

Detección de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Yersinia enterocolitica* en carne de res en puntos de venta en México

Detection of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and *Yersinia enterocolitica* in beef at points of sale in Mexico

Maria Salud Rubio Lozano^a, José Fernando Martínez Bruno^a, Rigoberto Hernández Castro^a, Cynthia Bonilla Contreras^a, Rubén Danilo Méndez Medina^a, José Fernando Núñez Espinosa^a, Alejandro Echeverry^b, Mindy M. Brashears^b

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Yersinia enterocolitica* en carne de res, mexicana e importada, adquirida en supermercados en tres ciudades de México. Antes de analizar los productos cárnicos, se estimó el límite de detección usando métodos basados en reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tanto de cultivos bacterianos puros como de carne inoculada. Un total de 90 muestras, mitad mexicanas y mitad importadas, fueron recolectadas en este estudio. Un total de 27.78 % muestras analizadas por PCR fueron positivas a *L. monocytogenes*, 8.89 % a *Salmonella* y 28.89 % a *Y. enterocolitica*. Ninguna de las muestras importadas fue positiva a *Salmonella*. Las muestras mexicanas presentaron mayor índice de *Listeria*, *Yersinia* y *Salmonella* que las muestras de carne importada, lo que indica un posible riesgo de salud para los consumidores que adquieren este tipo de producto. Estos resultados enfatizan la necesidad de implementar de forma obligatoria programas de prevención y control, Procedimientos Operativos Estandarizados de Sanitización (POE's- SSOP's en inglés) y Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC- HACCP en inglés) en la industria cárnica mexicana.

PALABRAS CLAVE: *Listeria*, *Salmonella*, *Yersinia*, Carne de res, PCR, México.

ABSTRACT

The objective of this project was to detect the presence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and *Yersinia enterocolitica* in Mexican and imported beef steaks purchased at supermarkets in three cities of Mexico. Prior to testing beef products, detection limits using PCR-based methods were conducted from both pure bacterial cultures as well as inoculated beef. A total of 90 samples, half of Mexican and half of imported origin, were collected in this study. Overall, a total of 27.78 % of samples tested via PCR were positive for *L. monocytogenes*, 8.89 % for *Salmonella* and 28.89 % for *Y. enterocolitica*, respectively. None of the imported samples tested positive for *Salmonella*. Mexican samples had a higher *Listeria*, *Yersinia*, and *Salmonella* presence than imported samples, indicating a possible health risk to consumers purchasing this type of product. These results emphasize the need to implement the mandatory use of preventive and control programs, Sanitation Standard Operating Procedures (SSOPs) and HACCP in the Mexican meat industry.

KEY WORDS: *Listeria*, *Salmonella*, *Yersinia*, Beef, PCR, Mexico.

En México existen muchas variantes en las condiciones sanitarias de la carne de res; estas

In Mexico there are many variations in the sanitary conditions of beef, which depend on

Recibido el 21 de junio de 2011. Aceptado el 15 de noviembre de 2011.

^a Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Centro de Enseñanza Práctica, Investigación en Producción y Salud Animal. Av Cruz Blanca No. 486. Colonia San Miguel Topilejo, Delegación Tlalpan. 04500. Mexico, DF. Tel.: +52-55-8480810; fax: +52-55-8480514; msalud@unam.mx. Correspondencia al primer autor.

^b Department of Animal and Food Sciences, Texas Tech University, USA.

Financial support by: PAPIIT IN206401

condiciones son dependientes del desarrollo económico de la industria en las diversas regiones geográficas del país. La región norte de México, que incluye los estados de Chihuahua y Nuevo León, ha mostrado tener un gran desarrollo económico e industrial en comparación con los estados localizados en el centro y sur. Este desarrollo ha tenido como consecuencia un impacto en las condiciones higiénicas de los rastros y de los puntos de venta y por lo tanto, en la presencia y desarrollo de patógenos en la carne. En México, se ha informado con anterioridad de la presencia de bacterias como: *Listeria*, *Salmonella*, *Yersinia* y *Staphylococcus*, entre otros agentes causantes de enfermedades transmitidas por alimentos, en donde la carne y sus derivados actúan como vehículos potenciales para la transmisión de estos patógenos^(1,2,3,4).

Los análisis microbiológicos convencionales son laboriosos debido al tiempo que se requiere para obtener resultados, ya que dependen de pruebas estándar para aislar y confirmar diversos patógenos en la carne. Sin embargo, debido a las características de la PCR (especificidad, sensibilidad, velocidad, límite de detección y selectividad) se ha incrementado el uso de esta tecnología para estandarización y validación como prueba de diagnóstico para detectar patógenos^(5,6,7). La detección oportuna y confiable de varios patógenos bacterianos en cualquier fase de la cadena cárnica, es un paso importante hacia su control, monitoreo y prevención.

El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Yersinia enterocolitica* mediante PCR en carne mexicana e importada vendida en supermercados en tres ciudades de México: Nuevo León (norte), Ciudad de México (centro) y Tabasco (sur), representando las principales regiones económicas del país.

Con el fin de validar los límites de detección de los métodos utilizados en este trabajo, se llevó

the economic development of the industry in the different geographic regions in the country. The Northern area of Mexico, which includes states as Chihuahua and Nuevo Leon, has shown greater economic and industry development when compared to those states located in the Central and Southern states of Mexico, such as Puebla, Mexico, Jalisco, Chiapas and Michoacán, among others. This development has had a bearing on the hygienic conditions in slaughterhouses and points of sale, and thus, on the presence and pathogenic growth in the meat. Furthermore, the safety of imported beef may be altered at points of sale to the consumers due to mishandling, cross contamination, and lack of temperature control in the different destinations. The presence of bacteria such as *Listeria*, *Salmonella*, *Yersinia*, and *Staphylococcus*, amongst other foodborne-illness causing agents, has been reported previously in Mexico, where meat and meat-products act as potential vehicles for the transmission of these pathogens^(1,2,3,4).

Conventional microbiological analyses are laborious because of the time needed to obtain results as they depend on standard tests for isolating and confirming various pathogens in meat. However, because of the characteristics of PCR (specificity, sensitivity, speed, detection limit and selectivity) the use of this technology for standardization and validation as a diagnostic test for detecting pathogens has been on the increase^(5,6,7) The rapid, timely, and reliable detection of the various bacterial pathogens at any stage of the meat chain is an important step towards their control, monitoring and prevention.

The objective of this study was to determine the presence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and *Yersinia enterocolitica* using PCR in Mexican and imported steaks sold at supermarkets in three major cities of Mexico: Nuevo Leon (North), Mexico City (Center) and Tabasco (South), representing the main economic regions of the country.

a cabo un estudio inicial de inoculación de productos cárnicos.

Las cepas usadas en este trabajo fueron *L. monocytogenes* LNA 102/99 FDA10MS, *Salmonella* Typhimurium A TIC 14579 y *Y. enterocolitica* ENCB-0752. Las cepas se conservaron y almacenaron a -80 °C en infusión cerebro corazón (BHI) y glicerol al 50%. Antes de cada prueba se determinó la viabilidad y la pureza. Una colonia representativa de cada una fue inoculada en agar selectivo que contiene polimixina-acriflavina-litio cloro-ceftazidima-esculina-manitol (PALCAM) para *L. monocytogenes*, agar bismuto sulfito (BSA) para *Salmonella* y agar cefsulodina-irgasán-novobiocina (CIN) para *Y. enterocolitica*, respectivamente.

Para validar los límites de detección de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en este estudio, 25 g de carne de res fueron tomados aleatoriamente y colocados en 225 ml de caldo lactosa. Para *Y. enterocolitica* se colocaron 10 g de carne en 90 ml de caldo de enriquecimiento selectivo para *Yersinia* (YSB). Todas las muestras fueron homogeneizadas por 3 min (dilución primaria) y finalmente inoculadas con cada uno de los microorganismos^(8,9). Cada dilución tuvo una fase de enriquecimiento de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana^(10,11). Al final del enriquecimiento, se hicieron diluciones decimales (hasta 10⁻¹⁰) para determinar el límite mínimo de detección de UFC por PCR. Las diluciones se incubaron a 37 °C por 24 h y la relación correcta entre el número de UFCs y sus diluciones correspondientes se midió a 3.0 x 10⁷, 1.0 x 10⁶ y 1.8 x 10⁷ UFC/g para *L. monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium y *Y. enterocolitica*, respectivamente. El ADN se extrajo mediante el método previamente descrito por Millar *et al*⁽¹²⁾. Se usó el siguiente programa de amplificación: 1 paso a 94 °C/5 min, 35 ciclos de 60 seg a 94 °C (desnaturalización), 60 seg a 56 °C (alineación), 80 seg a 72 °C (extensión) y 8 min a 72 °C (extensión final).

In order to validate detection limits of the methods used in this study, an initial inoculation study was conducted in beef products.

The strains used in this work were *L. monocytogenes* LNA 102/99 FDA10MS, *Salmonella* Typhimurium A TIC 14579 and *Y. enterocolitica* ENCB-0752. The strains were preserved and stored at -80 °C in brain heart infusion (BHI) and glycerol at 50%. Before each test viability and purity were determined. A representative colony of each was inoculated onto Polymyxin-Acriflavine-Lithium chloride-Ceftazidime-Aesculin-Mannitol (PALCAM) selective agar for *L. monocytogenes*, Bismuth Sulfite agar (BSA) for *Salmonella* and Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin (CIN) agar for *Y. enterocolitica*, respectively.

In order to validate detection limits of *Salmonella* and *L. monocytogenes*, 25 g of beef was randomly taken and placed in 225 ml of lactose broth. For *Y. enterocolitica* 10 g of meat was placed in 90 ml of sterile *Yersinia* Selective Broth (YSB). All samples were homogenized for 3 min (primary dilution) and finally inoculated with each of the microorganisms^(8,9). Each dilution had an enrichment phase in accordance with the Official Mexican Norm^(10,11). At the end of the enrichment, decimal dilutions were made (up to 10⁻¹⁰) in order to determine the minimum detectable level of UFC via PCR. The dilutions were incubated at 37 °C for 24 h and the correct relation between the number of CFU's and their corresponding dilutions was measured at 3.0x10⁷, 1.0x10⁶ and 1.8x10⁷ CFU/g for *L. monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium and *Y. enterocolitica*, respectively. DNA was extracted using the method described previously by Millar *et al*⁽¹²⁾. The following amplification program was used: 1 step at 94 °C/5 min, 35 cycles of 60 s at 94 °C (denaturalization), 60 s at 56 °C (alignment), 80 s at 72 °C (extension), and 8 min at 72 °C (final extension).

A typical colony of each microorganism was incubated in 10 ml of tripticase soy broth (TSB)

Una colonia típica de cada microorganismo se incubó en 10 ml de caldo tripticasa soya (TSB) a 37 °C por 24 h. El ADN se extrajo por el método Silhavy⁽¹³⁾.

Los iniciadores Mar1 y Mar2, 5'-GGGCTTTATCCAT AAAATA-3' y 5'-TTGGAAGAACCTTGATTA-3', que amplifican un fragmento de 453 bp del gen *iap*⁽¹⁴⁾, se usaron para *L. monocytogenes*. Para *Salmonella* Typhimurium se usaron los iniciadores 139 y 141 (5'-CAGTGGTGTGCATATCATT GCC-3' y 5'-GTAAGA AGGTGCTTATACATC-3'), que generan un fragmento de 284 bp del gen *invA*^(6,15), y para la detección de *Y. enterocolitica* se usaron los iniciadores 5'CTATTGGTTATGCGCAAAGC-3' y 5'-TGCAAGT GGGTTGAATTGCA-3', que amplifican un fragmento de 354 bp del gen *ail*, exclusivos para serotipos patogénicos⁽¹⁶⁾.

Se usó ADN de *L. monocytogenes* puro y *S. Typhimurium* a una concentración de 0.26 ng/μl, *S. Typhimurium* a 0.4 ng/μl y *Y. enterocolitica* a 0.4 ng/μl. Se realizaron diluciones dobles para determinar la cantidad mínima detectable de ADN genómico. Cuando se estableció el límite de detección de ADN puro, se determinó su equivalencia a un número de genomas⁽¹⁷⁾ y genomas 0.2, 0.4 y 0.16 para *L. monocytogenes*, *Salmonella* y *Y. enterocolitica*, respectivamente. La PCR se realizó con 1 ciclo de 94 °C/5 min, 30 ciclos a 94 °C/30 seg (desnaturalización), 30 seg a 56 °C (alineamiento), 30 seg a 72 °C (extensión) y 5 min a 72 °C (extensión final). En cuanto a *L. monocytogenes*, la temperatura en la fase de alineamiento fue de 50 °C. En todas las pruebas, los productos amplificados se evaluaron en un gel de agarosa al 2% usando el digesto *MspI* de pBR322 como marcador de peso molecular. Para todos los experimentos, el agua estéril y el ADN genómico de cada organismo se usaron como controles negativos y positivos, respectivamente.

Se inoculó individualmente una colonia típica de cada microorganismo en 10 ml de caldo Luria-Bertani (LB) y se incubó a 37 °C/24 h. Después de la incubación, se tomaron 0.5 ml

at 37 °C for 24 h DNA was extracted using the Silhavy method⁽¹³⁾.

Mar1 and Mar2 primers, 5'-GGGCTTTATCCATA AAATA-3' and 5'-TTGGAAGAACCTTGATTA-3', which amplify a 453 pb fragment of *iap* gene⁽¹⁴⁾ were used for *L. Monocytogenes*. For *Salmonella* Typhimurium the primers 139 and 141(5'-CAGTGGTGTGCATATCATTGCC-3' and 5'-GTAAGAA GGTGCTTATACATC-3') were used which generate a 284 pb fragment of *invA* gene^(6,15) and for detection of *Y. enterocolitica* the primers used were 5'-CTATTGGTTATGCGCAAAGC-3' and 5'-TGCAAGTGGGTTGAATTGCA-3', which amplify a 354 pb fragment of *ail* gene, exclusive to pathogenic serotypes⁽¹⁶⁾.

Pure DNA of *L. monocytogenes* and *S. Typhimurium* at 0.26 ng/μl concentration, *S. typhimurium* at 0.4 ng/μl and *Y. enterocolitica* at 0.4 ng/μl were used. Double dilutions were made to determine the minimum detectable amount of genomic DNA. When the detection limit of pure DNA was established, its equivalence in genome numbers was determined⁽¹⁷⁾ and 0.2, 0.4 and 0.16 genomes for *L. monocytogenes*, *Salmonella* and *Y. enterocolitica* were determined, respectively. PCR was carried out with 1 cycle of 94 °C/5 min, 30 cycles at 94 °C/30 s (denaturalization), 30 s at 56 °C (alignment), 30 s at 72 °C (extension) and 5 min at 72 °C (final extension). Regarding *L. monocytogenes*, temperature at the alignment stage was 50 °C in this and subsequent assays. In all tests the amplified products were evaluated in agarose at 2% using pBR322 digested with *MspI* as a molecular weight marker. For all the experiments, sterile water and genomic DNA from each organism were used as negative and positive controls, respectively.

A typical colony from each microorganism was inoculated individually in 10 ml of Luria-Bertani (LB) broth and incubated at 37 °C/24 h. After incubation, 0.5 ml from each culture was then taken and grown in 9.5 ml of LB repeating the incubation every 4 h. Initial concentration levels

de cada cultivo y se crecieron en 9.5 ml de LB, repitiendo la incubación cada 4 h. Los niveles de concentración inicial fueron: 3.0×10^7 , 5.0×10^6 y 2.0×10^8 UFC/ml para *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* y *Y. enterocolitica*, respectivamente. Se prepararon diluciones decimales sucesivas (hasta 10^{-10}). Las condiciones para PCR fueron: 1 ciclo a 94 °C/5 min, 30 ciclos de 40 seg a 94 °C (desnaturalización), 45 seg a 56 °C (alineamiento), 60 seg a 72 °C (extensión) y 5 min a 72 °C (extensión final).

El presente estudio se llevó a cabo en tres ciudades de México: Monterrey (norte: estado de Nuevo León), Villahermosa (sur: estado de Tabasco), y Ciudad de México (centro: Distrito Federal). Para este estudio se obtuvieron 90 muestras de carne de res (250 g) de supermercados asociados con la Asociación Nacional de Tiendas y Autoservicio y Departamentales (ANTAD)⁽¹⁾ y de Wal-Mart de México S.A de C.V. Un total de 30 muestras de carne procedentes del norte, 20 del centro y 40 del sur. De éstas, 50 % fueron nacionales (producido en México) y 50 fueron importadas. Las muestras de carne se colectaron 12 h antes del procesamiento y se mantuvieron a 4 °C hasta que se realizó la prueba microbiana.

La extracción del ADN bacteriano de muestras de carne de res obtenidas de vendedores y supermercados se llevó a cabo como se describió anteriormente. Las condiciones de la PCR fueron similares a las mencionadas previamente para cada microorganismo.

were 3.0×10^7 , 5.0×10^6 and 2.0×10^8 CFU/ ml for *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* and *Y. enterocolitica*, respectively. Decimal sequenced dilutions (up to 10^{-10}) were made. PCR conditions were 1 cycle at 94 °C/5 min, 30 cycles of 40 s at 94 °C (denaturalization), 45 s of 56 °C (alignment), 60 s of 72 °C (extension) and 5 min at 72 °C (final extension).

The present study was carried out in three Mexican cities: Monterrey (North; state of Nuevo León), Villahermosa (South, state of Tabasco), and Mexico City (Center, Federal District).

For this study, 90 samples of beef steak (250 g) were obtained from supermarkets associated with the National Supermarket and Department Store Association (ANTAD) ⁽¹⁾ and from Wal-Mart de Mexico S.A. de C.V. A total of 30 samples came from the North, 20 from the Center and 40 from the South. Of those, 50 % were national (produced in Mexico) and 50 % were imported. The meat samples were collected 12 h before processing and held at 4 °C until microbial testing was conducted.

Bacterial DNA extraction from steak samples obtained from vendors and supermarkets was carried out as described above. PCR conditions were the same as those mentioned previously for each of the microorganisms.

Table 1 present percentage of pathogenic positive beef steak samples by city. PCR testing demonstrated the DNA presence of *L. monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium and

Cuadro 1. Porcentaje de muestras de bistec positivas para patógenos por Región

Table 1. Percentage of pathogenic positive beef steak samples by Region

Microorganism	Monterrey, NL (n=30)		Mexico City (n=40)		Tabasco (n=20)		Overall percentage positive
	Imported	Mexican	Imported	Mexican	Imported	Mexican	
<i>L. monocytogenes</i>	0.0	26.7 (8)	17.5 (7)	10.0 (4)	5.0 (1)	25.0 (5)	27.7 (25)
<i>Salmonella</i>	0.0	3.3 (1)	0.0	2.5 (1)	0.0	30.0 (6)	8.8 (8)
<i>Yersinia</i>	0.0	6.7 (2)	12.5 (5)	27.5 (11)	30.0 (6)	10.0 (2)	28.8 (26)

()= number.

El Cuadro 1 presenta el porcentaje de muestras de carne positivo a patógenos por ciudad. La prueba de PCR demostró la presencia de ADN de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* y *Y. enterocolitica* en carne de supermercados de los estados de Nuevo León, Tabasco y Ciudad de México. El porcentaje total de ocurrencia de estos patógenos en las muestras de carne fue 27.78 % para *L. monocytogenes*, 8.89 % para *Salmonella* y 28.89 % para *Y. enterocolitica*.

En Monterrey, ninguna de las muestras importadas resultó positiva para alguno de los patógenos; sin embargo, 26.7, 3.3 y 6.7 % de las muestras de carne mexicana resultó positiva para *Listeria*, *Salmonella* y *Yersinia*, respectivamente. En aquellas muestras obtenidas en la Ciudad de México, la presencia de *Listeria* fue mayor en muestras importadas (n=8; 17.5 %) que en aquellas de origen mexicano (n=4; 10 %). Por otro lado, en la Ciudad de México, no se detectó *Salmonella* en muestras importadas, mientras que 2.5 % de las muestras mexicanas resultaron positivas a este patógeno. Se detectó *Yersinia* en 12.5 % (n=5) de las muestras importadas y en 27.5 % (n=11) de las muestras de origen mexicano. La mayor presencia de *Listeria* se detectó en muestras mexicanas de Tabasco, con 25 % (n=5). En Tabasco, ninguna de las muestras importadas resultó positiva a *Salmonella*, pero 30 % de las muestras mexicanas fueron positivas a este patógeno. En contraste, de las muestras obtenidas en Tabasco, 30 % de las importadas fueron positivas a *Yersinia*, mientras que únicamente 10 % de las mexicanas resultaron positivas.

En el caso de *L. monocytogenes*, el porcentaje total de detección fue similar al encontrado por Manzano et al⁽¹⁴⁾ en muestras comerciales italianas, en donde los autores detectaron al patógeno en 25 % de la carne molida⁽¹⁴⁾. Sin embargo, Peng y Shelef⁽¹⁸⁾ solamente encontraron 15 % de la carne molida, procedente de supermercados de Estados Unidos de América, contaminada con este microorganismo. En el presente estudio, se

Y. enterocolitica in steaks of supermarket in the states of Nuevo Leon, Tabasco and Mexico City, Mexico. The overall percentage of occurrence of these pathogens in the meat samples was 27.78 % for *L. monocytogenes*, 8.89 % for *Salmonella* and 28.89 % for *Y. enterocolitica*.

In Monterrey, none of the imported samples tested positive for any of the pathogens; however, 26.7, 3.3 and 6.7 % of the Mexican meat samples tested positive for *Listeria*, *Salmonella*, and *Yersinia*, respectively. In those samples obtained from Mexico City, the presence of *Listeria* was higher from imported samples (n=8; 17.5 %) than those of Mexican origin (n=4; 10 %). Conversely, in Mexico City, no *Salmonella* was detected in imported samples, while 2.5 % of the Mexican samples tested positive for this pathogen. *Yersinia* was detected in 12.5 % (n=5) of imported samples and in 27.5 % (n=11) in samples of Mexican origin. The highest presence of *Listeria* was detected in Mexican samples from Tabasco, with 25 % (n=5) of them testing positive as can be observed in Table 1. In Tabasco, none of the imported samples tested positive for *Salmonella*, but 30 % of the Mexican samples were positive for this pathogen. In contrast, of those samples obtained in Tabasco, 30 % of the imported samples were positive for *Yersinia*, while only 10 % of the Mexican samples were positive.

In the case of *L. monocytogenes* the overall detection percentage was similar to that found by Manzano et al⁽¹⁴⁾ in Italian commercial samples, where the authors detected the pathogen in 25 % of ground beef⁽¹⁴⁾. Peng and Shelef⁽¹⁸⁾ however, only found 15 % of ground beef from US supermarkets to be contaminated with this microorganism. In this study, we found a smaller percentage of *L. monocytogenes* than the 35 % reported by Gonzalez et al⁽¹⁹⁾ in New York style cuts sold in Nuevo Leon, Mexico. Fratamico⁽²⁰⁾ and Peng⁽¹⁸⁾ detected the presence of *Salmonella* at 6.5 % and 10.0 % respectively in ground beef sold in US supermarkets; this investigation

encontró un porcentaje menor de *L. monocytogenes* que el 35 % informado por González *et al*⁽¹⁹⁾ en cortes New York vendidos en Nuevo León, México. Fratámico⁽²⁰⁾ y Peng⁽¹⁸⁾ detectaron la presencia de 6.5 y 10.0 % de *Salmonella*, respectivamente, en carne molida vendida en supermercados de Estados Unidos de América, encontrando en total 8.89 % de muestras positivas a este patógeno. Ríos *et al*⁽²¹⁾ informaron de 10.0 % de contaminación por *Salmonella* en cortes New York vendidos en el estado de Nuevo León, México, un poco más alta que el porcentaje de muestras positivas encontradas en este estudio en el mismo Estado.

La detección de *Y. enterocolitica* por medio de PCR en carne de res no ha sido comúnmente reportada en la mayoría de los estudios, porque generalmente se había enfocado a productos de cerdo⁽²²⁾. Sin embargo, Vishnubhatla *et al*⁽²³⁾ encontraron este agente patógeno en 31 % de las muestras de carne molida. En Finlandia⁽²⁴⁾ detectaron 25 % de contaminación con *Y. enterocolitica* en carne molida. En el presente estudio se obtuvieron resultados similares a los publicados por Fredriksson *et al*⁽²⁴⁾, al sumar un total de 28.89 % de muestras positivas a *Y. enterocolitica*. En Tabasco, se encontró el porcentaje más alto de los tres patógenos al ser comparados con otras ciudades. *L. monocytogenes* se encontró más frecuentemente en el norte, comparado con las otras dos enterobacterias. La Ciudad de México mostró tener el porcentaje más bajo de muestras positivas a *Salmonella*, pero el porcentaje más alto para *Y. enterocolitica*.

Como se puede observar en estos resultados, la carne importada fue la menos contaminada en comparación con la de origen mexicano, indicando que el uso obligatorio de HACCP, como requisito de United States Department of Agriculture-Food Safety and Inspection Service (USDA-FSIS), es efectivo para la disminución de la contaminación por patógenos en la canal bovina^(25,26). En México, en contraste con Estados Unidos de América, el uso de programas

found an overall 8.89 % of the samples testing positive for this pathogen. Ríos *et al*⁽²¹⁾ reported 10.0 % of *Salmonella* contamination in New York cuts sold in the state of Nuevo Leon, Mexico, just higher than the percentage of positive samples found by our group in the current study in the same state (Table 1).

Detection of *Y. enterocolitica* using PCR in beef is not commonly reported in most studies, which have focused on pork products⁽²²⁾. However, Vishnubhatla *et al*⁽²³⁾ found this agent in 31 % of ground beef samples. Fredriksson *et al*⁽²⁴⁾ detected 25 % contamination in ground beef samples in Finland; similar results were obtained with an overall presence of 28.89 % of our samples testing positive for this pathogen. In Tabasco, a higher percentage of the three pathogens was found when compared to the other cities. *L. monocytogenes* was found more frequently in the North compared to the other two enterobacteria. Mexico City proved to have the lowest percentage of samples testing positive for *Salmonella*, but the highest for *Y. enterocolitica* (Table 1). As can be seen in these results, imported meat was less contaminated than those samples originating from Mexico, indicating that the mandatory use of HACCP as required by the United States Department of Agriculture - Food Safety and Inspection Service (USDA-FSIS) is effective at reducing pathogen contamination of beef carcasses^(25,26). In Mexico, in contrast to the United States, the use of pre requisite programs and implementation of the HACCP system to reduce pathogenic loads in beef carcasses is not mandatory and is only used by some slaughter plants on a self-implemented basis. The percentage of contamination by *L. monocytogenes* and *Y. enterocolitica* was higher than that of *Salmonella*, possibly due to the conditions, under which the aforementioned pathogens survive, grow and develop^(27,28). In the case of *L. monocytogenes*, it finds its way into the meat while being handled or coming into contact with contaminated machinery, tools and work surfaces⁽²⁹⁻³²⁾. The detection of *L. monocytogenes*, *Salmonella* and

pre-requeridos e implementación del sistema HACCP para reducir cargas patógenas en la canal bovina, no es obligatorio y solamente es usado por algunos rastros como iniciativa propia. El porcentaje de contaminación por *L. monocytogenes* y *Y. enterocolitica* fue más alto que el de *Salmonella*, posiblemente debido a las condiciones bajo las cuales los patógenos mencionados sobreviven, crecen y se desarrollan^(27,28). En el caso de *L. monocytogenes*, ésta penetra a la carne al ser manipulada o al entrar en contacto con maquinaria, herramienta o superficies de trabajo contaminadas^(29,30,31,32). La detección de *L. monocytogenes*, *Salmonella* y *Yersinia enterocolitica* en bistecs vendidos en tiendas de menudeo y supermercados, indica el riesgo potencial para la salud de los consumidores. Estos resultados también señalan la necesidad de implementación obligatoria de programas preventivos como SSOPs y HACCP en la industria cárnica de México.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó gracias al financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN206401) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

LITERATURA CITADA

1. ANTAD. Asociación Nacional de Tiendas de Autoservicio y Departamentales [en línea]. <http://~.antad.org.mx/ICasociados.html>. 2002. Consultado 15 Sep, 2008.
2. Castaneda, PE, Díaz AE, Hernandez AL, Jaramillo ACJ. Identification and typing of *Yersinia enterocolitica* biotypes and serotypes isolated. *Rev Saude Publica* 2001;(35):380-384.
3. Estrada GT, Lopez SC, Zamarripa AB, Thompson MR, Gutierrez CL, Mancera MA, Escobar GA. Prevalence of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in street-vended food of open markets (tianguis) and general hygienic and trading practices in Mexico City. *Epidemiol Infect* 2004;(132):1181-1184.
4. Rivera BM, Shackelford SD, Arthur TM, Westmoreland KE, Bellinger G, Rossman M, Reagan JO, Koohmaraie M.

Yersinia enterocolitica in steaks sold at retail stores and supermarkets indicates a potential risk to consumers' health. These results also indicate the need for a mandatory implementation of preventive programs such as Standard Sanitation Operating Procedures (SSOPs) and Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) in the meat industry of Mexico.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was done with the financial support of the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN206401) of the Universidad Nacional Autónoma de México.

End of english version

Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in two geographically distant commercial beef processing plants in the United States. *J Food Prot* 2004;(67):295-302.

5. Li Y, Mustapha A. Development of a polymerase chain reaction assay to detect enteric bacteria in ground beef. *Food Microbiol* 2004;(21):369-375
6. Malorny B, Tassios PT, Radstrom P, Cook N, Wagner M, Hoorfar J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol* 2003;(83):39-48.
7. Olsen JE. DNA-based methods for detection of food-borne bacterial pathogens. *Food Res Int* 2000;(33):257-266.
8. Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiol Rev* 2005;(29):851-875.
9. Lantz PG, Knutsson R, Blixt Y, Al Soud WA, Borch E, Radstrom P. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in enrichment media and pork by a multiplex PCR: a study of sample preparation and PCR-inhibitory components. *Int J Food Microbiol* 1998;(45):93-105.
10. NOM-114-SSA1-1994 Norma Oficial Mexicana Bienes y Servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. Mexico, SSA (Ed.). 1994.
11. NOM-143-SSA1-1995. Norma Oficial Mexicana Bienes y Servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*. Mexico, SSA (Ed.). 1995.
12. Millar BC, Jiru X, Moore JE, Earle JA. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *J Microbiol Methods* 2000;(42):139-147.

DETECCION DE *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Y *Yersinia enterocolitica* EN CARNE DE RES

13. Silhavy TJ, Berman ML, Enquist LW. Experiments with gene fusions. NY, USA. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1984.
14. Marisa M, Luca C, Pierino F, Carlo C, Giuseppe C. A simple and fast PCR protocol to detect *Listeria monocytogenes* from meat. J Sci Food Agr 1997;(74):25-30.
15. Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galan JE, Ginocchio C, Curtiss R, Gyles CL. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. Mol Cell Probes 1992;(6):271-279.
16. Fenwick SG, Murray A. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by polymerase chain reaction. Lancet 1991;(337):496-497.
17. Sambrook J. Molecular Cloning: A laboratory manual. 3rd ed., NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
18. Peng H, Shelef LA. Automated simultaneous detection of low levels of listeriae and salmonellae in foods. Int J Food Microbiol 2001;(63):225-233.
19. Gonzalez K, Martinez VI, Mata TV, Espinosa MA, Alvarez OG, Morales LA. Detección molecular de *Listeria monocytogenes* en carne de res. Congreso Nacional de Microbiología. Rev Fac Salud Pub Nut. [en línea].http://www.respyn.uanl.mx/especiales/ee-5-2004/cartel_deteccion_juany/02.htm.
20. Fratamico P.M. Comparison of culture, polymerase chain reaction (PCR), TaqMan *Salmonella*, and Transia Card *Salmonella* assays for detection of *Salmonella* spp. in naturally-contaminated ground chicken, ground turkey, and ground beef. Mol Cell Probes 2003;(17):215-221.
21. Ríos LJM, Martínez VI, Mata TVL, Espinoza MA, Alvarez OG, Morales LA. Uso de la prueba molecular de PCR para la detección de *Salmonella* spp. en carne de bovino. Congreso de Inocuidad Alimentaria. Rev Fac Salud Púb Nut. [en línea].http://www.respyn.uanl.mx/especiales/ee-5-2004/cartel_deteccion_juany/01.htm.
22. Thisted LS, Danielsson TML. Identification and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* isolates by PCR and pulsed-field gel electrophoresis. Appl Environ Microbiol 2005;(71):3674-3681.
23. Vishnubhatla A, Oberst RD, Fung DY, Wonglumsom W, Hays MP, Nagaraja TG. Evaluation of a 5'-nuclease (TaqMan) assay for the detection of virulent strains of *Yersinia enterocolitica* in raw meat and tofu samples. J Food Prot 2001;(64):355-360.
24. Fredriksson AM, Hielm S, Korkeala H. High prevalence of *yadA*-positive *Yersinia enterocolitica* in pig tongues and minced meat at the retail level in Finland. J Food Prot 1999;(62):123-127.
25. Bacon RT, Belk KE, Sofos JN, Clayton RP, Reagan, JO, Smith, GC. Microbial populations on animal hides and beef carcasses at different stages of slaughter in plants employing multiple-sequential interventions for decontamination. J Food Prot 2000;(63):1080-1086.
26. United States Department of Agriculture, F.S.I.S. Pathogen reduction: hazard analysis and critical control point (HACCP) systems, final rule. Regist F. editor. 1996;(61):38805-38989.
27. Chmielewski RAN, Frank JF. Biofilm formation and control in food processing facilities. Compr Rev Food Sci Food Safety 2003;(2):22-32.
28. Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol Rev 1991;(55):476-511.
29. Allan JT, Yan Z, Kornacki JL. Surface material, temperature, and soil effects on the survival of selected foodborne pathogens in the presence of condensate. J Food Prot 2004;(67):2666-2670.
30. Holah JT, Taylor JH, Dawson DJ, Hall KE. Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. Symp Ser Soc Appl Microbiol 2002;111S-120S.
31. Kerr KG, Birkenhead D, Seale K, Major J, Hawkey PM. Prevalence of *Listeria* spp on the hands of food workers. J Food Prot 1993;(56):525-527.
32. Somers EB, Wong AC. Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. J Food Prot 2004;(67):2218-2229.

1