -\exp [\mu_m e / A] (\lambda — t) + 1 \}$$

La misma integra parámetros de relevancia biológica como: fase lag λ, velocidad crítica de crecimiento μ_m y tasa máxima de población A (valor de asíntota) (Zweitering et al, 1991).

El uso de estas aplicaciones informáticas ha sido criticado por varios autores (E.Shimoni *et al*, 2000; MacDonald-D. Sun, 1999) donde las principales críticas son:

-La carencia de datos o de ser éstos obtenidos a partir ensayos de laboratorio y no en el propio alimento.

-La necesidad de realizar validaciones si la matriz con la que se trabaja es diferente y la no existencia de un protocolo estándar para estas validaciones.

-No tener en cuenta interacciones entre microorganismos, por ej competencia.

Por ello, los valores obtenidos a partir de medio líquido (el mas comúnmente utilizado) deberán ser tomados más como una estimación de crecimiento que como un valor concreto en si mismo.

A pesar de ello, estas herramientas han probado ser un método rápido y eficaz a la hora de evaluar las consecuencias de introducir cambios en procesos de elaboración, establecer puntos críticos de control en técnicas de HACCP o estimar la exposición del consumidor al patógeno (vinculado con la vida comercial del producto), mas que nada por su fácil uso.

Las condiciones de trabajo *in situ* en la industria frigorífica impiden inocular las medias reses vacunas con los patógenos a estudiar debido al riesgo potencial de contaminación cruzada que esto puede crear. Por otra parte, dada la baja frecuencia con la que los patógenos son detectados en este tipo de establecimientos, se necesita una gran cantidad de ensayos de recuentos microbiológicos para lograr obtener datos útiles.

La Microbiología Predictiva se presenta entonces, como una alternativa a considerar a la hora de necesitar estimar la proliferación bacteriana en muestras en las que, por ejemplo, se sabe *a priori* que estarán en muy bajo número y donde el uso de técnicas microbiológicas habituales no resultan útiles debido a su límite de detección. Y permite en este caso, poder verificar la existencia de crecimiento microbiano sin poner en riesgo de contaminación al producto.

8-Hipótesis y objetivos de trabajo

Hipótesis de trabajo

Según lo discutido por autores referente al modelado del crecimiento bacteriano, son la temperatura y el pH los factores extrínsecos e intrínsecos, respectivamente, más importantes que afectan sustancialmente la cinética de crecimiento (MacDonald-D. Sun, 1999).

Los rangos de temperatura y pH a los cuales trabajan los portales son los siguientes:

Bacteria	Portal	Temp ºC	pH
L. monocytogenes	PMP	4 - 37	4.5-7.5
E.coli O157:H7	PMP	5 - 42	4.5-8.5
Salmonella spp	ComBase	7 - 40	3.9-7.4

Primeramente, el animal ingresa a cámara con temperaturas cercanas a 38ºC para luego comenzar a generarse un gradiente de enfriamiento en la carcasa tanto superficial como interno.

Podemos suponer que, durante las 36hs de maduración las condiciones de T y pH permitirían el crecimiento a una tasa tal que en algunas medias reses los recuentos podrían sobrepasar los límites establecidos en las normativas. Por ejemplo, en el caso de *E.coli O157:H7* se establecen tres niveles de resultados: negativo cuando el recuento es < 0.67 logufc/cm^2 de carcasa, marginal si < 2 log ufc/cm^2 e inaceptable si > 2 log ufc/cm^2 (Federal Register 1996).

El crecimiento bacteriano está principalmente condicionado por la temperatura de cámara. Sin embargo, al introducir un factor externo, como la ES, que aumenta la velocidad de descenso de pH, sería razonable esperar un menor crecimiento bacteriano en las medias reses que hayan sido estimuladas.

Objetivo general y específicos

Los objetivos generales de esta tesina serán:

- Verificar la posibilidad de supervivencia y/o crecimiento bacteriano bajo condiciones de maduración de 36hs en cámara a temperaturas entre +4ºC y +10ºC.
- Evaluar, utilizando herramientas de la Microbiología Predictiva, el crecimiento de bacterias patógenas en condiciones de temperatura y pH variables, que simulen las condiciones de maduración en medias reses con y sin estimulación eléctrica.

Los objetivos específicos serán:

- Determinar el descenso del pH y temperatura en reses sometidas a estimulación eléctrica con aquellas sin estimulación eléctrica.
- Evaluar el tiempo de generación para las distintas bacterias patógenas y su relación con la temperatura y el pH.
- Realizar recuentos de m.o indicadores (*E.coli* genérica, coliformes y Aerobios mesófilos totales) a 12hs y 30hs *post mortem*.

9-Materiales y Métodos

Métodos de muestreo

Se realizó el seguimiento de 66 medias reses de novillos de 4-6 dientes repartidas en 3 faenas consecutivas durante los meses de Setiembre y Octubre.

Dado que cada faena está integrada por varias tropas y que el establecimiento es uno de los mayores exportadores del país, la variabilidad del propio ganado, y de los métodos crianza quedaron representados.

Aplicación de estimulación eléctrica

La aplicación de la estimulación eléctrica de bajo voltaje 40v, 1.5 amp durante 36s se realizó en el mismo local de sangría inmediatamente luego del degüello y de forma alternada(es decir una res si una no). Se registró en planilla si la res fue o no EE, asignándosele un número correlativo a su posición en la faena.

Toma de medidas de ph y temperatura

Cada res entera fue eviscerada y cortada en dos medias reses a lo largo de la columna. Como es habitual, cada media res recibió un mismo número correlativo, que sigue el orden del faenado y sirvió como método de identificación de las medias reses EE y NEE.

Ya en esta etapa, las carcasas EE y las NEE fueron almacenadas en cámara de +4ºC-+10ºC.

En cada faena, se realizó el seguimiento de 11 medias reses derechas y 11 izquierdas, repartiéndose entre EE y NEE.

Se realizó una incisión con chaira desde el costillar hacia el exterior entre la doceava y treceava costilla según especifica la USDA, atravesando el músculo *longissimus dorsi*

Utilizando pHmetro (HANNA 9025c) con electrodos de pincho, se tomaron medidas de pH insertándolo en el músculo desde el exterior para los siguientes tiempos: 4hs, 12hs, 16hs, 20hs, 24hs, 30hs y 36hs.

Para los mismos tiempos, se registró la temperatura a nivel muscular con la sonda de temperatura del pHmetro.

El electrodo fue enjuagado con agua destilada entre medidas y fue cambiado periódicamente a fin de evitar su saturación.

El pHmetro fue calibrado al comienzo de cada toma de medidas y cada vez que fue cambiado el electrodo, utilizando para ello buffers pH 7 y pH 4.

Se colocaron termorregistradores (Hobo) de manera subcutánea en el miembro delantero (punto de muestreo microbiológico) de varias medias reses de distintas faenas que registraron la temperatura superficial a los tiempos de interés.

Toma de muestras para recuentos

Para la toma de muestra, se utilizaron medias reses diferentes de las seleccionadas para las medidas de pH y temperatura pero de las mismas faenas. Se realizaron 30 muestreos repartidos en las 3 faenas. Dieciséis medias reses fueron muestreadas a las 12hs *post mortem* y analizadas para Aerobios totales. De ellas, sólo diez fueron además analizadas para *E.coli* genérica y coliformes. Otras catorce medias reses fueron muestreadas a las 30hs *post mortem* y analizadas para Aerobios totales mientras que en nueve también se analizaron para *E.coli* genérica y coliformes.

El procedimiento de toma de muestra se realizó siguiendo lo establecido por la reglamentación norteamericana, estipulado en Rules and Regulations del Federal Register(ver Anexo I). Esta normativa establece tres puntos de toma de muestra a ser: pecho, falda y porción trasera; sin embargo en este caso se resolvió tomar las muestras de los tres puntos que registraran mayor

temperatura superficial, como forma de evaluar el peor escenario en término de inocuidad. Los puntos más calientes fueron identificados previamente utilizando termómetro infrarrojo, seleccionándose los siguientes sitios: A- zona lumbar; B-extremo superior del miembro delantero a nivel de articulación y C- región interna a nivel de la segunda y tercera costilla, según indican las figuras 1 y 2.

Se utilizó un marco de metal de 100cm^2 para delimitar cada zona a muestrear, el mismo fue desinfectado con alcohol posteriormente a la toma de muestra de cada media res. Se procedió a la toma de muestra utilizando una esponja estéril (contenida en una bolsa) e hidratada con 10mL de solución buffer de Butterfield diluído (17.3.04B AOAC). Se utilizó una sola esponja por cada media res con la cual se muestrearon los tres puntos siguiendo el orden A-B-C en un área total de 300cm^2. Posteriormente al muestreo, se agregaron 15 mL de solución buffer de Butterfield diluído.

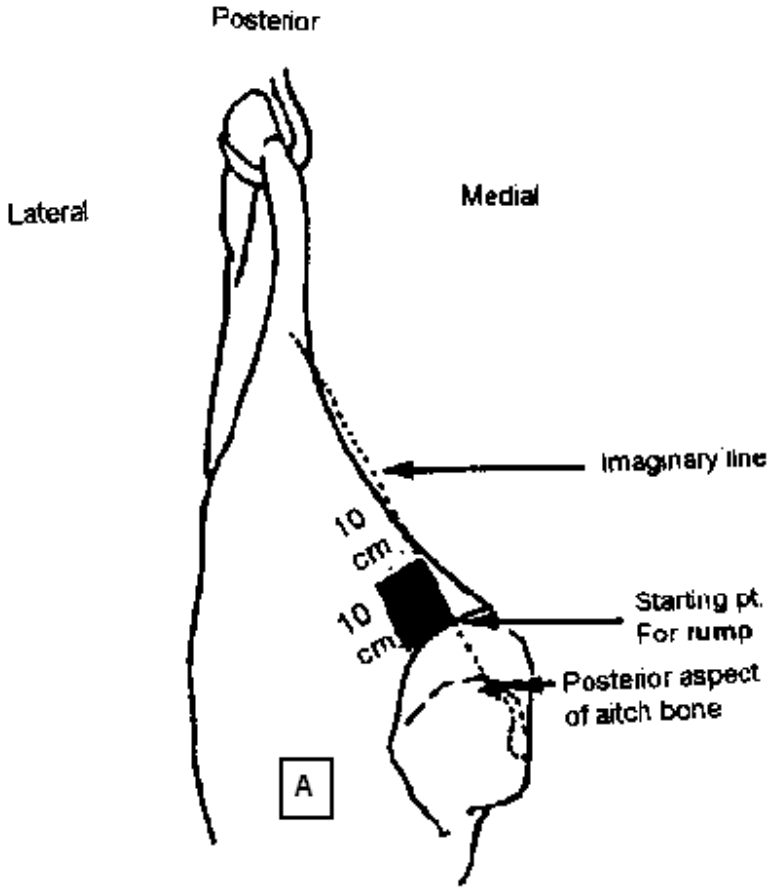


Figura 1. Esquema de carcasa zona posterior. *Delimitado por cuadrado* en negro *se indica zona de muestreo especificadas por USDA, "A" encerrada en cuadro: zona encontrada más caliente*.

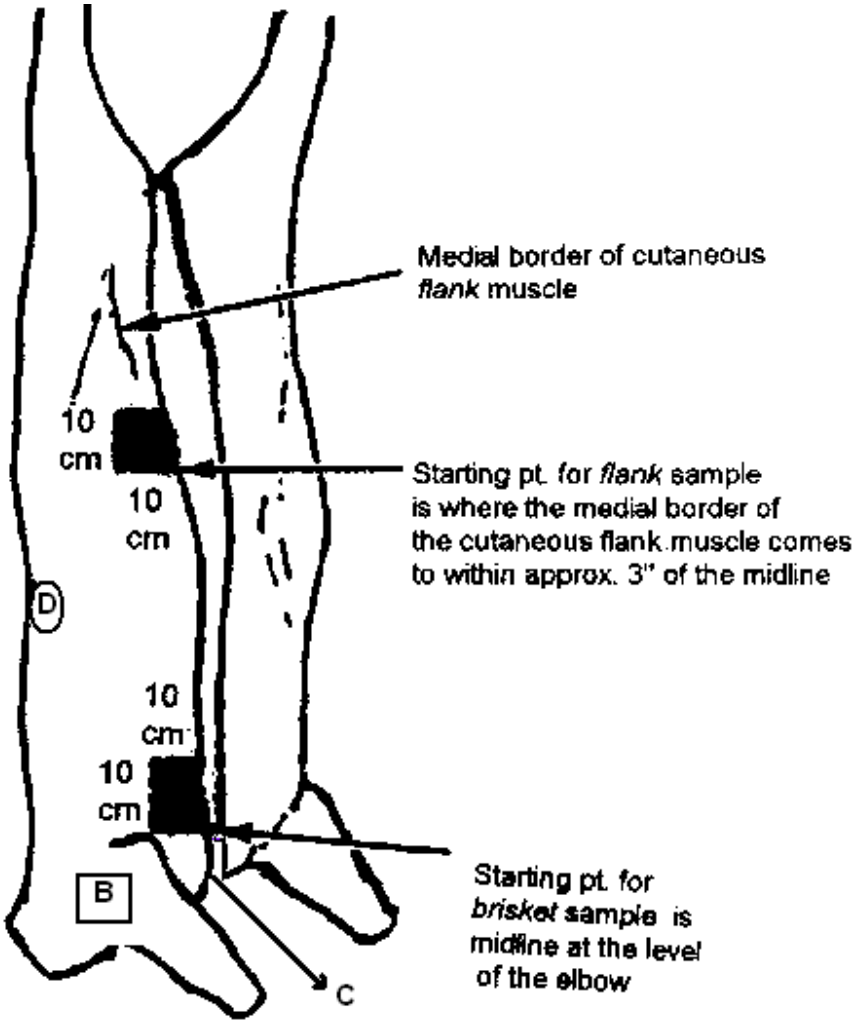


Figura 2. Esquema de carcasa ventral. *En cuadros negros se indican los lugares especificados por la USDA para muestreo, "B" y "C" son los puntos mas calientes***.** "D" *indica lugar de inserción de electrodos para toma de ph.*

Siembra de E.coli/coliformes y Aerobios totales

Las siembras de *E.coli* genérica y coliformes totales se realizaron inoculando 1ml de la solución de Butterfield contenida en la bolsa de la esponja en placa de Petrifilm^{MR} (3M) para *E.coli* /coliformes totales.

En el caso de los aerobios, se inoculó 1ml en placa de Petrifilm^{MR}(3M) para Aerobios totales y además se realizó dilución de 1:10 con solución salina de la que también se plaqueó 1ml.

Se realizó un ensayo de control negativo para cada tipo placa dado que la solución que se utilizó fue de un mismo lote.

Todas las placas inoculadas se mantuvieron en estufa a 36ºC durante 24hs para *E.coli* /coliformes y 48hs para Aerobios.

Análisis de datos

Curvas

Los valores de T y pH obtenidos se promediaron para generar curvas de *T vs t* y *pH vs t.* Los valores correspondientes a t_o fueron definidos como pH=7 y T=38ºC.

Se generaron curvas de evolución de t_g *vs T* a partir de valores obtenidos de los portales.

Test estadístico

Las medidas de pH y T fueron sometidas a un análisis estadístico utilizando el test F y test de Student.

Recuentos

Los valores de recuentos obtenidos fueron expresados como log ufc/cm^2. En el caso de Aerobios se calculó el promedio entre la dilución 0 y -1.

Los resultados se expresaron para *E.coli* genérica y coliformes como <0.1 log ufc/cm^2 para placas que contenían menos de 15 colonias y >1.1 log ufc/cm^2 para placas con más de 150 colonias. Para Aerobios como <0,32 log ufc/cm^2 para placas con menos de 25 colonias y >1,9 log ufc/cm^2 para placas con más de 250 colonias. En ambos casos, los valores intermedios pudieron ser contados directamente de la placa, ajustados y expresados como log ufc/cm^2 (ver Anexo II y III).

Utilización de modelos terciarios de crecimiento

Los valores de pH y T superficial se utilizaron para generar curvas de crecimiento predictivas a partir de los portales disponibles de Combase Predictor y Pathogen Modeling Program. Combase se utilizó para la curva de *Salmonella spp* (en este caso se utilizó el modelo *Salmonella con* CO_2 y se definió en cero el nivel de CO_2), mientras que para las curvas de *E.coli O157:H7* y *Listeria monocytogenes* se utilizó *Pathogen Modeling Program.*

Siempre que fue posible se seleccionó el modelo para crecimiento aerobio en medio líquido.

Los valores utilizados correspondieron a los que excluyeron la fase lag, ya que a T> 10ºC los microorganismos se encontraban en condiciones óptimas de crecimiento. Cuando se utilizó Combase, que a diferencia de PMP, no provee directamente los valores No lag, se estableció en 1 el "Estado Físico" (Physical State).

Debido a que estos portales presentan modelos diseñados para temperaturas constantes (PMP), se aplicó el método sugerido en la sección FAQs en el sitio web de PMP de la siguiente manera:

-Se calcularon los log ufc/ml para cada temperatura y valor pH obtenido al tiempo de interés de manera independiente, en todos los casos se mantuvo el nivel inicial del inóculo en 3 log ufc/ml (como se sugiere por defecto).

Para simplificar, para t_0, se asumió que la res estuvo 4hs a T_0 y se anotó el valor de log ufc_0 que la curva indica para este tiempo. Para la siguiente medida, t_1 se asumió que estuvo 12hs a T_1y se anotó el valor de log ufc_1 que la curva indica a las 12hs y así sucesivamente. Debido al desfasaje que se creó, ya que pasó a ser t_0=4hs, se tomó como t final 40hs, igualmente esto fue solo utilizado al momento del cálculo y no se reflejó en las curvas de crecimiento.

-A los valores obtenidos, para cada temperatura y pH, se le restó el nivel del inóculo inicial fijado en 3.

-Las diferencias fueron sumadas para obtener la predicción del crecimiento en el rango de tiempo necesario (es decir a t=4hs, el log ufc correspondió a log ufc_0+ log ufc_1) hasta alcanzar

aproximadamente las densidades máximas de población. En ese momento, se consideró que la población se mantendría constante.

Cuando se utilizó el portal Combase, se promediaron los dos valores más cercanos al t de interés.

Si alguno de los valores de temperatura no estaba dentro del rango del portal se asumió que el crecimiento sería mínimo y la población se mantendría constante.

Los valores finales fueron utilizados para graficar la curva de crecimiento con el perfil de temperatura variable de interés.

Para cada temperatura y pH se anotó el t_g indicado por el portal y se graficó la evolución del mismo.

10-Resultados

Enfriamiento de carcasa a nivel muscular

Desde el momento del sacrificio hasta que las medias reses ingresan a cámara transcurrieron aproximadamente 1.5-2 hs. El descenso de temperatura en estas primeras horas no solo es debido a la muerte del animal sino al flujo de aire frío al que se someten las medias reses en la línea de circulación continua en la antesala de la cámara.

Tanto los valores promedios de temperatura como la dispersión calculada fueron muy parecidos entre grupos NEE y EE (Tabla 1), siendo el perfil de enfriamiento de las carcasas a nivel del músculo *longissimus dorsi*, muy similar para estos dos grupos.

Como se aprecia en la fig.3, la temperatura de las medias reses EE y NEE desciende rápidamente en las primeras doce horas para luego comenzar a hacerlo más lentamente, aproximadamente 1.5ºC entre medidas. A partir de las 24hs comienza una tendencia a la estabilización finalizándose por alcanzar temperaturas cercanas a las de cámara.

La cinética de enfriamiento superficial de las medias reses también fue parecida aunque se registraron valores significativamente superiores (Tabla 1) a la temperatura muscular a t12, t16, t20 y t24 (fig 3). El punto de medida de temperatura superficial corresponde a uno de los puntos definidos como más calientes, con gran cantidad de masa muscular que ayudan a conservar el calor. En cambio, el músculo *longissimus dorsi* posee poca cantidad de masa muscular y queda más accesible al aire frío luego de realizársele la incisión.

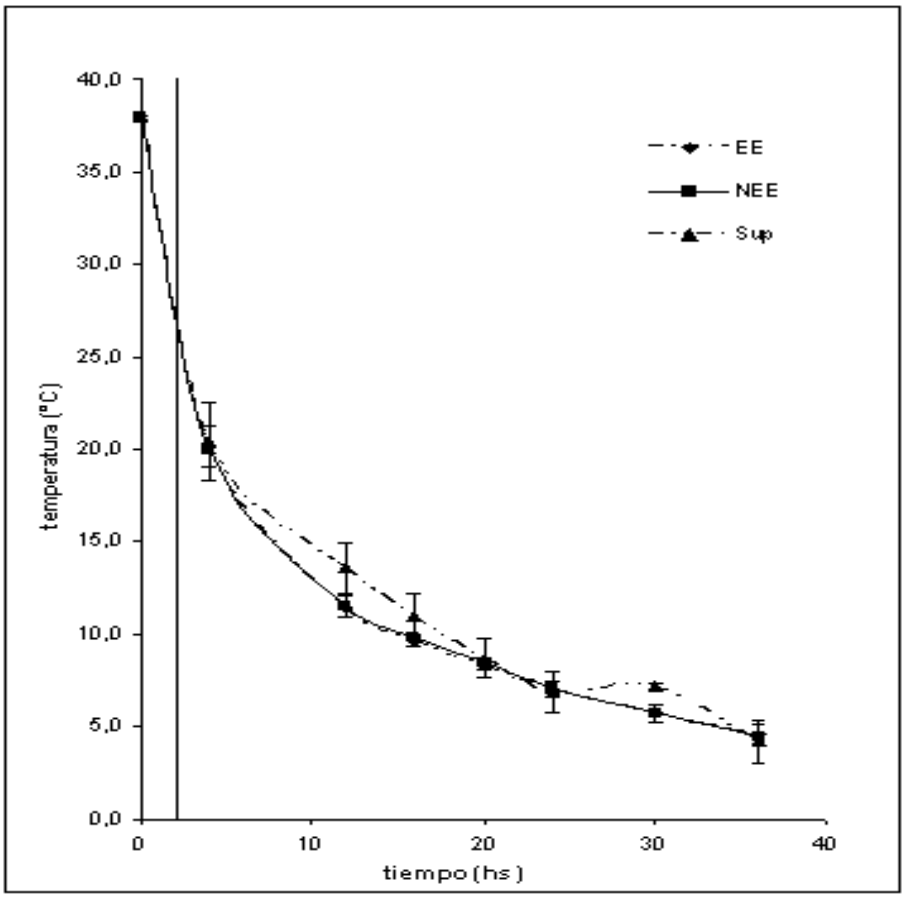


Figura 3. Perfil de enfriamiento en el músculo *longissimus dorsi y superficie.* *La línea vertical indica aproximadamente el momento en que las medias reses ingresan a cámara de T= +4ºC.-+10ºC. Barras en cada punto indica IdC.*

La variabilidad en la temperatura entre reses al ingreso a cámara de maduración puede ser consecuencia de la variación en el peso original de los animales, del índice de grasa, etc. El tiempo transcurrido en cámara hace que estos valores confluyan hacia valores similares.

La estimulación eléctrica no añade cambios que puedan modificar el perfil de enfriamiento de la carcasa a nivel muscular. Independientemente de ello, es esperable que con o sin estimulación eléctrica, la temperatura superficial de ciertas zonas de la carcasa permanezca más elevada.

Tabla 1. Análisis estadístico para valores de temperatura muscular y superficial.

Promedio	**t4**	**t12**	**t16**	**t20**	**t24**	**t30**	**t36**
EE	20,1	11,4	9,7	8,3	7,1	5,7	4,6
NEE	20,0	11,5	9,8	8,4	7,1	5,7	4,5
Sup	20,4	13,5	11,0	8,7	6,9	7,1	4,2
IdC	**t4**	**t12**	**t16**	**t20**	**t24**	**t30**	**t36**
EE	1,1	0,6	0,3	0,3	0,3	0,5	0,5
NEE	1,2	0,6	0,3	0,3	0,3	0,5	0,5
Sup	2,1	1,4	1,2	1,0	1,1	0,2	1,1
Var	***S^2 t4***	***S^2 t12***	***S^2 t16***	***S^2 t20***	***S^2 t 24***	***S^2 t 30***	***S^2 t 36***
EE	11,44	2,93	0,80	1,07	0,84	1,85	2,26
NEE	12,00	3,34	0,79	0,98	0,74	2,03	2,11
Sup	12,72	5,65	4,20	3,07	3,17	0,15	3,77
Prueba F	**t4**	**t12**	**t16**	**t20**	**t24**	**t30**	**t36**
S^2_{NEE}/ S^2_{EE}	1,05	1,14	1,27	1,02	1,13	1,10	1,07
S^2_{Sup}/S^2_{NEE}	1,06	1,69	5,31	3,12	4,26	0,07	1,78
S^2_{Sup}/S^2_{EE}	1,11	1,93	5,27	2,87	3,77	0,08	1,66

p-valor= 1.84

Perfil de descenso de pH

Los datos promediados de pH (ver fig.4) muestran un comportamiento representativo de la operativa del establecimiento y corroboran un descenso de pH más rápido en las primeras horas post mortem en aquellas reses que fueron eléctricamente estimuladas, aproximadamente hasta las 12hs, en comparación con las no estimuladas.

En estas medias reses, los valores de pH por debajo de 5.8 ya se observan alrededor de las 8hs post mortem. Además, la etapa de estabilización del pH comienza más tempranamente que en las NEE, hacia las 16hs *post mortem*.

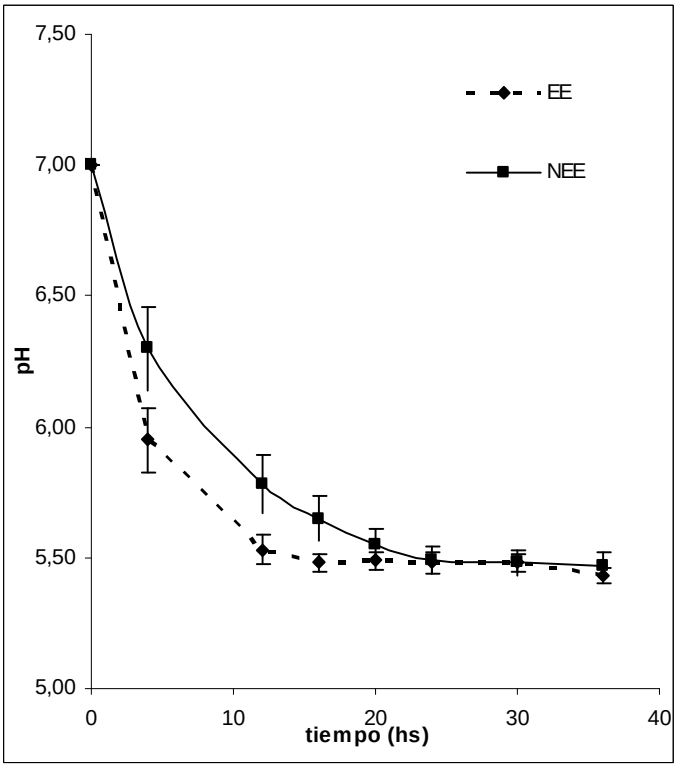


Figura 4. Curva de descenso de pH promedio. *Las barras verticales corresponden al Intervalo de Confianza.*

En las reses NEE, a pesar de que en las primeras 12hs post mortem el pH cae rápidamente, el descenso es más lento en comparación con las EE.

Valores de pH menores a 5.8 son registrados hacia las 12hs y la estabilización llega hacia las 24hs post mortem. Recién allí, las reses NEE alcanzan valores de pH similares que las EE.

En ambos casos, el rápido descenso de pH se da prácticamente en el mismo momento que la temperatura también está descendiendo abruptamente.

Los valores de pH fueron menos dispersos en el grupo EE (Tabla 2). La EE hace que las medias reses estimuladas alcancen el equilibrio en menor tiempo.

Tabla 2. Análisis estadístico de valores de pH

Promedio	**t4**	**t12**	**t16**	**t20**	**t24**	**t30**	**t36**
EE	5,95	5,53	5,48	5,49	5,48	5,48	5,43
NEE	6,30	5,78	5,65	5,55	5,49	5,48	5,47
IdC	**t4**	**t12**	**t16**	**t20**	**t24**	**t30**	**t36**
EE	0,12	0,05	0,03	0,03	0,04	0,04	0,03
NEE	0,16	0,11	0,09	0,06	0,05	0,05	0,05
Var	S^2 ***t4***	S^2 ***t12***	S^2 ***t16***	S^2 ***t20***	S^2 ***t 24***	S^2 ***t 30***	S^2 ***t 36***
EE	0,131	0,026	0,010	0,010	0,016	0,013	0,008
NEE	0,218	0,105	0,067	0,033	0,024	0,020	0,021
Prueba F	**t4**	**t12**	**t16**	**t20**	**t24**	**t30**	**t36**
S^2_{NEE}/ S^2_{EE}	1,67	4,05	6,50	3,28	1,47	1,53	2,59

p-valor= 1.84

El test estadístico aplicado (Tabla 2), mostró diferencias en los valores de pH a partir de las 12hs y hasta las 20hs *post mortem,* probablemente como consecuencia del descenso de pH acelerado en las medias reses EE.

Curvas predictivas de crecimiento

La Microbiología Predictiva muestra que existe probabilidad de crecimiento bacteriano en el rango de temperatura que registran las medias reses para los microorganismos considerados (fig 5).

Al parecer, es en las primeras 4hs donde se produce una mayor proliferación, que se evidencia por una pendiente mayor como muestran las figs 5, 6 y 7.

Este tiempo coincide con un registro de temperaturas cercanas a 20ºC.

Las condiciones de pH y T obtenidas del grupo NEE registraron valores de log ufc/mL mayores a los registrados para las condiciones del grupo EE para cualquiera de los patógenos, esto sucede hasta alcanzar la densidad poblacional máxima respectiva a cada patógeno.

E.coli O157:H7 alcanza su densidad poblacional máxima en menor tiempo que los otros patógenos, hacia las 16hs (Fig.5). Mientras, *L. monocytogenes* continúa en fase de crecimiento en el período de tiempo de interés (densidad max: 9.57 log ufc/mL)(fig 6).

Hacia las 20hs, *Salmonella spp*, alcanza la densidad máxima poblacional (fig 7). Restricciones propias del modelo no permiten realizar predicciones por debajo de 7ºC. A temperaturas <7ºC si bien existe crecimiento de *Salmonella spp,* éste será lo suficientemente lento como para que los cambios no sean apreciables dentro del período de maduración restante y dado que la población ya alcanzó su densidad máxima se asumió que se mantendría constante.

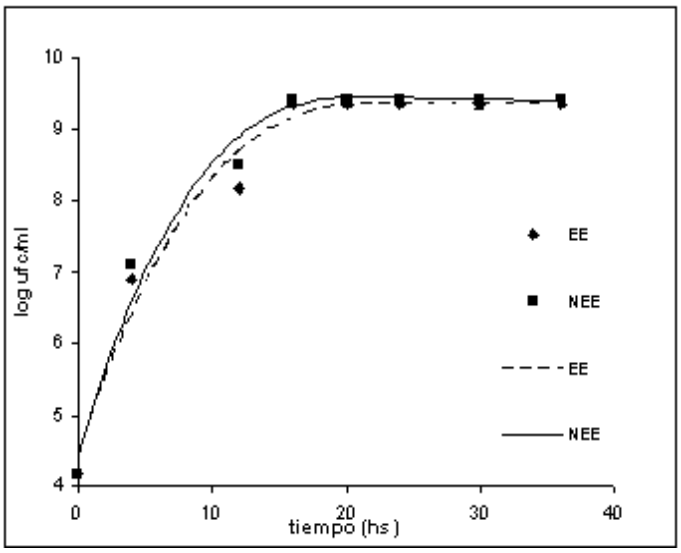


Figura 5. Curva de crecimiento predictivo de *E.coli O157:H7*

(Densidad máx 9.4log ufc/mL)

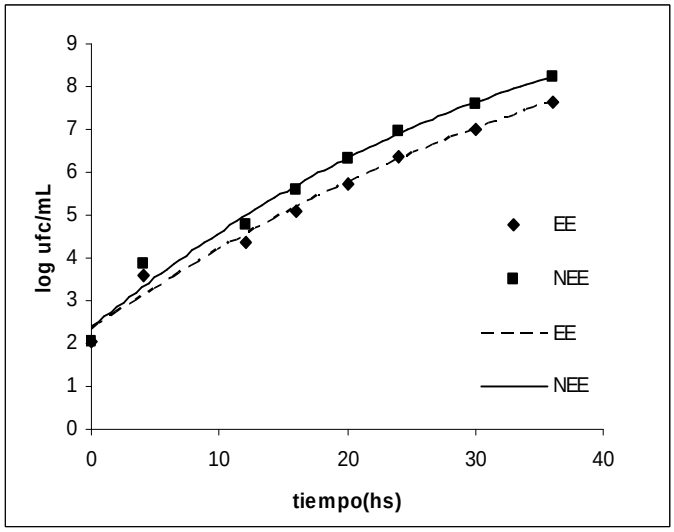


Figura 6. Curva de crecimiento predictivo de *Listeria monocytogenes*. *(Densidad máxima 9.57 log ufc/mL)*

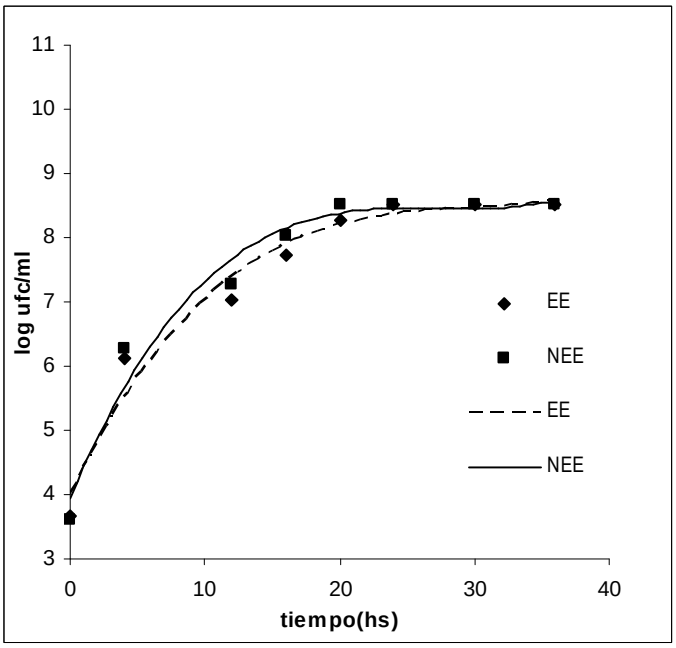


Figura 7. Curva de crecimiento predictivo de *Salmonella spp*. *(Densidad máxima 8.52 log ufc/mL)*

Como es de esperar, los t_g siguen una relación inversa con la temperatura, ha medida que ésta última desciende, los t_g comienzan a aumentar (ver figs 8 y 9).

En cualquiera de los casos, las bacterias pasan de tener tiempos de generación desde 15-30 minutos cuando las temperaturas son lo suficientemente altas, cercanas a 20ºC, a tiempos de

generación entre 14hs y más de 1 día para cuando la temperatura superficial es cercana a +4ºC.

Esto coincide con lo observado en las figs 5, 6 y 7 donde se indicó que el mayor crecimiento se dio dentro de las primeras 4hs post mortem.

Cuando se comparan los t_g de las bacterias entre sí, se observa el mismo patrón ya sea en las condiciones de reses EE o NEE: es *E.coli O157:H7* la que registra tiempos de generación menores mientras que *L. monocytogenes* es la que tiene siempre un t_g mayor a las demás.

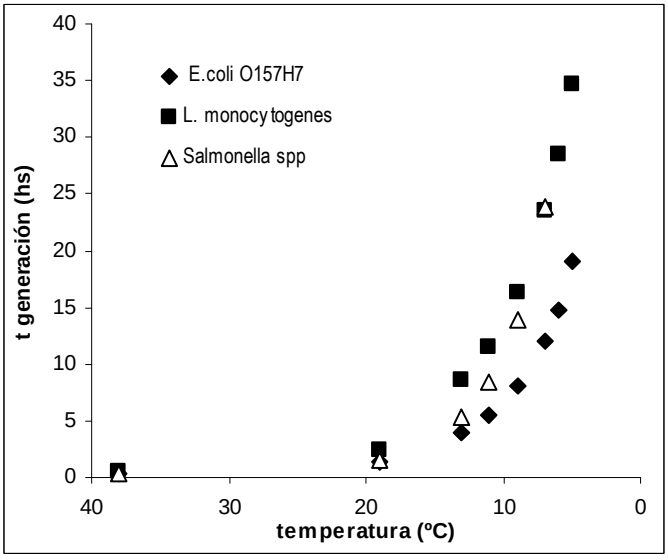


Figura 8. Evolución de t_g con la temperatura para medias reses EE

Los t_g para las condiciones del grupo NEE tendieron a ser menores, sobretodo para *L. monocytogenes*, que los observados en el grupo EE, sin embargo estas diferencias no resultaron ser significativas (no se muestran datos). Hasta las 20hs *post mortem*, estas diferencias podrían corresponder al efecto conjunto que tiene el descenso del pH y de temperatura sobre los t_g. Mientras que pasadas las 20hs, el pH ya se ha estabilizado para ambos grupos de estudio, pero los t_g continúan variando de una medida a otra como consecuencia del descenso de temperatura únicamente.

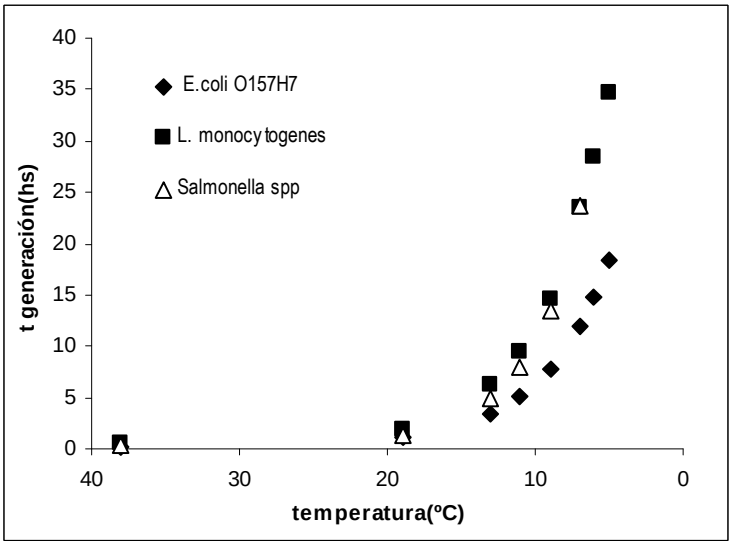


Figura 9. Evolución t_g con la temperatura en medias reses NEE

Recuentos de microorganismos indicadores

Debido a la dinámica del establecimiento, el muestreo de las 12hs fue independiente del de las 30hs por haber sido tomado de individuos distintos.

Las mayoría de las medias reses analizadas a las 12hs, no presentaron contaminación por *E.coli genérica* u otros coliformes y si lo hicieron fue por debajo del rango de conteo recomendado por Petrifilm^{MR} (<0.1log ufc/cm^2). Sólo una media res presentó contaminación pero dentro del nivel aceptable (0.7 log ufc/cm^2). Hacia las 30hs vuelven a observarse reses con valores de log ufc/cm^2 bajos, comprendidos dentro de los reglamentarios, pero 1 media res para *E.coli genérica* y otra para coliformes presentaron valores por encima del rango de detección del Petrifilm^{MR} (>1.1log ufc/cm^2). Esta media res podría estar superando los límites reglamentarios según el Federal Register (> 2 log ufc/cm^2) y sería inaceptable para el consumo. En este caso, debería de procederse a realizar una dilución a fin de lograr determinar la carga microbiana de la media res.

En el caso de Aerobios, se observaron recuentos mayores y más variables que para *E.coli* genérica y coliformes. A las 12hs el 19% de las medias reses presentó crecimiento menor a 0.32 log ufc/cm^2, el 62% tuvo crecimiento comprendido dentro del rango de recuento

recomendado por el fabricante, esto es entre 0. 32log ufc/cm^2 y 1.9log ufc/cm^2 y el 19 % restante tuvo valores de crecimiento mayores a 1.9log ufc/cm^2. A las 30 hs los porcentajes fueron del 36% para crecimiento menor a 0.32log ufc/cm^2, 43% dentro del rango y 21% por encima de 1.9log ufc/cm^2.

El test de Student aplicado a los datos obtenidos de los recuentos para m.o indicadores no mostró diferencias significativas para *E.coli* genérica, otros coliformes ni aerobios. Sin embargo estos recuentos indican que pasadas 30 horas de maduración y a temperaturas entre +4ºC y +10ºC es posible que los m.o aún puedan sobrevivir. Estos resultados avalan los obtenidos para patógenos con Microbiología Predictiva donde se encontró que en medio líquido es esperable que exista crecimiento.

Tabla 3. Recuentos de m.o

E.coli genérica (log ufc/cm^2)		**Otros Coliformes (log ufc/cm^2)**		**Aerobios 12hs**		**Aerobios (ufc/cm^2) 30hs**	
12hs	30hs	12hs	30hs	Promedio (ufc/cm^2)	Log ufc/cm^2	Promedio (ufc/cm^2)	Log ufc/cm^2
<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<2,1	<0,32	<2,1	<0,32
<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<2,1	<0,32	<2,1	<0,32
<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<2,1	<0,32	<2,1	<0,32
<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	2,6	0,4	<2,1	<0,32
<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	3,0	0,5	<2,1	<0,32
<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	7,7	0,9	3,0	0,5
<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	10,5	1,0	7,2	0,9
<0.1	0,7	0.2	<0.1	12,0	1,1	11,7	1,1
<0.1	>1.1	0.4	>1.1	12,5	1,1	16,7	1,2
0.7		>1.1		14,2	1,2	29,2	1,5
				19,5	1,3	50,8	1,7
				24,0	1,4	>83,3	>1,9
				33,4	1,5	>83,3	>1,9
				>83,3	>1,9	>83,3	>1,9
				>83,3	>1,9		
				>83,3	>1,9		
M.o	**E.coli genérica**	**Otros colif**		**Aerobios**			
t	0.57	0.92		0.73			

P>0.05

11-Discusión

Las reses que fueron eléctricamente estimuladas no presentaron diferencias en cuanto a su perfil de enfriamiento con respecto a las no estimuladas, lo que hace a esta práctica un procedimiento completamente seguro, que no añade factores de riesgo en lo que respecta a sus consecuencias sobre la maduración de las carnes.

La LV-ES sustituye los impulsos nerviosos que llegan al músculo para inducir su contracción (Hollung *et al*, 2007). Como consecuencia, en las medias reses EE, se agotan mas rápidamente las reservas de glucógeno lo que incrementa la velocidad de descenso del pH en las primeras 12hs post mortem. Esta condición permite alcanzar valores de pH cercanos al punto isoeléctrico de las proteínas (alrededor de 5.4) en un tiempo menor. Dado que la actividad de las proteínas cesa cuando se alcanza el punto isoeléctrico (Zimerman,2006), la etapa de estabilización del pH también se registra en menor tiempo.

En medias reses NEE, donde la actividad muscular comienza a disminuir como resultado del estado de mortalidad, el descenso de pH es más lento, el glucógeno se consume a menor velocidad y la estabilización se alcanza en un tiempo mayor.

En ambos grupos, al mismo tiempo que la temperatura va disminuyendo rápidamente también se produce el descenso rápido del pH.

La estimulación eléctrica añade un plus que permite mantener y que además, podría acelerar la actividad muscular por lo que debería reflejarse en un consumo de glucógeno más rápido en aquellas medias reses EE (Hollung *et al*, 2007). Para verificar esta nueva hipótesis será necesario medir la concentración de glucógeno en distintos tiempos.

El pH y la T son factores que influyen sobre el crecimiento bacteriano por lo que lograr disminuir más rápidamente cualquiera de ellos afectaría la carga bacteriana presente.

Los diferencias en los t_g entre grupos EE y NEE durante las primeras 12hs *post mortem* y a temperaturas comprendidas entre 14ºC y 20ºC para ambos, sugieren que son debidas a los distintos valores de pH que se obtuvieron para cada grupo.

Alcanzar valores de pH≤ 5.8 en tiempos menores que lo actuales permitiría no sólo disminuir los tiempos de generación bacterianos, sino poder realizar la maduración a temperaturas de cámara menores sin afectar la calidad de la carne.

Además, el comportamiento de las bacterias patógenas consideradas, según la Microbiología Predictiva es similar en cuanto a que las tres podrían crecer en un medio de cultivo a temperaturas y pH del ensayo. Los medios líquidos corresponden a estándares, por lo que podrían haber diferencias una vez translocados a la matriz carne. Igualmente resulta práctico su uso con el fin de estimar los crecimientos de estos patógenos como forma de análisis de la calidad cárnica o de la aplicación de las normas de calidad y seguridad alimentaria del establecimiento en su conjunto.

En los tres casos, el mayor crecimiento se dio en las primeras horas cuando las temperaturas superficiales se encontraban entre 12ºC-20ºC y el pH >5.5, esto se evidencia cuando se observan las curvas de crecimiento cuya pendiente es mayor para este tiempo y que coincide con los menores t_g.

De los tres patógenos, la Microbiología Predictiva indica que antes de las 36hs (tiempo de maduración al que se someten las medias reses) y en medio líquido, *E.coli O157:H7* y *Salmonella spp* ya han alcanzado la máxima densidad poblacional. *L. monocytogenes* presenta los menores valores de log ufc/mL, los t_g registrados para este patógeno son también mayores en comparación con los de los otros patógenos.

El propio ganado muestra una gran variabilidad en cuanto a la cantidad de m.o entre reses. El set de muestras considerado no permite definir claramente si, efectivamente un mayor tiempo de maduración deriva en una mayor carga microbiana. Pero sí es concluyente en que, en las condiciones adversas de bajos valores de pH y bajas temperaturas de cámara, los m.o sobreviven. Esto se demostró con los recuentos de Aerobios totales a 30hs *post mortem* donde en condiciones de pH ≤ 5.8 y temperaturas superficiales de 5.7ºC se obtuvo un 64% de placas con colonias.

Parece ser acertado indicar que cuando una media res ingresa a cámara ya con valores intermedios o elevados de m.o, al finalizar la maduración, la carga microbiana continuará siendo por lo menos igual. Como se observó, los patógenos son capaces de sobrevivir en el rango de temperatura considerado y al presentar inicialmente una carga microbiana alta, podemos suponer que podría estar aumentando la probabilidad de encontrar patógenos en aquellas medias reses.

Mas aún, el riesgo de encontrar patógenos aumentaría en carnes procesadas (como la de hamburguesas) compuestas por carnes de distintos cortes y de distintos animales.

12-Conclusiones finales

● La estimulación eléctrica aumenta considerablemente la velocidad de degradación de glucógeno que resulta en un descenso de pH incrementado por acumulación de ácido láctico.

● El uso de la estimulación eléctrica no incide en el perfil de enfriamiento de la media res.

● La aplicación de este método o de noqueo eléctrico podría contribuir a generar ambientes mas inhóspitos para el crecimiento bacteriano y disminuir la velocidad de crecimiento de los m.o presentes.

● Las condiciones actuales de temperatura y pH que se registran durante la maduración de las medias reses permiten que se alcancen los máximos valores de densidad poblacional correspondientes a un medio líquido para *E.coli O157:H7* y *Salmonella spp* y permiten que *L.monocytogenes* continúe en fase de crecimiento.

● De darse contaminación en alguno de los puntos más calientes de la carcasa, las condiciones actuales de maduración podrían permitir la proliferación de patógenos, según lo reflejado por la Microbiología Predictiva.

● Los recuentos de m.o muestran que una maduración prolongada con temperaturas entre +4ºC y +10ºC permite la supervivencia de bacterias.

Finalmente, sería recomendable reducir los tiempos de maduración dado que valores de pH ≤5.8 se alcanzan con anticipación a las 36hs. Y utilizar de ser necesario, LV-ES como método para acelerar el descenso del pH y asegurar la inactivación del FMDV.

13-Referencias

- Aggelis. G, Samelis. J, Metaxopoulos, 1998. A novel modelling approach for predicting microbial growth in a raw cured meat product stored at 3ºC and at 12ºC in air. International Journal of Food Microbiology 43, 39-52.
- Ahmad. A, Zurek. L, 2006. Evaluation of the anti-terminator Q933 gene as a marker for *E.coli O157:H7* with high Shiga toxin production. Current Microbiology vol 53, pags 324-328.
- Alberts. B, Watson. J. Biología Molecular de la célula. Tercera edición. Pags 908-918.
- Bandman. E, 1992. Changes in myofribrillar and cytoskeletal proteins in post mortem muscle. Reciprocal Meat Conference Proceedings, Volume 45, 49-50.
- Baranyi. J, Roberts. T, 1995. Mathematics of predictive food microbiology. International Journal of Food Microbiology 26, 199-218.
- Bosilevac, J.M., Guerini, M.N., Harthay, D.M., Arthur, T.M., koohmaraie, M. (2007). Microbiological characterization of imported and domestic boneless beef trim used for ground beef. Journal of Food Protection 70(2):440-449
- Brito. G, C. Fiol, J. M. Soares de Lima, M. del Campo, 2006. Effects of electrical stunning and stimulation on meat quality under commercial conditions in Uruguayan beef cattle. Programa Nacional de Carne y Lana, INIA Tacuarembó, 45000 Tacuarembó, Uruguay
- Bruce. H, 2004.A note on the suitability of an exponential equation to characterize pH decline corrected for muscle temperature in bovine muscle early postmortem. Meat Science 66, 507-512.
- Buchanan. R, Stahl. H, Whiting. R, 1989. Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride and sodium nitrite on the growth or *Listeria monocytogenes.*
- Carney.E, O' Brien. S, Sheridan. J, Mc Dowell. D, Blair. I, Duffy. G, 2006. Prevalence and level of *Escherichia coli O157* on beef trimmings, carcasses and boned head meat at beef slaughter plant. Food Microbiology 23, 52-59.
- Combase Predictor disponible online en http://www.combase.cc/
- Federal Register. Guidelines for Escherichia coli testing for process control verificarion in cattle and swine slaughter establishments. July 25th, 1996, , vol 61 nº 144. Rules and Regulations, 38929-38939.

- Foley.S, Lynne.A, 2008. Food animal associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antrimicrobial resistance. J Anim Sci 2008.86:E173-E187.
- The Center for Food Security and Public Health, Iowa State University, Institute for International Cooperation in Animal Biologics, OIE, 2007.Foot and Mouth Disease.
- Gadea, Pilar, Varela, Gustavo, Bernarda, Mercedes *et al*. Primer aislamiento en Uruguay de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga del serotipo O157:H7 en una niña con síndrome urémico hemolítico. *Rev. Méd. Urug.*, mar. 2004, vol.20, no.1, p.79-81. ISSN 0303-3295.
- Gadiyaram. K, Kannan. G, Pringle. T, Kouakou. B, McMillin. K, Park. Y, 2008. Effects of postmortem carcass electrical stimulation on goat meat quality characteristics. Small Rumiant Research 78, 106-114.
- Geesink. G, Mareko. M, Morton. J, Bickerstaffe. R, 2001. Electrical stimulation, when more is less. Meat Science 57, 145-151.
- Germini. Andrea, Masola. Anaelisa, Carlevari. Paola, Marchelli. Rosangela, 2009. Simultaneous detection of *E. coli O157:H7, Salmonella spp*. and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR. Food Control 20. 733-738.
- Ghandi.M, Chikindas. M.L, 2007. Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive. International Journal of Food Microbiology 113, 1-15.
- Gil.A, 2004. Estimation of high risk limits for *Escherichia Coli O157:H7* in Uruguayan red meat. June Report. INAC.
- Gill.C, Badoni. D, 2000. Microbiological Sampling of Carcasses by Excision or Swabbing. Journal of Food Protection, vol 63 nº2 pags 167-173.
- Gill.C, Badoni. M, 2005. Recovery of bacteria from poultry carcasses by rinsing, swabbing or excission of skin. Food Microbiology 22, 101-107.
- Gill. C, Hamer. D. 2001. Foodborne illnesses. Pags 23-36
- Gulbahar. M, Davis. W, Guvenc. T, Yarim. M, Parlak. U, Kabak. Y. 2007.
- Guerrero. O, Vilca. M, Ramos. D, Lucho. E. Falcón. N, 2004. Estimulación eléctrica de canales de alpacas para mejorar su calidad organoléptica. Rev Inv Vet Perú, 15(2):151-156.
- Hollung. K, Veiseth. E, Frostein. T, Aass. L, Langsrud. O, Hildrum. K, 2007. Variation response to manipulation of post-mortem glycolisis in beef muscles by low voltage stimulation and conditioning temperature. Meat Sciencie. Available online at www.sciencedirect.com

- Hwang. H, Devine. C, Hopkins. D, 2003. The biochemical and physical effects of electrical stimulation on beef and sheep meat tenderness. Meat Science 65, 677-691.
- INAC, 2006. Results of the analyses to determine the presence of E.coli O157:H7 in final products to export to the United States of America and Canada. Annual Report.
- Inoue. T, Parida. S, Paton. D, Linchongsubongkoch. W, Mackay. D, Oh. Y, Aunpomma. D, Gubbins. S, Saeki. T, 2006. development and evaluation of an indirect enzyme-linked inmunosorbent assay for detection of foot and mouth desease virus non-structural protein antibody using a chemically synthesized 2B peptide as antigen. J Vet diagn Invest 18:545-552.
- Jackson. G, 1990. Public health and research perspectives on the microbial contamination of foods. J Anim Sci 1990. 68:884-891.
- Koohmaraie. M, Whipple. G, Kretchmar. D, Crouse. J and Mersmann. H, 1991. Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses**.** *J Anim Sci,* 69:617-624.
- Lindblad.M, 2007. Microbiological sampling of swine carcasses: a comparison of data obtained by swabbing with gauze and data collected routinely by excisin at Swedish abattoirs. International Journal of Food Microbiology 118, 180-185.
- MacDonald.K, DaWen, Sun, 1999. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. International Journal of Food Microbiology 52, 1-27.
- Marks, B, 2008. Status of microbial modelling in food process models. Comprehensive reviews on food science and food safety, vol 7, 137-143.
- Mariños. J, Vilca. M, Ramos. D, 2005.Evaluación del ph en canales de toros Holstein(*Bos taurus*) y Nelore(*Bos indicus*).Rev Inv Vet Perú 16,(1) 90-95.
- McMeekin.T, Barayi, J, Bowman. J, 2006. Information systems in food safety management. International Journal of Food Microbiology 112, 181-194.
- Miraglia. D, Ranucci. D, Severini. M, 2005. Comparison between carcass microbial load recovered by swabbing surfaces of differente sizes and using the reference of excision method. Veterinary research communications 29 suppl. 2, 339-341.
- Miller. J. C, Miller. J. N, Estadística para Química Analítica, Segunda versión 1993. Capítulo 3.
- Mounier. L, Debroeucq. H, Andanson. S, Veissier. I, 2006. Variotion in meat ph of beef bulls in relation to conditions of transfer to slaughter and previous history of the animals. Journal of Animal Science 84 1567-1576.

- M. Y. Gulbahar, W. C. Davis, T. Guvenc, M. Yarim, U. Parlak, and Y. B. Kabak Myocarditis associated with foot and mouth desease virus type O in lambs. Vet Path 44:589-599.
- Norrung Birgit and Buncic Sava, 2007. Safety of meat. Meat Safety: from abattior to consumer, 14-15 February 2007, Valencia, Spain.
- Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th edition, 2005, cap17 pag 36.
- OIE, 2003. – Foot and mouth disease. *In* Terrestrial animal health code, 12th Ed. OIE, Paris 85-97.
- Omiccioli. E, Amagliani. G, Brandi. G, Magnani. M, 2009. A new plataform for Real-Time PCR detection of *Salmonella spp, Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli O157* in milk. Food Microbiology 26, 615-622.
- OPS/OMS Uruguay. 1º Taller Nacional del Sistema V.E.T.A. 12 de Noviembre de 1999, Montevideo, Uruguay.
- Pathogen Modeling Program disponible online en http://pmp.arserrc.gov/PMPOnline.aspx.
- Reglamento Bromatológico Nacional. Capítulo 13, decreto nº 315/994, pags 128-130.
- Rodríguez-Ángeles. G, 2002. Principales características y diagnósticos los grupos patógenos de Escherichia coli. Salud Pública México, 44:464-475.
- Savell. J, Mueller. S, Baird. B, 2005. The chilling of carcasses. Meat Science 70, 449-459.
- Scientific Status Summary, August 2004. Bacteria associated with foodborne diseases. Institute of Food Technologists.
- Shimoni.E, Labuza. T, 2000. Modeling pathogen growth in meat products: future challenges. Trends in food and science technology 11,394-402.
- Simmons. N, Daly. C, Mudford. C, Richards. I, Harvis. G, Pleiter. H, 2006. Integrated technologies to enhance meat quality- An Australasian perspective. Meat Science 74, 172-179.
- Sutmoller.P, 2001. Importation of beef from countries infected with foot and mouse disease: a review of risk mitigation measures. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 20 (3), 715-722
- Swatland. H, 1979. Low temperature activation of post mortem glicogenolysis in bovine skeletal muscle fibres. Histochemical Journal, 11, 391-398.

- Trepat. M, 2002. Incidencia y comportamiento de *Listeria* y *Salmonella* en pechugas de pavo curadas. Tesis doctoral.
- USDA, November 2002. Risk assessment- Importation of fresh (chilled or frozen) beef from Uruguay.
- Valero. A, 2006. Aplicaciones de modelos predictivos en evalucación de riesgo de *Listeria monocytogenes* en alimentos mínimamente procesados. Tesis doctoral.
- Valero.A, Carrasco.E, Pérez-Rodriguez.F, García Gimeno.R, Zurera, G, 2006. Growth/no growth model of Listeria monocytogenes as a function of temperature, pH, citric acid and ascorbic acid. Eur Food Res Technol 224, 91-100.
- Wiklund. E, Stevenson-Barry. J, Duncan. S, Littlejohn. R, 2001. Electrical Stimulation of red deer carcasses- effects on rate of ph decline, meat terderness, colour stability and water holding capacity. Meat Science 59, 211-220.
- www.oie.int/eng/maladies/fiches/a_a010.htm#5. Foot and Mouth Disease. Ficha técnica.
- Zimemerman. M, 2006. Aspectos estratégicos para obtener carne ovina de calidad en el cono sur. Capítulo 11.
- Zweitering. M, de Koos. J, Hasenack. B, de Wit. J, van't Riet. K, 1991. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. Applied and Environmental Microbiology vol 57 nº4, 109-1101.

Anexo I

(Extraído de Federal Register / Vol. 61, No. 144 / Thursday, July 25, 1996 / Rules and Regulations 38931)

Specific Sample Collection Procedures Cattle Sample Collection Procedure

Materials
1. Sterile specimen sponge in sterile
Whirl-pack®-type bag or equivalent
2. 25 ml sterile Butterfield's phosphate
diluent (BPD)
3. Sterile ziplock-type or stomacher bag
4. Template for 100 cm2 sampling area
5. Sterile gloves
6. Wheeled ladder, sampling platform,
or step ladder
7. Sanitizing solution
8. Small tote or caddy for carrying supplies

Collection
Read the sections under Pre-sampling Preparation and Preparation for Sample Collection before beginning the sampling procedure. Use predetermined random selection procedures for selecting the half-carcass to be sampled.
Remember, samples will be collected from half-carcasses in the cooler 12 hours or more after slaughter.
A sampling sponge (which usually comes dehydrated and prepackaged in a sterile bag) will be used to sample all three sites on the carcass (flank, brisket and rump—see Figure 2). It is important to swab the areas in the order of least to most contamination in order to avoid spreading any contamination. Therefore, swab the areas in the sequence indicated in this sampling protocol. Nondestructive surface sampling will be conducted as follows:
1. Ensure that all bags have been prelabeled and all supplies are on hand,
including the sampling template. (An assistant may be helpful during the sampling process.)
2. IF a reusable template is used, immerse the sampling template in an approved sanitizing solution for at least 1–2 minutes. Just prior to swabbing the first sample site on the carcass (step 13), retrieve the sampling template from the sanitizing solution. Shake excess solution from the utensil, then protect the portion of the template that will contact the carcass from contamination.
3. Locate the flank, brisket, and rump sampling sites using illustrations and directions in (cattle carcass sampling locations).
4. Position the wheeled ladder, sampling platform, or step ladder near the carcass so the rump sample area is within easy reach from the ladder.
5. While holding the sponge bag at the top corner by the wire closure, tear off the clear, perforated strip at the top of the bag.
6. Remove the cap from sterile BPD bottle, being careful not to touch the bottle opening.
7. Carefully pour about half the contents of the sterile BPD bottle (approximately 10 ml) into the sponge bag to moisten the sponge.

8. Close the top of the bag by pressing the wire closures together. Use hand pressure from the outside of the bag and carefully massage the sponge until it is FULLY HYDRATED (moistened).

9. With the bag still closed, carefully push the moistened sponge to the upper portion of the bag orienting one narrow end of the sponge up toward the opening of the bag. Do NOT open the bag or touch the sponge with your fingers. While holding the bag, gently squeeze any excess fluid from the sponge using hand pressure from the outside. The whole sponge should still be in the bag.

10. Open the bag containing the sponge, being careful not to touch the inner surface of the bag with your fingers. The wire closure at the top of the bag should keep the bag open. Set bag aside.

11. Put on a pair of sterile gloves.

12. Carefully remove the moistened sponge from the bag with the thumb and fingers (index and middle) of your sampling hand.

13. With the other hand, retrieve the template by the outer edge, taking care not to contaminate the inner edges of the sampling area of the template.

14. Locate the flank sampling area (Figure 2). Place the template over this location.

15. Hold the template in place with one gloved hand (Remember, only the sponge should touch the sampling area. Take care not to contaminate this area with your hands).

16. With the other hand, wipe the sponge over the enclosed sampling area (10 cm x 10 cm) for a total of approximately 10 times in the vertical and 10 times in the horizontal directions. The pressure for swabbing would be as if you were removing dried blood from the carcass. However, the pressure should not be too hard as to crumble or destroy the sponge. (Note:The template may need to be ‘‘rolled’’from side to side during swabbing since the surface of the carcass is not flat. This ensures that the 100 cm2 area is enclosed while swabbing.)

17. Repeat steps 14–16 for the brisket area, using the SAME side or surface of the sponge used to swab the flank area.

18. After swabbing the brisket area, transfer the template to the same hand holding the sponge. Do not contaminate the sponge or inner edges of the sampling area of the template.

19. Climb the ladder or platform, holding onto the handrail with the hand used to hold the template. Once at a convenient and safe height for sampling the rump, transfer template back to ‘‘climbing’’ hand (hand used to hold onto the rail while climbing the ladder), taking care not to contaminate the inner edges of the template.

20. Repeat steps 14–16 for the rump area, using the ‘‘clean’’ surface or side (the side that was NOT previously used to swab the flank/brisket areas) of the sponge.

21. After swabbing the rump area, carefully place the sponge back in the sponge sample bag, taking care not to touch the sponge to the outside of the sample bag.

22. While holding the handrail, climb down from the ladder.

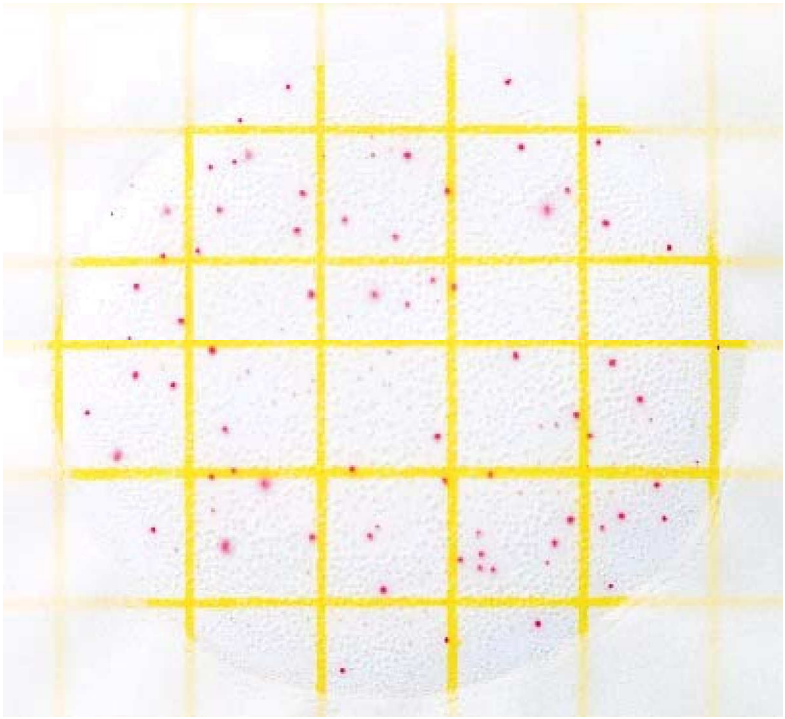
23. Add the additional BPD (about 15 ml) to the sample bag to bring the total volume to approximately 25 ml.

24. Expel excess air from the bag containing the sponge and fold down the top edge of the bag 3 or 4 times to close. Secure the bag by folding the attached wire tie back against the bag.

Anexo II

(Extracto de Guía de Interpretación para el recuento de Aerobios Totales).

La Placa Petrifilm^{MR} para Recuento de Aerobios Totales (Aerobic Count AC) es un sistema de medio de cultivo listo para ser empleado, que contiene nutrientes del Agar Standard Methods, un agente gelificante soluble en agua fría y un tinte indicador que facilita la enumeración de las colonias. Las Placas Petrifilm^{MR} AC se utilizan en la enumeración de la población total existente de bacterias Aerobias en productos, superficies, etc.



Conteo de Bacterias Aerobias = 152

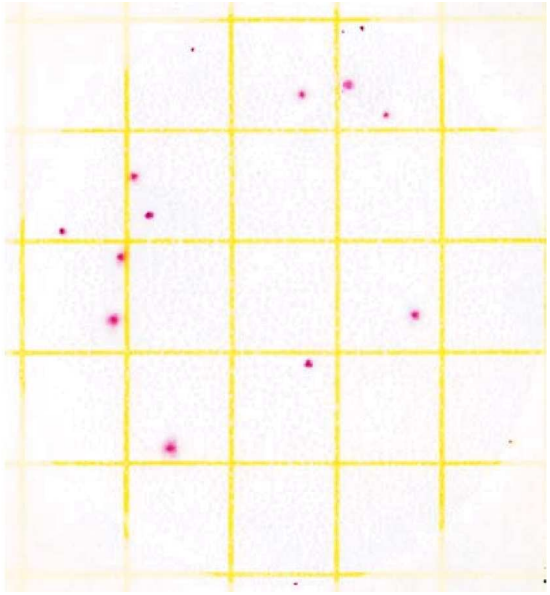
Un tinte indicador rojo que se encuentra en la placa colorea las colonias para su mejor identificación. Cuente todas las colonias rojas sin importar su tamaño o la intensidad del tono rojo.

Conteo de Bacterias Aerobias = 0

La Placa Petrifilm^{MR} para Recuento de Aerobios Totales es de bajo
fácil interpretación. La figura 2 muestra una Placa Petrifilm^{MR} AC sin crecimiento de colonias.

Conteo de Bacterias Aerobias = 16

La figura 3 muestra una Placa Petrifilm^{MR} AC con crecimiento de colonias.

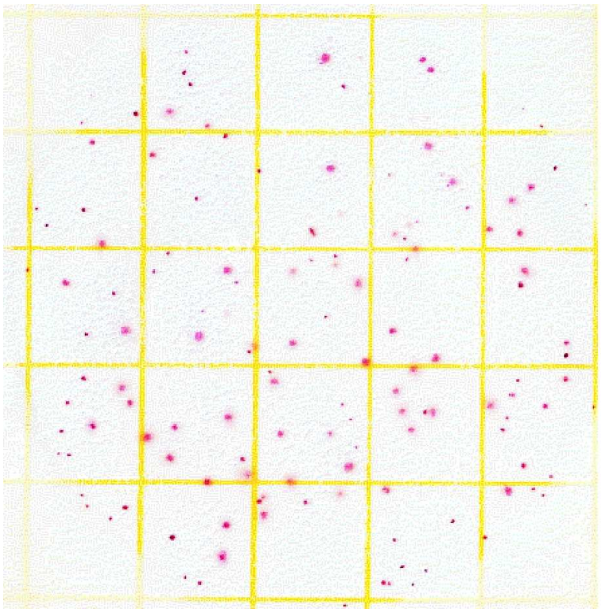


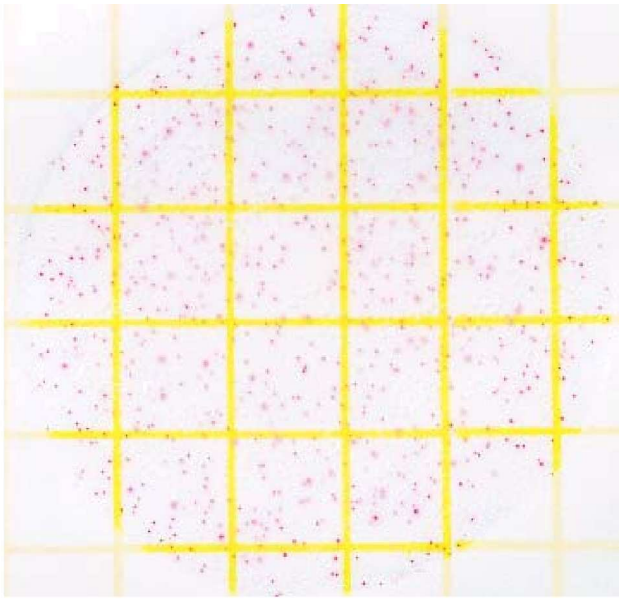
Conteo de Bacterias Aerobias = 143

El rango recomendado de conteo en la Placa Petrifilm^{MR} AC esta entre 25 – 250 colonias. Obsérvese la figura 4

Conteo de Bacterias Aerobias = 560 "estimado"

Cuando el número de colonias es mayor a 250, como se puede observar en la figura 5 por su excesivo crecimiento, los conteos deben ser estimados. Determine el promedio de colonias en 1 cuadrado (cm^2) y multiplíquelo por 20 para obtener el conteo total por placa. El área de inoculación de Petrifilm^{MR} AC es 20 cm^2.

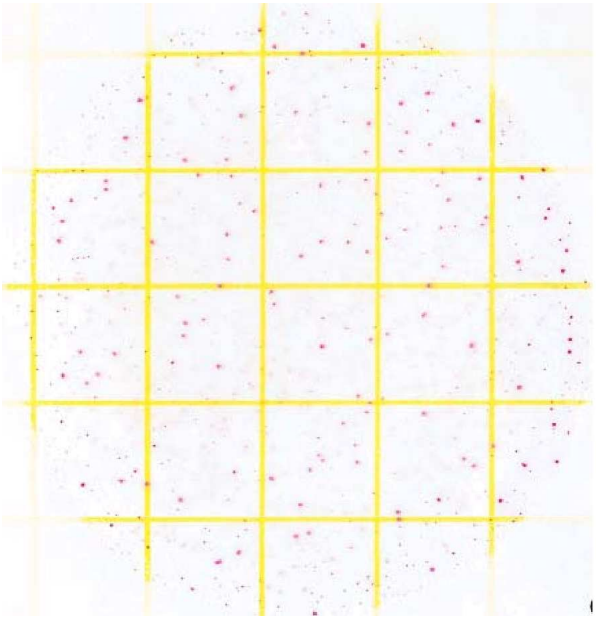


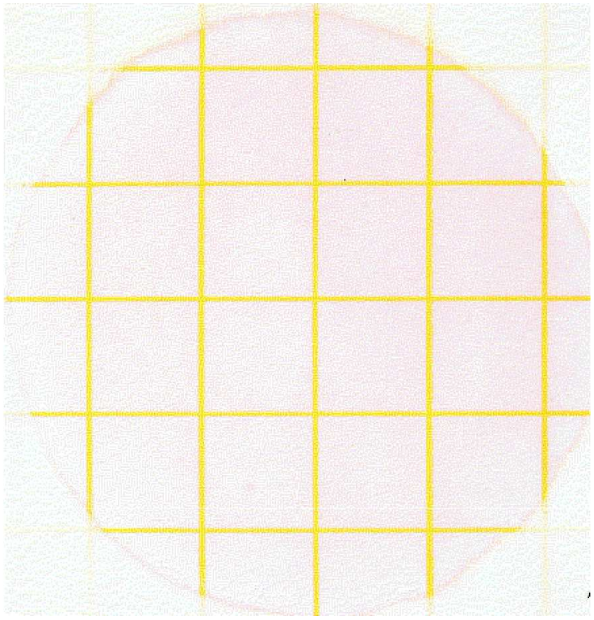


MNPC (muy numerosa para contar), para obtener mejores resultados, diluya su muestra.

Conteo de Bacterias Aerobias = MNPC
Conteo estimado: 10^3
La figura 6 muestra una Placa Petrifilm^{MR} AC con colonias muy numerosas para contar.

Conteo de Bacterias Aerobias = MNPC
Conteo estimado: 10^5
Con conteos muy altos, el área total de crecimiento puede virar o colorearse rosa, como se muestra en la figura 7. Usted podría observar colonias individuales solo en el filo o borde del área de crecimiento. Registre este conteo como muy numeroso para contar (MNPC)





Anexo III

(Extraído de Guía de Interpretación de Recuento de *E.coli*/coliformes)

Petrifilm E. coli/Coliform Count (EC) plates contain Violet Red Bile (VRB) nutrients, a cold-water-soluble gelling agent, an indicator of glucuronidase activity, and an indicator that facilitates colony enumeration. Most E. coli (about 97%) produce beta-glucuronidase which produces a blue precipitate associated with the colony. The top film traps gas produced by the lactose fermenting coliforms and E. coli. About 95% of E. coli produce gas, indicated by blue to red-blue colonies associated with entrapped gas on the Petrifilm EC plate (within approximately one colony diameter).

AOAC INTERNATIONAL and U.S. FDA Bacteriological Analytical Manual (BAM) define coliforms as gram-negative rods which produce acid and gas from lactose during metabolic fermentation. Coliform colonies growing on the Petrifilm EC plate produce acid which causes the pH indicator to make the gel color darker red. Gas trapped around red coliform colonies indicates confirmed coliforms

.