



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y  
RECURSOS NATURALES**

**“EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN DE *Staphylococcus aureus* Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS METICILINA RESISTENTE EN CANALES DE CONEJO (*Oryctolagus cuniculus*) DE RASTROS DEL ESTADO DE MÉXICO”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**PRESENTA:**

**MVZ VICTOR MANUEL GARDUÑO GUADARRAMA**

**EL CERRILLO PIEDRAS BLANCAS, TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, DICIEMBRE DEL 2015**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y  
RECURSOS NATURALES**

**“EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN DE *Staphylococcus aureus* Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS METICILINA RESISTENTE EN CANALES DE CONEJO (*Oryctolagus cuniculus*) DE RASTROS DEL ESTADO DE MÉXICO”**

# **T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**PRESENTA:**

**MVZ VICTOR MANUEL GARDUÑO GUADARRAMA**

**TUTOR ACADÉMICO**

**DR. VALENTE VELÁZQUEZ ORDÓÑEZ**

**TUTORES ADJUNTOS**

**DRA. MARÍA UXÚA ALONSO FRESÁN**

**DR. MARTÍN TALAVERA ROJAS**

**EL CERRILLO PIEDRAS BLANCAS, TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, DICIEMBRE DEL 2015**

**El presente trabajo de tesis de grado se desarrolló bajo el proyecto de investigación denominado: “Variación genética de aislamientos de *Staphylococcus aureus* MRSA obtenidos de vacas lecheras en unidades de producción familiar”. Con registro 3484/2013 CHT y bajo la responsabilidad del Dr. Valente Velázquez Ordóñez. Financiado por la Secretaría de Investigación de la Universidad Autónoma del Estado de México.**

## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca número 360812 otorgada para cursar mis estudios de Maestría en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales.

A la **Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM)**, por las facilidades otorgadas al proyecto eje de investigación que permitió realizar el proyecto de tesis.

Al **Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales (PCARN – UAEM)**, por coadyuvar en mi preparación académica y científica.

Al **Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México (CIESA – FMVZ – UAEM)**, por permitirme hacer uso de sus instalaciones, así mismo, por todas las facilidades otorgadas en la realización del presente trabajo.

A la **Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)**, delegación Estado de México, por su participación en facilitar la documentación que permitió realizar el muestreo en esta investigación.

A mi **Comité Tutorial: Dr. Valente Velázquez Ordóñez, Dra. María Uxúa Alonso Fresán y Dr. Martin Talavera Rojas**, por su enseñanza constante, paciencia y apoyo total. Muchas Gracias.

Al **Dr. Jesús Vázquez Navarrete**, investigador en el **Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CENID – Microbiología - INIFAP)**, por permitirme realizar una estancia en las instalaciones a su cargo, por sus consejos y enseñanzas.

A los **Representantes Legales de los rastros de conejos**, por permitirme el acceso a sus instalaciones.

## DEDICATORIAS

**A mis Padres: Regina y Alejo**, porque gracias a su amor, consejos y enseñanzas diarias hacen que me supere constantemente, por ser el ejemplo y orgullo de mi vida, porque gracias a ustedes soy quien soy, les quiero y admiro mucho, gracias.

**A la Familia Prado Garduño: Guadalupe, Alejandra, José Alejo y Omar**, por estar en todo momento, aún más cuando les necesito, por formar parte indispensable de la alegría de mi vida.

**A la Familia Garduño Sotelo: Alejandra, Silvana, Christian Alejandro y Alejandro**, por estar en todo momento, aún más cuando les necesito, por formar parte indispensable de la alegría de mi vida.

**A mis Abuelitos: Imelda ♡ Francisco y Ubalda<sup>†</sup> ♡ Aurelio<sup>†</sup>**; por ver en ustedes el ejemplo de luchas constates sin presentar derrotas, por entender de sus vidas que todo esfuerzo tiene su condecoración.

**A Dios**, porque gracias a él mantengo una paz interior que me guía a ser agradecido con todo lo que se me presenta en la vida.

**A mis amigos y compañeros del CIESA: Ana, Nancy, Raquel, Ingrid, Selene, Pamela, Fernanda, Sandra, Vero, Juan Luis, Juan Carlos, Fernando, Edgar, Jorge, Hugo, Saúl, Moisés, Héctor, Carlos, Ulises, Benjamín**, por todos los momentos de alegría, incertidumbre y perdición que vivimos juntos, por los buenos y malos momentos, por el apoyo otorgado.

## CONTENIDO

	PAG
CONTENIDO.....	I
ÍNDICE DE CUADROS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ABREVIATURAS.....	VII
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT.....	XI
1.    INTRODUCCIÓN.....	1
2.    REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. La Cunicultura en el contexto mundial.....	3
2.2. La cunicultura a nivel nacional.....	7
2.3. La cunicultura en el Estado de México.....	9
2.4. Sistemas de Producción Cunícola.....	12
2.5. Obtención de canales de conejo para abasto de carne.....	13
2.6. Disminución de riesgos en la contaminación de las canales de los conejos.....	21
2.7. Enfermedades Trasmítidas por Alimentos (ETA).....	30
2.8. Importancia sanitaria del <i>Staphylococcus aureus</i> .....	31
2.9. <i>Staphylococcus aureus</i> Oxacilina / Meticilina Resistente.....	36
2.10. Biotipificación de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	43
2.11. Formación de biofilms bacterianos.....	44
3.    JUSTIFICACIÓN.....	47
4.    HIPÓTESIS.....	48
5.    OBJETIVOS.....	49
6.    MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
6.1. Materiales.....	50
6.2. Métodos.....	54
6.2.1. Estudio Preliminar.....	54
6.2.2. Evaluación de la contaminación microbiológica de las canales de conejos.....	57
6.2.3. Selección de rastros comerciales.....	58
6.2.4. Determinación del tamaño de muestra.....	60

6.2.5. Recolección de las muestras.....	61
6.2.6. Conteo microbiológico de unidades formadoras de colonias en placa y por cm <sup>2</sup> .....	63
6.2.7. Aislamiento bacteriológico de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	64
6.2.8. Resistencia Antimicrobiana.....	65
6.2.9. Identificación de biotipos de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	66
6.2.10. Identificación de biofilm.....	67
6.2.11. Reacción en Cadena de la Polimerasa punto final y tiempo real.....	68
6.2.12. Determinación de puntos críticos de control en los rastros...	72
6.2.13. Evaluación de resultados .....	72
7. RESULTADOS.....	73
7.1. Estudio Preliminar.....	73
7.2. Evaluación de la contaminación microbiológica de las canales de conejos.....	78
7.3. Prevalencia de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	84
7.4. Resistencia Antimicrobiana.....	84
7.5. Identificación de biotipos.....	85
7.6. Identificación del biofilm.....	86
7.7. Amplificación de gen <i>mecA</i> por medio la Reacción en Cadena de la Polimerasa en punto final y tiempo real .....	87
7.8. Determinación de los puntos críticos de control en los rastros...	91
8. DISCUSIÓN.....	109
9. CONCLUSIONES.....	117
10. SUGERENCIAS.....	118
11. BIBLIOGRAFÍA.....	119
12. PRODUCTOS DE GRADO.....	140
12.1. Envío de artículo a revista científica.....	140
13. ANEXOS TÉCNICOS.....	165

## ÍNDICE DE CUADROS

	PAG
Cuadro 1. Principales países productores de conejos.....	7
Cuadro 2. Principales países consumidores de carne de conejo.	7
Cuadro 3. Existencia de animales vivos reportados por Entidad Federativa al año 2007.....	9
Cuadro 4. Aturdimiento por electro insensibilización.....	15
Cuadro 5. Signos de aturdimiento profundo e inadecuado.....	16
Cuadro 6. Factores de virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	35
Cuadro 7. Tamaño y proporción de la muestra.....	61
Cuadro 8. Biotipos de <i>S. aureus</i> .....	67
Cuadro 9. Secuencias de los iniciadores para el gen <i>mecA</i> .....	69
Cuadro 10. Resultados del estudio piloto con plantilla de 2.5 cm por 2.5 cm.....	73
Cuadro 11. Resultados del estudio piloto con plantilla de 5.0 cm por 5.0 cm.....	74
Cuadro 12. Resultados del estudio piloto con plantilla de 10.0 cm por 10.0 cm.....	75
Cuadro 13. Nivel de contaminación de <i>Staphylococcus aureus</i> considerando una superficie de muestreo de 2.5 cm por 2.5 cm en una dilución $1 \times 10^{-3}$ .....	76
Cuadro 14. Nivel de contaminación de <i>Staphylococcus aureus</i> considerando una superficie de muestreo de 5.0 cm por 5.0 cm en una dilución $1 \times 10^{-3}$ .....	76
Cuadro 15. Nivel de contaminación de <i>Staphylococcus aureus</i> considerando una superficie de muestreo de 10.0 cm por 10.0 cm en una dilución $1 \times 10^{-3}$ .....	77
Cuadro 16. Nivel de contaminación por <i>Staphylococcus aureus</i> en las diferentes zonas de muestreo considerando el área en $\text{cm}^2$ .....	77
Cuadro 17. Conteo bacteriológico de las UFC en placa del Rastro A.....	78
Cuadro 18. Conteo bacteriológico de las UFC en placa del Rastro B.....	79
Cuadro 19. Conteo bacteriológico de las UFC en placa del Rastro C.....	80
Cuadro 20. Conteo bacteriológico de las UFC/ $\text{cm}^2$ del Rastro A...	81



<b>Cuadro 21. Conteo bacteriológico de las UFC/cm<sup>2</sup> del Rastro B...</b>	<b>82</b>
<b>Cuadro 23. Conteo bacteriológico de las UFC/cm<sup>2</sup> del Rastro C...</b>	<b>83</b>
<b>Cuadro 23. Prevalencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en los rastros cunícolas.....</b>	<b>84</b>
<b>Cuadro 24. Prueba de tamizado de Oxacilina (1µg).....</b>	<b>84</b>
<b>Cuadro 25. Patrón de resistencia antimicrobiana a meticilina....</b>	<b>85</b>
<b>Cuadro 26. Distribución de biotipos de <i>Staphylococcus aureus</i> aislados de canales de conejo.....</b>	<b>86</b>
<b>Cuadro 27. Determinación de biofilm en aislamientos de <i>Staphylococcus aureus</i>.....</b>	<b>87</b>
<b>Cuadro 28. Identificación genotípica para MRSA.....</b>	<b>90</b>
<b>Cuadro 29. Ficha de descripción del producto y determinación de uso presunto en los rastros.....</b>	<b>91</b>
<b>Cuadro 30. Evaluación de riesgos sanitarios de los rastros cunícolas de Huixquilucan, San Felipe del Progreso y Tecámac...</b>	<b>104</b>
<b>Cuadro 31. Hoja de Análisis de Peligros.....</b>	<b>106</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	PAG
Figura 1. Flujograma del procedimiento para el sacrificio de conejos en rastro.....	19
Figura 2. Puntos de aplicación de los electrodos para conseguir el aturdimiento en los conejos.....	14
Figura 3. Punto de aplicación y dirección para conseguir el aturdimiento mecánico por concusión en los conejos.....	15
Figura 4. Ejemplificación de la aplicación de un árbol de decisiones para determinar los PPC.....	28
Figura 5. Mecanismo de resistencia a la meticilina por <i>S. aureus</i> .	38
Figura 6. Prevalencia de HA-MRSA a nivel mundial.....	39
Figura 7. Ubicación de los municipios donde se encuentran los rastros cunicolas cooperantes.....	57
Figura 8. Localización topografía del municipio de Huixquilucan.	58
Figura 9. Localización topografía del municipio de San Felipe del Progreso.....	59
Figura 10. Localización topografía del municipio de Tecámac.....	60
Figura 11. Áreas muestreadas en la canal de conejo.....	62
Figura 12. Colocación de la plantilla en la canal.....	62
Figura 13. Ejemplo de frotación de la canal.....	63
Figura 14. Identificación bacteriológica de <i>S. aureus</i> por métodos microbiológicos y bioquímicos.....	64
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación de la PCR.....	70
Figura 16. Representación gráfica de las fases de amplificación de la PCR en tiempo real.....	71
Figura 17. Identificación de biotipos en agar cristal violeta.....	85
Figura 18. Identificación de biofilm por el método de agar rojo Congo.....	86
Figura 19. Identificación de biofilm por el método Christensen....	86
Figura 20. Amplificación de ADN por PCR punto final del gen <i>mecA</i> .....	87
Figura 21. Gráfica de la PCR tiempo real para identificación del gen <i>mecA</i> .....	88
Figura 22. Gráfica de la PCR tiempo real con amplificaciones del gen <i>mecA</i> en rastro A.....	88

<b>Figura 23. Gráfica de la PCR tiempo real con amplificaciones del gen <i>mecA</i> en rastro B.....</b>	<b>89</b>
<b>Figura 24. Gráfica de la PCR tiempo real con amplificaciones del gen <i>mecA</i> en rastro C.....</b>	<b>89</b>
<b>Figura 25. Arribo de conejos en el Rastro de Huixquilucan.....</b>	<b>93</b>
<b>Figura 26. Área de degüelle en el rastro de Huixquilucan.....</b>	<b>94</b>
<b>Figura 27. Pieles de conejos desolladas.....</b>	<b>94</b>
<b>Figura 28. Inspección post mortem de una canal de conejo.....</b>	<b>95</b>
<b>Figura 29. Jaulas de resguardo para conejos.....</b>	<b>96</b>
<b>Figura 30. Delimitación del área de izado.....</b>	<b>97</b>
<b>Figura 31. Nave de resguardo para animales destinados al sacrificio.....</b>	<b>99</b>
<b>Figura 32. Método de electro insensibilización en conejos.....</b>	<b>99</b>
<b>Figura 33. Izado del conejo.....</b>	<b>100</b>
<b>Figura 34. Degüelle del conejo.....</b>	<b>100</b>
<b>Figura 35. Desollado del conejo.....</b>	<b>101</b>
<b>Figura 36. Eviscerado del conejo.....</b>	<b>101</b>
<b>Figura 37. Patología en hígado de conejo identificada en la Inspección post mortem.....</b>	<b>102</b>
<b>Figura 38. Lavado de la canal del conejo.....</b>	<b>102</b>
<b>Figura 39. Área de escurrimiento de canales de conejo.....</b>	<b>103</b>
<b>Figura 40. Conservación en refrigeración de una canal de conejo.....</b>	<b>103</b>

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP	Ampicilina
ATCC	Cepa de Referencia
BHI	Infusión Cerebro Corazón
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
BPP	Buenas Prácticas de Producción
°C	Grados Celsius
CA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina de adquisición comunitaria
CC	Complejo Clonal
CDC	Centers for Diseases Control and Prevention (Centro de Control y Prevención de Enfermedades)
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CIESA	Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal
ETA	Enfermedades Trasmisibles por Alimentos
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
HACCP	Sistema de Análisis de Peligros y Control de Puntos Críticos
dNTPs	Desoxinucleótidos
FOX	Cefoxitina
HA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina de adquisición hospitalaria
kb	Kilo bases
LA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina asociado al ganado
PVL	Panton-Valentine Leukocidin (Leucocidina de Panton – Valentine)

<b>M</b>	<b>Molar</b>
<b>MH</b>	<b>Mueller-Hinton (medio de cultivo)</b>
<b>mL</b>	<b>Mililitro</b>
<b>mm</b>	<b>Milímetro</b>
<b>mM</b>	<b>Milimolar</b>
<b>MRSA</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina</b>
<b>MSA</b>	<b>Mannitol Salt Agar (medio de cultivo)</b>
<b>MSSA</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i> sensible a meticilina</b>
<b>OXA</b>	<b>Oxacilina</b>
<b>OMS</b>	<b>Organización Mundial de la Salud</b>
<b>pb</b>	<b>Pares de bases</b>
<b>PBP</b>	<b>Penicillin Binding Protein (proteína de unión a la penicilina)</b>
<b>PCR</b>	<b>Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)</b>
<b>PEN</b>	<b>Penicilina</b>
<b>POES</b>	<b>Procedimientos de Operación Estándar de Sanitización</b>
<b>S</b>	<b><i>Staphylococcus</i></b>
<b>SCC<sub>mec</sub></b>	<b>Casete Cromosómico Estafilocócico del gen <i>mecA</i></b>
<b>SCN</b>	<b><i>Staphylococcus</i> coagulasa negativos</b>
<b>SCP</b>	<b><i>Staphylococcus</i> coagulasa positivos</b>
<b>TSST</b>	<b>Toxina del Síndrome de Shock Tóxico</b>
<b>UV</b>	<b>Ultravioleta</b>

# “EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN DE *Staphylococcus aureus* Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS METICILINA RESISTENTE EN CANALES DE CONEJO (*Oryctolagus cuniculus*) DE RASTROS DEL ESTADO DE MÉXICO”

Garduño-Guadarrama, Victor Manuel; Velázquez-Ordoñez, Valente; Alonso-Fresán, María Uxúa; Talavera-Rojas Martín.

**Palabras clave:** *Staphylococcus aureus* meticilina resistencia, contaminación, canales de conejos, rastros, alerta sanitaria.

## RESUMEN

La presencia de *Staphylococcus aureus* en los alimentos es de importancia en salud pública por su posible contaminación, generando una alerta por la ocurrencia de enfermedades transmitidas por alimentos, siendo de interés en el comercio global y en los países en vías de desarrollo. El tratamiento de esta enfermedad, se realiza principalmente con antibióticos  $\beta$ -lactámicos; sin embargo, se ha reportado aislamientos de *S. aureus* resistentes a este tipo de antibióticos. En la actualidad, existe gran preocupación por la presencia de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA). El objetivo de este estudio fue evaluar el nivel de contaminación por *S. aureus* y su resistencia a meticilina asociados a la contaminación en la superficie de 217 canales de conejos procedentes de tres rastros comerciales localizados en el Estado de México. Las muestras se obtuvieron por hisopado de cuatro áreas de la canal considerando el muslo, lomo, costillar y cuello en un área total de 25 cm<sup>2</sup> y fueron transportadas en agua peptonada al 2% a 4° C hasta su análisis microbiológico. Las muestras se inocularon en agar Baird Parker incubadas a 37° C por 48 h. Las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) positivas a telurito y lecitinasa se inocularon en agar Sal y Manitol a 37° C por 24h. A las UFC manitol positivo se les realizó tinción de Gram, prueba de catalasa, coagulasa, y oxidasa. La caracterización de las cepas de MRSA se realizó identificando los biotipos, biofilm y el antibiotipo ORSA/MRSA, así como su identificación a través de la PCR, correlacionando la contaminación de *S. aureus* meticilina resistente y los riesgos sanitarios en el

proceso de obtención de las canales de conejos determinando los puntos críticos de control en los rastros estudiados. Los resultados se evaluaron mediante la prueba de Análisis de Varianza de un factor y prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ), a partir de los UFC/placa  $1 \times 10^{-3}$ . Del total de muestras obtenidas el 57.76 % fueron positivas a *S. aureus* y 32.23 % presento resistencia a meticilina. El rastro con mayor contaminación mostró valores de  $165,678.38 \pm 25,129.38$  UFC/cm<sup>2</sup>. Los biotipos identificados fueron biotipo A (humano) 77.68 %; biotipo C (bovino/ovino), 9.09 % y biotipo E (canino/equino), 1.62 %. El 11.57 % se clasificaron como no específico. Se determinó un 14.8 % de biofilm con el método de identificación en tubo y 6.6 % con el método de agar rojo Congo. Se considera que los biotipos asociados al nivel elevado de contaminación *S. aureus* meticilina resistente identificados, pueden ser considerados un indicador del nivel de contaminación de la superficie de las canales de conejos, atribuida a una manipulación inadecuada durante el proceso de faenado de las canales y a una posible contaminación ambiental de los rastros, representando una alerta sanitaria para la salud humana y animal.

**“EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN DE *Staphylococcus aureus* Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS METICILINA RESISTENTE EN CANALES DE CONEJO (*Oryctolagus cuniculus*) DE RASTROS DEL ESTADO DE MÉXICO”**

**“EVALUATION OF *Staphylococcus aureus* CONTAMINATION AND**

Garduño-Guadarrama, Victor Manuel; Velázquez-Ordoñez, Valente; Alonso-Fresán, María Uxúa; Talavera-Rojas Martín.

**Key words:** Meticillin resistant *Staphylococcus aureus*, contamination, rabbit carcasses, abattoirs, public health alarm.

**ABSTRACT**

The presence of *Staphylococcus aureus* in foods is of public health importance for possible contamination, generating an alert for the occurrence of foodborne, with interest in global trade and in the developing countries diseases. Treatment of this disease is mainly  $\beta$ - lactam antibiotic; however, it has been reported *S. aureus* isolates resistant to these antibiotics. At present, there is great concern about the presence of methicillin resistant (MRSA) *S. aureus*. The aim of this study was to assess the level of contamination by *S. aureus* and methicillin resistance associated with contamination on the surface of carcass 217 rabbits from three commercial trails located in the State of Mexico. Samples were obtained by swabbing four areas of the carcass considering the thigh, loin, rib and neck in a total area of 25 cm<sup>2</sup> and were transported in 2% peptone water at 4 ° C for microbiological analysis. Samples were inoculated on Baird Parker agar incubated at 37 ° C for 48 h. The positive tellurite and lecithinase Colony Forming Units (CFU) were inoculated into mannitol salt agar at 37 ° C for 24 h. At UFC underwent mannitol positive Gram stain, catalase test, coagulase, oxidase. The characterization of strains of MRSA was performed identifying biotypes, biofilm and antibiotype ORSA / MRSA as well as their identification through PCR, correlating pollution of methicillin-resistant *S. aureus* and health risks in the process of obtaining carcasses of rabbits by determining the critical control points on the trails studied. The results were evaluated by analysis of variance test of a factor and



Tukey test ( $P < 0.05$ ) from the UFC / plate  $1 \times 10^{-3}$ . Of all the samples obtained 57.76% were positive for *S. aureus* and 32.23% showed resistance to methicillin. The trail was more pollution values  $165,678.38 \pm 25,129.38$  CFU /  $\text{cm}^2$ . The identified strains were biotype A (human) 77.68%; biotype C (cattle / sheep), 9.09% and biotype E (canine / equine), 1.62%. The 11.57% were classified as non-specific. 14.8% of biofilm was determined with the method of identification in tube and 6.6% agar with the Congo red method. It is considered that the biotypes associated with high levels of pollution identified methicillin-resistant *S. aureus*, can be considered an indicator of the level of surface contamination of carcasses of rabbits, attributed to improper handling during dressing of carcasses and a possible environmental contamination of trails, representing a health alert for animal and human health.

## 1. INTRODUCCIÓN

La carne de conejo se consume desde la época de la prehistoria; hoy en día, México es el país más rico del Continente Americano en cuanto a diversidad de lagomorfos y en los últimos años la sociedad mexicana ha exigido cada vez más los platillos que contienen carne de conejo por sus propiedades nutricionales (OEIDRUSBC, 2009). Sin embargo, se desconoce ampliamente la calidad microbiológica de esta carne.

La inocuidad juega un papel indispensable desde la obtención de la canal, hasta el proceso de los diferentes productos cárnicos para el bienestar de los consumidores. Las condiciones sanitarias deficientes durante el sacrificio de los animales, un almacenamiento incorrecto y una higiene inconstante durante el proceso de los productos cárnicos, son factores que predisponen a las personas a sufrir Enfermedades Transmisibles por Alimentos (ETA) o a que se conviertan en portadores asintomáticos de alguna enfermedad infecto – contagiosa (Marzocca, *et al.*, 2006).

El *Staphylococcus aureus*, puede producir una amplia gama de enfermedades en el hombre, que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas, hasta enfermedades de riesgo vital como meningoencefalitis, peritonitis y endocarditis entre otras; además, puede afectar al aparato gastrointestinal, ya sea por presencia física de la bacteria o por la ingesta de la enterotoxina preformada en los alimentos (Lowy, 1998). En los animales causa enfermedades graves tales como mastitis, artritis, dermatitis exudativa, abscesos subcutáneos, osteomielitis y septicemias (Hermans *et al.*, 2004).

*S. aureus* es un microorganismo muy resistente a las condiciones ambientales y extremadamente difíciles de erradicar, pese a que no produce esporas, soporta condiciones extremas, aunque puede llegar a inactivarse a temperatura de congelación. Así mismo, es uno de los grandes retos para la salud, a consecuencia de que existen cepas que han generado resistencia y multi-resistencia a los antibióticos que se utilizan en medicina humana y animal (Vandendriessche *et al.*, 2013).

La detección de *S. aureus* oxacilina / meticilina resistente (ORSA/MRSA) en animales juega un papel importante en la epidemiología de la infección humana y por el contacto con animales productores de alimentos y de compañía portadores de cepas MRSA representando un riesgo para la bienestar social (Lee, 2003).

Investigaciones en México referentes a la detección de ORSA/MRSA son escasas. La presencia de estas cepas en canales de conejo del país no se han investigado, así mismo, la resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, lo que representa una alerta sanitaria a nivel mundial. El objetivo de este trabajo fue evaluar el nivel de contaminación microbiana de *S. aureus* en canales de conejo de rastros del Estado de México y la caracterización de la resistencia antimicrobiana ORSA/MRSA.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. La Cunicultura en el Contexto Mundial

El conejo común (*Oryctolagus cuniculus*) es una especie de mamífero lagomorfo de la familia Leporidae, y el único miembro actual del género *Oryctolagus*:

Clasificación Taxonómica:

Reino: animal

Sub Reino: Metazoos

Clase: Mamíferos

Sub Clase: Placentarios

Orden: Lagomorfos

Tipo: Cordados

Sub Tipo: Vertebrados

Familia: Lepóridos

Género: *Oryctolagus*

Especie: *Cuniculus*

El conejo está incluido en la lista de “100 de las especies exóticas invasoras más dañinas del mundo” publicada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. Durante la Edad Media, este animal de enormes orejas comenzó a domesticarse y a criarse dentro de jaulas, dando origen a la que hoy se conoce como cunicultura. (Lowe *et al.*, 2000).

La cunicultura industrial inició su desarrollo en Europa a finales de 1970, fue en la década de los ochenta cuando surgieron toda una serie de técnicas orientadas a mejorar la producción, en los noventas se desarrolla una cunicultura industrial especializada en producción de carne con base a líneas genéticas de conejos modernos, en la cual las empresas son asistidas por gente de negocios, nutriólogos, patólogos, genetistas y mercadólogos quienes dirigen una empresa

altamente competitiva respecto al resto de empresas productoras de carne que explotan diferentes especies animales (Lebas *et al.*, 1986).

En México se realizó un estudio sobre la cunicultura en el cual menciona la existencia de datos históricos, que demuestran que los romanos en el siglo I a.c., mantenían conejos en cautiverio con el fin de producir carne y entre el siglo VI y X, los monjes franceses comenzaron a seleccionar conejos para formar una línea descendente de mayor aptitud cárnica. No obstante, sólo hasta el siglo XVI se menciona que aparecen las primeras variaciones de la capa de pelaje del conejo y las primeras razas pioneras definidas (OEIDRUSBC, 2009).

Existe información de antecedentes en la producción cunícola basados en la venta de alimento comercial como lo indicaron (Colín y Lebas, 1992), los cuales estimaron que existía cerca de 64.2 millones de conejos hembras en el mundo, posteriormente (Lukefahr, 1999), hizo una estimación conservadora de 70.9 millones, de la cual el 82 % se explotan en los países más ricos; los cuales producían cerca del 70 % de la carne de conejo a nivel mundial. Los mismos autores estimaron en 1986 que la producción mundial de carne de conejo era de la orden de 1'200,000 toneladas, de las que el 43.6 % eran producidas por la cunicultura rural a pequeña escala, y el 56.4 % producto de la cunicultura industrial. Sin embargo en el año 2015, no existen reportes de la producción total de la cunicultura nacional, pero se estima que la producción está muy por arriba de los datos reportados anteriormente.

La carne de conejo se consume desde la época de la prehistoria, por mencionar algunos países, se tiene Francia y Bélgica, más tarde se desplazó hacia la Península Ibérica hasta llegar hasta lugares como África y América (OEIDRUSBC, 2009).

### **2.1.1. Producción Mundial de Carne de Conejo**

En el año 2010, la Organización de las Naciones Unidas (ONU) a través de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), promueve el interés en los países mediterráneos, africanos y latinoamericanos

para que se incorporen a la cría de conejos, diversificando la ganadería, las fuentes de empleo, de ingresos y sobre todo para garantizar la alimentación siguiendo las directrices de calidad e inocuidad agroalimentaria.

El potencial de producción de carne de conejo se considera subestimado; así mismo, se presenta como una alternativa para los países en desarrollo, considerando su bajo costo con respecto a otros animales domésticos y por muchas razones es, en ocasiones concebida como la única especie con un futuro de producción potencial según la Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable del Estado de Baja California, la cual sustenta su opinión en un estudio realizado con datos estimados de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y del Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) publicados en 2009. El estudio señalado engloba un análisis de la producción de carne de conejo por país, estimando que el país número uno en la producción de carne de conejo a nivel mundial es China, seguido de Italia, España y Francia, sin embargo, México se estimó en la posición número catorce.

### **2.1.2. Consumo de carne de conejo en el mundo**

La producción mundial de conejos puede ser estimada en 1.84 millones de toneladas de canales, lo que representa un crecimiento de alrededor del 14 % en relación a la estimación realizada en 1996. Teniendo en cuenta la evolución de la población mundial entre estas dos estimaciones, esto nos conduce a un consumo estable de carne de conejo del orden de 300 gramos/habitante/año (SAGARPA, 2003).

Europa Occidental produce 647.45 toneladas de carne de conejo al año lo que representa el 35 % de la producción mundial por lo que, a pesar de haber disminuido su producción en un 6.5 %, sigue siendo el principal productor de ésta carne en el mundo. El segundo lugar lo ocupa el Lejano Oriente ya que ha tenido un crecimiento importante del 125% lo que hace que actualmente en esta zona se esté produciendo alrededor de las 520,000 toneladas de este alimento lo que equivale al 28 % de la producción mundial. Europa del Este con una producción de

326,000 toneladas aporta el 18% de la producción mundial ocupando de esta manera el tercer sitio mientras que los países del Norte de África con un crecimiento de su producción del 49.4 % están produciendo 121,000 toneladas que viene siendo el 6.6 % de la producción mundial. El 12 % de la producción faltante lo producen las 7 zonas restantes (SAGARPA, 2003).

Los mayores volúmenes de producción se concentran en siete países con inventarios de más de 3 millones de conejos cada uno, estos países representan el 54% de la población mundial de conejas reproductoras. En los países con más de un millón de conejas reproductoras se encuentra México, este grupo de países representa el 23% de la población de conejos a nivel mundial (Cuadro 1). En Norte y Centroamérica la producción de esta carne no es muy popular y su consumo se mantiene bajo (SAGARPA, 2003).

**Cuadro 1.** Principales países productores de conejos.

<b>País</b>	<b>Millones</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Italia	7.3	12
China	6.0	10
Ucrania	4.9	8
Rusia	4.2	7
Francia	3.9	6
España	3.8	6
Egipto	3.2	5
Indonesia	2.6	4.2
E.U.A.	2.4	3.8
Nigeria	2.1	3.3
Filipinas	1.6	2.5
Alemania	1.4	2.3
Bielorrusia	1.3	2.0
Argelia	1.0	1.6
Tailandia	1.0	1.6
México	1.0	1.5

(SAGARPA, 2003).

El consumo anual *per cápita* en algunas regiones del mundo tiende a ser elevado, en Europa Occidental se aprecia un consumo de 1.7 kg de carne de conejo. Esto corresponde a un consumo medio de carne de conejo de 6 a 7 veces por año para cada europeo. En segundo lugar Europa del Este con 0.9 kg. En tercer nivel de consumo se encuentra el Norte de África, con 0.6 kg por habitante al año, más de dos veces el consumo medio mundial. Para las otras ocho regiones del mundo, el consumo anual de carne de conejo por habitante es inferior a la media mundial. A

nivel de país se puede indicar que existen 6 países con una producción mayor de 100,000 ton/año entre los que destacan China e Italia (Maggi, 2008).

SAGARPA, 2003 reporta un total de 673,145 cabezas a nivel nacional y menciona que la mayoría de las unidades de producción son rurales. Respecto al consumo de carne de conejo en México comparado con otros países es bajo, pues el promedio de consumo no sobre pasa los 200 gramos/habitante/año (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Principales países consumidores de carne de conejo

<b>País</b>	<b>Kg/hab.</b>
Malta	8.205
Italia	5.284
Chipre	4.079
Bielorrusia	2.893
España	2.752
Ucrania	2.234
Bélgica	2.199
Francia	2.077
Portugal	2.040
Luxemburgo	1.932
Rep. Checa	1.704
México	0.156

(SAGARPA, 2003).

## **2.2. La Cunicultura a nivel nacional**

En México, la cunicultura cuenta con varios sistemas de producción y distribución en la comercialización directa de conejos. Esta actividad se formalizó mediante diversos programas desarrollados por el Gobierno Federal desde el año de 1973; cuando por primera vez se impulsó la producción de conejos para carne, autorizando y financiando la construcción del centro nacional de cunicultura en Irapuato, Guanajuato. En los años 80 el consumo y la producción de su carne se incrementó, creando interés hacia las instancias académicas y de investigación. Esta actividad se reporta en todo el país. Once Estados están en proceso de organización orientada al mercado interno. Se refieren que la cunicultura a pequeña escala representa el 90 % de la producción de conejos en nuestro país, y la producción industrial representa sólo el 10% (ANCUM, 2011).

La SAGARPA del Gobierno Federal, reconoció en 2001 de manera oficial a la cunicultura como actividad ganadera, y el Sistema Nacional de Información dio inicio al registro estadístico nacional de esta actividad productiva (Gallardo, 2003).



A finales de los años 90, nace la Asociación Nacional de Cunicultores de México, A.C. la cual hasta la fecha promueve esta cultura de crianza como actividad ganadera en el país. Así mismo, el consumo nacional de la carne de conejo per cápita nacional oscila entre los 100 a 120 gramos por persona al año, debido al poco conocimiento del público sobre sus cualidades nutricionales o por algunos mitos que han rodeado al mamífero por décadas (ANCUM, 2011).

La existencia de datos sobre el número de cabezas de conejos reportadas en el país se encuentran en el VIII Censo Agrícola, Ganadero y Forestal, Instituto Nacional de Geografía e Informática (INEGI, 2007), estableció que el primer productor nacional cunícola era el Estado de México (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Existencia de animales vivos reportados por Entidad Federativa al año 2007.

<b>Entidad federativa</b>	<b>Conejos</b>	<b>Entidad federativa</b>	<b>Conejos</b>
<b>Estados unidos mexicanos</b>	<b>500 349</b>	<b>Estados unidos mexicanos</b>	<b>500 349</b>
Aguascalientes	8 189	Morelos	10 349
Baja California	7 290	Nayarit	1 689
Baja California Sur	1 738	Nuevo León	2 219
Campeche	770	Oaxaca	14 573
Coahuila de Zaragoza	2 769	Puebla	73 498
Colima	2 615	Querétaro	8 149
Chiapas	11 885	Quintana roo	581
Chihuahua	7 149	San Luis Potosí	3 509
Distrito Federal	17 375	Sinaloa	3 627
Durango	5 497	Sonora	2 158
Guanajuato	16 554	Tabasco	851
Guerrero	7 321	Tamaulipas	2 092
Hidalgo	34 731	Tlaxcala	26 348
Jalisco	16 226	Veracruz Llave	23 526
México	151 054	Yucatán	2 745
Michoacán de Ocampo	29 066	Zacatecas	4 206

(INEGI, 2007).

En la época actual, el conejo que se explota en la República Mexicana, destinado para la producción de carne, es criado a través de modernas instalaciones diseñadas específicamente para la especie. En este lugar, los lagomorfos reciben diariamente cuidados especiales y una alimentación balanceada basada en

insumos de alto contenido en fibras como la alfalfa, el girasol y el salvado. Esta actividad es comparable a la utilizada en países europeos productores de carne de conejo como Italia, Francia y España. La demanda de conejo por la industria restaurantera y en los centros de consumo en toda la República Mexicana, se incluyen en su variedad de especialidades gastronómicas, platillos preparados con carne de conejo, fomentando así una nueva forma de comer y de concebir este alimento como sano, nutritivo y delicioso, (ANCUM, 2011).

La calidad mexicana de la carne de conejo es reconocida en los países de Centro América, cuenta con todos los procesos de regulación y normas de higiene y calidad para una mayor seguridad de los consumidores. Estas normas son supervisadas por diversas organizaciones de productores, comercializadores, investigadores y especialistas de la rama cunícola, cuyos integrantes desarrollaron desde el 2005 la Norma de Clasificación de Carne de Conejo en Canal, en la que se establecen varias categorías de clasificación de carne de conejo. En el país las razas más comunes y utilizadas en la cría y comercialización de conejo son la Nueva Zelanda Blanco, California, Chinchilla, Mariposa, Satinado Rojo, y algunos otros como el Azteca Negro, especies de tamaño medio con pesos adultos que oscilan entre los 4 y 5 kilogramos de peso vivo. Generalmente la mayoría de la población está acostumbrada a consumir carne de ganado bovino, porcino, aviar o acuícola, pero pocos consumen carne de conejo, desconociendo ampliamente las propiedades nutritivas de esta carne, que se está convirtiendo en una nueva alternativa de nutrición y sabor para los platillos de las mesas mexicanas con muy diversos estilos de preparación (OEIDRUSBC, 2009).

### **2.3. La cunicultura en el Estado de México**

Datos del Instituto Nacional de Geografía e Informática (INEGI) de 1986, refieren que el Estado de México pudo ser considerado desde 1980 como el primer productor de conejos a nivel nacional, el mayor dinamismo se encuentra en los municipios conurbanos con el Distrito Federal, como Texcoco, Ecatepec, Cuautitlán, Cd. Nezahualcóyotl, Chimalhuacán, Chalco e Ixtapaluca; en los municipios del norte del Estado, como Atlacomulco, El Oro, Temascalcingo,

Jocotitlan e Ixtlahuaca, y en los denominados corredores gastronómicos como la Marquesa y Tenancingo (Mendoza *et al.*, 2001).

En 1996 el Gobierno del Estado de México promovió un programa de paquetes familiares compuestos por tres hembras y un macho, logrando colocar alrededor de 35 000 conejos entre un amplio sector rural y urbano. El servicio de información agroalimentaria y pesquera (SIAP) público un informe que estimó el volumen de producción de carne de conejo de 842 toneladas en el año 2004, en este informe el Estado de México no tiene reporte (SAGARPA, 2004). Sin embargo, por su amplio interés en el sector cunícola se ha posicionado como el primer productor y consumidor de conejos a nivel nacional (INEGI, 2007). Sesenta municipios practican la cunicultura, teniendo como estadística de producción; 80 % familiar, 15 % comercial y 5 % industrial, con una demanda potencial de 350 toneladas por semana con tendencia al aumento (ANCUM, 2010).

La incipiente investigación de estudios de mercado en cunicultura refiere que Texcoco, es el municipio a nivel nacional con el consumo de carne de conejo más alto, estimado en 250 g. y que el consumo promedio a nivel nacional es de 100 g. por persona al año, con ese dato se calcula que en el Estado de México con 14 millones de habitantes se tiene un consumo anual aproximado de 1,396 toneladas y un consumo semanal de 26.8 ton. de carne de conejo, para cubrir esa demanda se requiere tener un inventario total de 27,000 hembras de vientre en producción alojadas en 54,000 m<sup>2</sup> de superficie construida, equipada con 54,000 jaulas y el consumo semanal de 243 000 mil Kg de alimento comercial como dieta única. Es necesario señalar que las más importantes tiendas departamentales y de autoservicio del país se han acercado a la Asociación Nacional de Cunicultores de México y han puesto de manifiesto su interés por comercializar la carne a nivel nacional, en conjunto estas tiendas de autoservicio, tienen una demanda estimada de más de 50 toneladas de carne de conejo a la semana; para atenderla se requiere que al inventario ya existente se sumen cuando menos 50,000 hembras al proceso de producción. Sin embargo, falta considerar otros nichos de mercado como los restaurantes de las zonas turísticas y urbanas del país, comedores

industriales, hospitales y pequeños comercios de las zonas urbanas, suburbanas y rurales. (ANCUM, 2011).

Los Cunicultores Mexiquenses promovieron un estudio sobre el consumo de la carne de conejo en el Estado de México en Septiembre del 2009, el cual fue financiado por la Dirección de Comercialización, de la Secretaria de Desarrollo Agropecuario (SEDAGRO) y realizado por una Despacho de Mercadotecnia y Comunicación, los resultados demostraron que en el 2% de las amas de casa (34,000 mujeres) que viven en las grandes zonas urbanas consumen regularmente la carne de conejo, significando un consumo semanal estimado en 6 toneladas, adicionalmente el mismo estudio indica que el 29% de las mujeres entrevistadas refieren que alguna vez han consumido carne de conejo en su hogar y que aprecian los atributos de esta carne pero no la consumen regularmente por no estar disponible en las carnicerías, lo anterior supone una importante demanda potencial y una gran oportunidad para los productores (ANCUM, 2011).

Los conejos como productores de carne, son altamente reproductivos debido a su corto periodo de gestación de 31 días y la gran prolificidad; una hembra puede producir hasta 80 Kg. de carne por año; más de 20 veces su peso. El consumo de este alimento es saludable, contiene propiedades ricas en proteínas y bajas en grasas, es económico y puede ser habitual en una dieta diaria. Desde hace mucho tiempo la carne de conejo ha estado en un segundo plano por considerarla de categoría inferior al resto de carnes como por ejemplo la de ternera o vaca, mucho más caras y a la vez ricas en ácidos grasos saturados. El consumo frecuente de la carne de conejo, sobre todo en niños, adolescentes y mujeres embarazadas aporta beneficios nutricionales y un alto contenido en proteínas, vitaminas y minerales. Asimismo, ayuda a evitar padecimientos de salud ligados a enfermedades coronarias, colesterol elevado y a las que se derivan del exceso de peso o de las dietas inadecuadas, logrando un mejor funcionamiento de los sistemas digestivo y circulatorio (OEIDRUSBC, 2009).

Según datos de Ortega, 2007, al realizar el diagnóstico estático de la cunicultura en el Estado de México, observó que el 59.2% de los productores sacrifican sus

conejos en su casa, otro 21.1% los sacrifica en la misma granja, el 5.2% los vende vivos como gazapos destetados o a peso de mercado pero vivos; solo el 0.2% de productores cuenta con un rastro especializado para el sacrificio de sus animales, el porcentaje faltante lo comercializa de distintas formas.

#### **2.4. Sistemas de Producción Cunícola**

Los sistemas de producción cunícola en el Estado de México se encuentran bien definidos y diferenciados, divididos en tres producciones (Mendoza, 2001) caracterizados de la siguiente manera:

##### 1) Producción de Traspatio o Extensivo

Corresponde al 80% de la producción orientada básicamente al autoconsumo; venta de los excedentes de producción. Sistemas poco o nada tecnificados. La alimentación es, generalmente, a base de subproductos agrícolas o de desechos (pan y/o tortilla dura, por ejemplo). El volumen de conejo producido bajo este sistema es de gran importancia para satisfacer la demanda de los mercados existentes; el manejo sanitario es poco o nulo. Los excedentes de producción son absorbidos por intermediarios, quienes, generalmente, castigan el precio; la venta directa al consumidor se practica de manera habitual.

##### 2) Producción Semi-intensivo o Semi-empresarial

Utilizan Sistemas semi-intensivos aportando el 15% de la producción producto de las mejoras en manejo reproductivo y nutricional. Su producción se comercializa generalmente, por medio de intermediarios o de manera directa a clientes fijos, además, utilizan la venta al consumidor directo de manera ocasional.

##### 3) Producción Intensivo o Empresarial / Industrial

El sistema genera el 5% de la producción, en algunas granjas se utiliza inseminación artificial o monta natural de los tres a los nueve días cubrición post-parto; los alimentos utilizados son diferentes en engorda y reproducción. Manejo

sanitario riguroso. Generalmente su producción se destina a restaurantes o centros comerciales de manera directa. La venta al público directamente es mínima o nula.

## **2.5. Obtención de canales de conejo para abasto de carne**

El correcto proceso de sacrificio de los conejos se debe realizar en los establecimientos especializados para el abasto de esta carne hacia los consumidores. Los establecimientos de sacrificio pueden clasificarse dependiendo el tamaño de la planta de proceso, las facilidades de operación y su registro sanitario. Los rastros comerciales se pueden clasificar por su registro ante la Secretaría de Salud o por su autorizado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

Los mataderos son unidades de proceso a pequeña escala, que cuentan con facilidades mínimas de operación para el sacrificio. Las unidades de producción familiar pueden faenar canales para autoconsumo y venta regional, los cuales no cuentan con instalaciones para realizar el proceso adecuado de higiene en la obtención de las canales (Signorini *et al.*, 2005).

En la Figura 1 se observa el diagrama de flujo propuesto para el proceso de sacrificio en los conejos de abasto para la obtención higiénica de la carne, considerando las diferentes etapas que se realizan en el faenado de canales (Signorini *et al.*, 2005). En esta figura se pueden apreciar diferentes etapas como: recepción y descanso de animales, inspección ante mortem, sacrificio, obtención de la canal, inspección pos mortem y conservación de la canal.

Las etapas consideradas para la obtención de la canal del conejo son:

**Arribo de animales.** Durante el arribo y manejo de los animales, los responsables deberán realizar prácticas que garanticen niveles de bienestar y les eviten dolor, sufrimiento, ansiedad, traumatismos y estrés (NOM-033-SAG/ZOO-2014).

**Inspección ante-mortem.** La verificación sanitaria previa al sacrificio asegura que en la producción de carne para consumo humano sólo se acepten animales aparente o clínicamente sanos (Signorini *et al.*, 2005).

**Aturdimiento.** El aturdimiento es la pérdida de la conciencia provocada por métodos mecánicos o eléctricos aplicados en la cabeza; en el caso de los conejos el método más recomendable es el electro aturdimiento, donde se utiliza una tenaza con dos electrodos de acero inoxidable, colocando uno a cada lado de la cabeza (Figura 2), donde la zona de la piel en contacto con los electrodos debe estar mojada (NOM-033-SAG/ZOO-2014).

**Figura 2.** Puntos de aplicación de los electrodos para conseguir el aturdimiento en los conejos.



(Tomado de NOM-033-SAG/ZOO-2014).

De la energía eléctrica, lo que provoca el aturdimiento de los animales es el amperaje que pasa por el cerebro durante los primeros 2 a 3 segundos del tiempo recomendado para esta especie (Cuadro 4). El voltaje facilita la transmisión del amperaje, ya que vence la resistencia o impedancia que ofrecen los diferentes tejidos del animal al paso de la corriente, por lo cual es importante que el rango de voltaje que deben abarcar los aparatos sea entre 125 y 200 volts. El amperaje para aturdir a los conejos es de 0.3 amperes (NOM-033-SAG/ZOO-2014).

El aturdimiento mecánico por concusión es un método que implica golpear la base de la cabeza en la parte superior del cuello en la región occipital a través de un solo movimiento firme y certero con un objeto alargado, romo, sin filo y macizo

(Figura 3). Para la aplicación de este método, el conejo debe estar inmobilizado, de tal manera que no haya error al momento de realizar el golpe. Sólo debe ser llevado a cabo por personal capacitado para este fin (NOM-033-SAG/ZOO-2014). El método de aturdimiento mecánico por concusión podría ser aplicado en pequeños lotes de animales.

**Cuadro 4.** Aturdimiento por electro insensibilización.

<b>Especie</b>	<b>Amperaje (amperes)</b>	<b>Tiempo de aplicación* (segundos)</b>	<b>Frecuencia (Hertz)</b>
Cerdos (100 kg)	1.25	4 a 7	---
Ovinos	1.0 a 1.25	4 a 10	---
Caprinos	1.0 a 1.25	4 a 10	---
Pollos de engorda	0.1	4 a 7	50
Gallinas ponedoras (al final del ciclo de producción)	0.1	4 a 7	50
Pollos	0.1	4 a 7	Menor a 200
	0.15	4 a 7	De 200 a 400
	0.2	4 a 7	De 400 a 1500
Avestruces	1.0	3 a 5	---
<b>Conejos</b>	<b>0.3</b>	<b>2 a 3</b>	<b>---</b>

\*El tiempo máximo de aplicación es de 10 segundos en todas las especies.

(Tomado de NOM-033-SAG/ZOO-2014).

El personal responsable o designado debe comprobar que se haya realizado un efectivo aturdimiento (Cuadro 5), en caso contrario, se debe aturdir de nuevo e inmediatamente al conejo, antes de pasar al degüelle (NOM-033-SAG/ZOO-2014).

**Figura 3.** Punto de aplicación y dirección para conseguir el aturdimiento mecánico por concusión en los conejos.



(Tomado de NOM-033-SAG/ZOO-2014).



**Cuadro 5.** Signos de aturdimiento profundo e inadecuado.

<b>Aturdimiento adecuado o profundo</b>	<b>Aturdimiento inadecuado</b>
Colapso inmediato del animal	Animales en pie
No hay reflejo corneal	Presencia del reflejo corneal
Dilatación de las pupilas y mirada fija	Parpadeo espontáneo
No hay rotación del globo ocular	Rotación total del globo ocular
Respiración arrítmica o irregular	Respiración regular
Estado tónico (15 seg.), contracción de miembros posteriores, estiramiento de miembros anteriores, contracción de la espalda y cuello	Reflejo de enderezamiento cuando se cuelgan en la riel
Estado clónico (20 seg.), movimiento de pataleo o carrera	Vocalizaciones
Mínimo de patadas	Intento de levantarse
No hay reacción al corte de yugulares y carótidas	Hay reacción al corte de yugulares y carótidas
Contracción del escroto	

(Tomado de NOM-033-SAG/ZOO-2014).

Los animales que van a ser sacrificados deben ser manejados cuidadosamente en las diferentes etapas de la línea de proceso como lo recomienda Signorini *et al.*, 2005, para no provocar sufrimiento innecesario, de no aplicarse estas medidas, los animales sufrirán un estrés excesivo y el pH del músculo será mayor al normal, lo que permite el asentamiento y multiplicación de microorganismos alterantes y patógenos. Las etapas del proceso de la línea de sacrificio de los animales de abasto son las siguientes:

**Izado.** Radica principalmente en evitar la contaminación al realizar la faena en el piso, o en camas para este fin, ya que, la sangre residual en los músculos es la misma independientemente de la posición del desangrado. Bajo condiciones normales, el volumen total de sangre retenida en los músculos supone el 15% del total de sangre contenida en el animal.

**Degüelle.** Después del aturdimiento e izado, la muerte se provoca por desangrado, cortando las yugulares y carótidas. Este corte se debe realizar en un lapso no mayor a 20 segundos posteriores al aturdimiento (NOM-033-SAG/ZOO-

2014). La retención de sangre en las masas musculares hace propensa a la carne a una rápida descomposición. El cuchillo con el que se realice esta operación debe conservarse limpio ya que, de no ser así, las bacterias pueden ser introducidas al sistema circulatorio y de esta manera distribuirse hacia los músculos considerados estériles si el animal no presenta enfermedades. Por lo tanto, es de suma importancia que en esta área cuenten con un esterilizador de cuchillos con agua a 82°C con el propósito de que los cuchillos utilizados para el degüello sean desinfectados.

**Desollado.** Una vez eliminadas las cabezas, manos y patas, se inicia el proceso de desprendiendo la piel es necesario evitar el contacto del cuchillo con la piel del animal, así como que la piel se enrolle hacia adentro y roce la canal. Se debe evitar el uso de utensilios de corte no desinfectados. Estas consideraciones operativas son de suma importancia para evitar la contaminación de la carne con microorganismos presentes en la piel de los animales, pues la primer fuente de contaminación microbiológica de la carne es la piel del animal que se faena y la de los animales próximos a él. Entre los microorganismos de este origen se incluye la flora normal de la piel (micrococos, pseudomonas, estafilococos, levaduras y hongos), así como otros de origen fecal y del suelo.

**Eviscerado.** La evisceración debe realizarse inmediatamente después del desollado para evitar el paso de bacterias intestinales a través de los vasos sanguíneos y con ello, la contaminación de la canal. Es preciso evitar la ruptura de estómago e intestinos para no causar contaminación de la canal con bacterias entéricas presentes en su contenido. Se deben separar las vísceras rojas de las verdes. Ninguna de éstas puede colocarse en el piso debido a la contaminación que se puede producir bajo esas condiciones.

**Inspección post mortem.** El propósito fundamental de la inspección post mortem es la protección de la salud, humana y animal, ante riesgos directos e indirectos. Abarca todos los aspectos higiénico-sanitarios de los productos cárnicos y sus derivados, desde la producción hasta su comercialización.

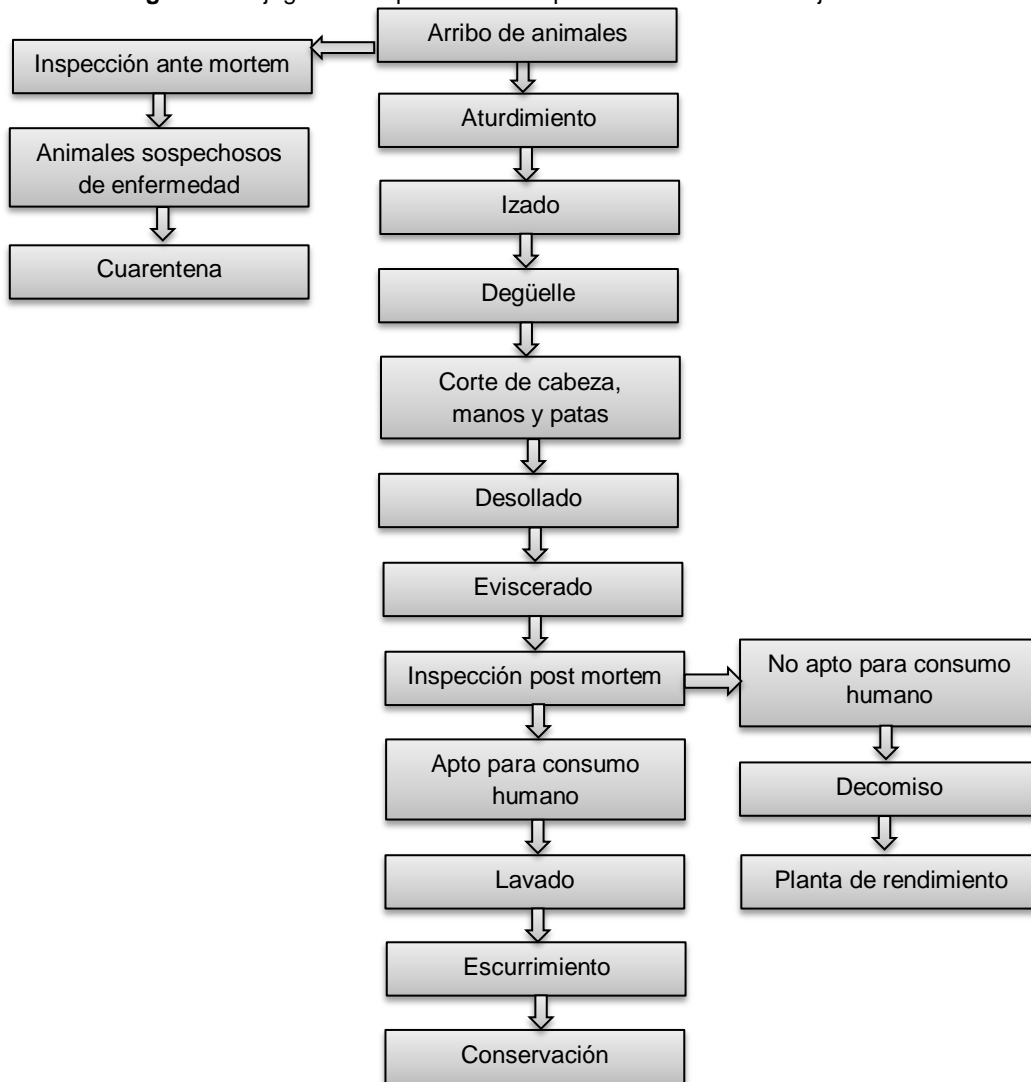
**Lavado.** Se realiza con agua a presión, lo que permite eliminar, por arrastre, los posibles focos de contaminación. Es muy importante verificar que el agua utilizada en este proceso sea potable para evitar la contaminación de las canales que se puede presentar en el caso de que el agua presente microorganismos alterantes o patógenos. Si el agua no cumple con las especificaciones sanitarias debe ser tratada para potabilizarla. El lavado debe ser a presión únicamente (efecto físico), sin utilizar ningún utensilio.

**Escurrimiento.** Ya lavadas las canales deben escurrirse y orearse previamente a su refrigeración con el propósito de facilitar los procesos bioquímicos que se dan en los músculos post-mortem (NOM-194-SSA1-2004).

**Conservación.** Las canales deben almacenarse a una temperatura de entre 0 a 4°C en refrigeración y a menos 18°C en congelación. El propósito de conservar a estas temperaturas las canales es retardar el crecimiento bacteriano y su consecuente deterioro. Por otra parte, es necesario mantener secas y limpias las cámaras de conservación, así como llevar los registros de temperatura y controles de tiempo-temperatura, así mismo, deben ser lavadas y desinfectadas para evitar la proliferación de microorganismos indeseables que pudieran contaminar la carne.

La NMX-FF-105-SCFI-2005, establece las características que deben reunir las canales de conejo para abasto que se comercialicen en todo el territorio nacional, con el fin de asegurar a los consumidores un producto de calidad, que cumpla con las disposiciones sanitarias y zoonosológicas vigentes, la norma es de carácter voluntario y para que las canales de conejo sean motivo de clasificación, deben provenir de animales sacrificados en plantas TIF o en rastros registrados y autorizados, por lo que en el Estado de México, existe un marcado retraso en el adecuado sacrificio y manejo sanitario de la carne de conejo.

**Figura 1.** Flujograma del procedimiento para el sacrificio de conejos en rastro.



(Adaptado de Signorini *et al.*, 2005 con modificaciones para el sacrificio de conejos).

### 2.5.1 Contaminación en canales de conejos

La contaminación de la carne de conejo puede ocurrir a partir de animales portadores de infecciones cutáneas superficiales y profundas las cuales se presentan en las unidades de producción cunícola (Devriese *et al.*, 1981). Es posible que durante la manipulación de los animales de basto, al momento de realizar el proceso de faenado pueda ocurrir una contaminación cruzada entre los animales portadores de alguna bacteria y los operarios mal higienizados, lo cual facilitaría la contaminación de equipo y utensilios empleados en el proceso de sacrificio y conservación de las canales de conejo (Rodríguez, 2006).

Durante la comercialización de las canales de conejo, en mercados populares y centros de abasto se ha identificado la presencia de un alto porcentaje de canales contaminadas con *S. aureus* y otros patógenos de riesgo a la salud pública entre estos *Salmonella* y *E. coli* (Velázquez, *et al.*, 2008). La contaminación de las canales de conejo por *S. aureus* constituye un indicador del grado de contaminación microbiana por la manipulación durante el proceso de sacrificio y los métodos inadecuados de conservación de la carne (Farkas, 2001). así mismo, la posibilidad de ocurrencia de cepas de *S. aureus* portadoras de factores de virulencia de importancia sanitaria en la producción cunícola y de riesgo a la inocuidad alimentaria por la presencia de *S. aureus* productores de enterotoxinas, los cuales pueden contaminar la carne y sus derivados en los procesos de manufactura incrementando el riesgo en las intoxicaciones alimentarias (Fernández, 2008; Huang y Platt, 2003). Igualmente la presencia de *S. aureus* portadores de resistencia bacteriana a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, incluidas las multiresistentes asociadas a las cepas LA-MRSA de origen animal (Ortega *et al.*, 2009). Es posible que también puedan presentarse cepas MRSA en las canales de conejo derivadas de procesos de manufactura con deficiencias en la aplicación de las buenas prácticas de higiene y desinfección, lo cual hace necesario evaluar la presencia bacteriana en las canales de conejos de rastros comerciales, identificando el riesgo sanitario que pueda afectar a la población.

### **2.5.2. Riesgos por contaminación en la canal del conejo**

En general, la calidad microbiológica de las canales está condicionada por las propias características de cría del animal, incluido su estado sanitario en el momento del sacrificio, el proceso de obtención de la carne y su posterior procesado. La conjunción de estos factores junto con otros de carácter ambiental, sobre todo la temperatura de almacenamiento, determinará la microbiota característica de la carne (Dainty *et al.*, 1983; Gill, 1998).

La contaminación de la canal de conejo se puede dar por varios factores insalubres, originados por el personal que labora en los rastros o los mismos animales. En los animales, el principal problema es el pioderma; término médico

para las infecciones bacterianas de la piel que ocurren en los conejos. Normalmente, están presentes distintas bacterias en la piel y mucosas del conejo, sin causar enfermedad. Sin embargo, con algún descuido higiénico sanitario, esto puede verse en peligro, permitiendo que las bacterias proliferen causando enfermedad. Por lo general, una infección bacteriana de la piel se produce cuando hay una ruptura en la piel del conejo, generalmente ocurre cuando se ha estado expuesto a las malas condiciones ambientales, incluyendo la humedad.

Las bacterias consideradas como causantes de pioderma en el hombre y animales son: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pasteurella multocida*. Las bacterias también pueden penetrar oralmente o quedar atrapado en la piel, particularmente cuando se sacrifican conejos con malas condiciones de crianza y de ambientes insalubres (Hermans *et al.*, 2004).

## **2.6. Disminución de riesgos en la contaminación de las canales de los conejos**

Para disminuir los posibles riesgos de contaminación en las canales faenadas y prevenir consecuencias graves para la salud de los consumidores, se consideran diferentes programas como son las BPM, los POES y el HACCP.

### **2.6.1. Buenas prácticas de Manufactura (BPM)**

Las BPM son consideradas un conjunto de procedimientos, actividades, condiciones, controles de tipo general que se aplican en los establecimientos dedicados al sacrificio de animales para consumo humano, con el objeto de disminuir los riesgos de contaminación física, química o biológica, sin perjuicio de otras disposiciones legales aplicable en materia de Salud Pública (SENASICA, 2010a). Son una herramienta básica para la obtención de productos seguros para el consumo humano, que se centralizan en la higiene y forma de manipulación, mediante las siguientes características:

1. Manejo previo y frecuente en el diseño y funcionamiento para el desarrollo de procesos y productos.

2. Contribuir con el aseguramiento de una producción de alimentos inocuos para el consumo humano.
3. Son necesarias e indispensable para la aplicación del Sistema HACCP o de un programa de Gestión de Calidad Total.
4. Generación de inspecciones rutinarias, de la infraestructura, el personal, la manipulación y las condiciones generales.

### **2.6.2. Procedimientos Operativos Estándares de Sanitización (POES)**

Los POES son todos aquellos procedimientos de operación estandarizada de limpieza y desinfección aplicables al personal, instalaciones y equipo del establecimiento antes, durante y después de las operaciones del proceso. Son procedimientos que se aplican a las plantas procesadoras de alimentos para mantener las BPM en las operaciones de producción, deben de ser monitoreados, registrados y verificados diariamente, incluyendo acciones correctivas. Se enfatizan en la eliminación de fuentes de contaminación microbiológica, de forma directa e indirecta, describiendo ¿qué?, ¿cómo?, ¿cuándo? y ¿dónde? limpiar y desinfectar, así como los registros y advertencias que deben llevarse a cabo, con las sustancias y los utensilios a emplear. Los programas de limpieza y desinfección deberán vigilarse de manera constante y eficaz y cuando sea necesario, documentarse la idoneidad y eficacia de los programas (FAO, 2009). En la República Mexicana los POES son un requisito obligatorio para todos los establecimientos Tipo Inspección Federal (TIF), establecido en la normatividad, considerando registros diarios de todos los procedimientos realizados durante las jornadas de trabajo (NOM-008-ZOO-1994).

### **2.6.3. Análisis de peligros y de puntos críticos de control (HACCP) en la obtención de la carne**

El sistema de HACCP, que tiene fundamentos científicos y carácter sistemático, permite identificar peligros específicos y medidas para su control con el fin de garantizar la inocuidad de los alimentos. Es un instrumento para evaluar los

peligros y establecer sistemas de control que se centran en la prevención en lugar de basarse principalmente en el ensayo del producto final. Todo sistema de HACCP es susceptible de cambios que pueden derivar de los avances en el diseño del equipo, los procedimientos de elaboración o el sector tecnológico.

El sistema de HACCP puede aplicarse a lo largo de toda la cadena alimentaria, desde el productor primario hasta el consumidor final, y su aplicación deberá basarse en pruebas científicas de peligros para la salud humana. Además de mejorar la inocuidad de los alimentos, la aplicación del sistema de HACCP puede ofrecer otras ventajas significativas, facilitar asimismo la inspección por parte de las autoridades de reglamentación, y promover el comercio internacional al aumentar la confianza en la inocuidad de los alimentos eliminando riesgos (FAO, 2009).

Un riesgo se define como la probabilidad de que se desarrolle cualquier vulnerabilidad a causa de una propiedad biológica, química o física para la salud del consumidor además de que estas influyan en la seguridad o en la alteración del alimento. Los riesgos que se corren en el rastro desde la recepción de los animales hasta su distribución, son: pérdida de la calidad de la carne por maltrato de los animales, sacrificio de animales enfermos, contaminación de canales inocuas, sangrado ineficiente que proporciona un medio para la proliferación de microorganismos, contaminación de la canal por cuchillos mal desinfectados, mal control de la refrigeración, lo que permite el desarrollo de carga microbiana inicial y contaminación por manipulación del personal enfermo o portador de enfermedades asintomáticas. Las medidas preventivas recomendables son: examen minucioso de los animales antes del sacrificio, destrucción completa de canales y vísceras decomisadas, lavado y desinfección previo de las instalaciones y equipo donde se sacrificará a los animales, evisceración inmediata posterior al desollado, potabilizar el agua, inspección permanente de los sistemas de enfriamiento y control de la salud de los trabajadores. Así mismo, un punto crítico de control, que es cualquier operación en el proceso donde la pérdida de control puede resultar en un riesgo para la salud, puede afectar en las actividades del



rastros, presentes en la inspección de los animales previa al sacrificio, en todo el proceso del sacrificio y en el almacenamiento de canales y vísceras, por lo que todo el proceso deberá ser constantemente supervisado (González *et al.*, 1997).

El sistema HACCP tiene como finalidad analizar los peligros y contrarrestar los riesgos existentes en un proceso o actividad mediante la aplicación de los siete principios siguientes:

**Principio 1.** Realizar un análisis de peligros.

**Principio 2.** Determinar los Puntos Críticos de Control (PCC).

**Principio 3.** Establecer límites críticos para cada PCC.

**Principio 4.** Establecer un sistema de vigilancia para cada PCC.

**Principio 5.** Establecer las medidas correctivas que habrán de adoptarse cuando la vigilancia en un PCC indique una desviación respecto a un límite crítico establecido.

**Principio 6.** Establecer procedimientos para verificar que el plan HACCP trabaja adecuadamente.

**Principio 7.** Establecer un sistema de documentación sobre todos los procedimientos y los registros apropiados para estos principios y su aplicación.

Existen lineamientos publicados por diversos organismos internacionales que difieren en algunos aspectos, pero que toman como estructura básica los siete principios, los cuales deben de seguirse para preparar un plan HACCP efectivo.

Para tener un sistema eficaz de análisis de peligros y puntos críticos de control primeramente se debe realizar los siguientes pasos:

**1. Formación del equipo HACCP.** Debe nombrarse un coordinador HACCP el cual será responsable en su totalidad. Se debe de formar un equipo multidisciplinario con conocimientos específicos y competencia técnica adecuados al producto. Debe de involucrarse todo el personal: mandos superiores, mandos

medios, operarios de línea, personal de limpieza, almacenista, sin olvidar el lugar que ocupan dentro del organigrama de la planta y el flujograma del proceso.

**2. Descripción del producto.** Primeramente, el equipo HACCP debe realizar una descripción general del alimento, desde los ingredientes hasta el procesamiento. La descripción del producto debe estar registrada y debe incluir información relevante para la inocuidad como: composición, estructura física y química, embalajes, validez, formas de almacenamiento y métodos de distribución.

**3. Determinación del uso al que ha de destinarse.** Describe el uso normal que se espera para este producto, por ejemplo, si será cocinado o no antes del consumo. El consumidor esperado puede ser el público en general o un segmento particular de la población. Esta etapa es importante porque ciertos grupos son más sensibles que otros a los peligros alimentarios.

**4. Elaboración de un diagrama de flujo.** Un diagrama de flujo debe incluir todas las etapas del proceso que se encuentran bajo control directo del establecimiento. Además, el diagrama de flujo puede incluir etapas de la cadena alimentaria que se encuentran antes y después del proceso que se realiza en el establecimiento.

**5. Verificación práctica del diagrama de flujo.** El equipo HACCP debe revisar en el establecimiento, la exactitud y si el flujograma está completo. Las modificaciones deben realizarse en el flujograma cuando proceda y todos los cambios deben ser documentados (FAO, 2009).

Para el desarrollo y posterior monitoreo del plan HACCP es indispensable que el diagrama de flujo sea correcto, ya que en él se identificarán cruce de flujos y potenciales contaminaciones cruzadas y posteriormente en el mismo se especificarán los puntos críticos de control. Después de completar estos cinco pasos preliminares, se aplicarán los siete principios del HACCP.

La FAO, 2009 describe a los siete principios del HACCP de la siguiente manera:

**Principio 1. Realizar un análisis de peligros.** Se enumeran todos los peligros asociados a cada fase del proceso y estudio de las medidas preventivas para el

control de los riesgos. Para poder controlar los peligros potenciales se debe de realizar lo que se conoce como análisis de peligros, es decir; determinar dónde están localizados y que se puede hacer para prevenir que ocurran. Se enumeran los peligros biológicos, químicos y físicos que pudieran producirse en cada fase, mediante la descripción posterior de las medidas preventivas aplicables a cada caso. De acuerdo con la metodología HACCP solo deberán tomarse en cuenta aquellos riesgos cuya eliminación o reducción sea esencial para la inocuidad de los productos, sin embargo es recomendable que en la primera etapa de elaboración del plan HACCP se incluyan todos los peligros detectados, así como sus respectivas medidas preventivas, para hacer una valoración adecuada del cumplimiento de los prerrequisitos (Campos, 2004).

Para la adecuada aplicación de este principio se deben tomar en cuenta aspectos como la experiencia profesional del equipo HACCP, datos epidemiológicos e información técnico científica disponible al momento de la elaboración del plan. El equipo deberá identificar los peligros potenciales (patógenos), identificar las fuentes potenciales y puntos específicos de contaminación mediante el análisis de cada proceso, determinar el potencial de los microorganismos para sobrevivir o multiplicarse en cada proceso y valorar los riesgos y la severidad de los peligros identificados (Campos, 2004).

La información recopilada del análisis de peligros se puede usar para determinar la severidad de los mismos; los riesgos asociados a los peligros identificados en las fases de operación; posteriormente son usadas con el propósito de prevenir un peligro en la inocuidad del alimento, o bien pueda eliminarse o reducirse a un nivel aceptable.

El riesgo es una función de la probabilidad de un efecto adverso y la magnitud de ese efecto, referente a peligros en alimentos. Los niveles de riesgo pueden categorizarse como alto (H), moderado (M), bajo (L) y despreciable (N).

**Principio 2. Determinar los Puntos Críticos de Control (PCC).** Aplicación de la secuencia de decisiones en cada fase para determinar los PCC. Las guías del

Codex definen un PCC como "la etapa en la que puede aplicarse un control y que es esencial para prevenir o eliminar un peligro relacionado con la inocuidad de los alimentos o reducirlo hasta un nivel aceptable". Si se identifica un peligro en una etapa en la que el control es necesario para mantener la inocuidad y no existe ninguna medida de control que pueda adoptarse en esa etapa o en cualquier otra, el producto o el proceso deberá modificarse en esa etapa, o en cualquier etapa anterior o posterior, para incluir una medida de control.

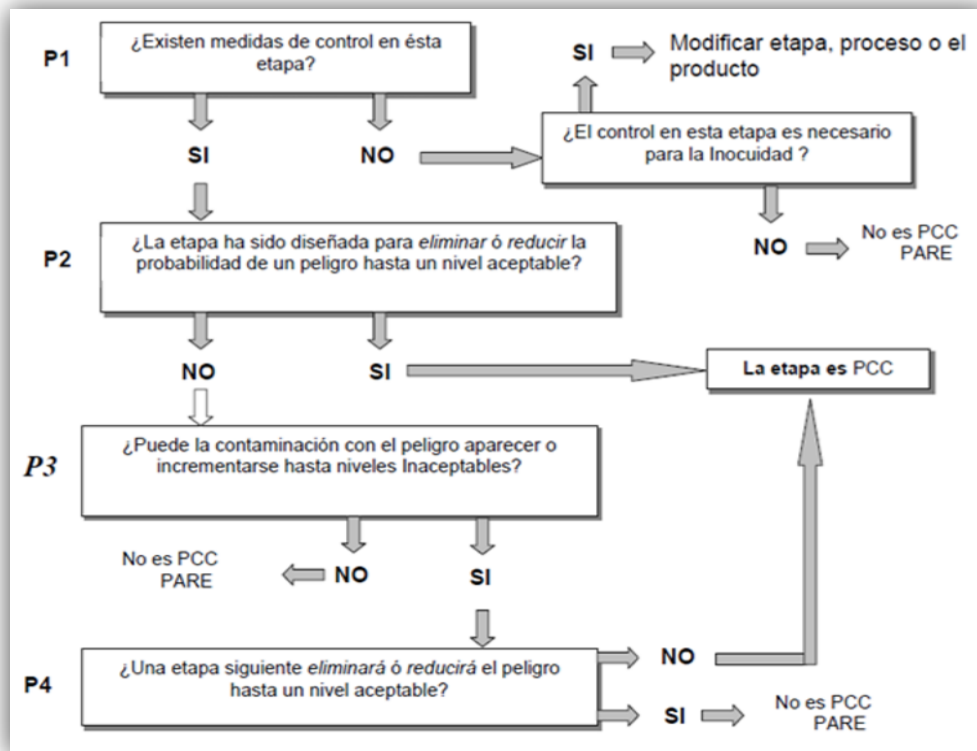
La determinación de un PCC en el sistema HACCP puede ser facilitada por la aplicación de un árbol de decisiones (Figura 4), como el que está incluido en el Análisis de Peligros y Control de Puntos Críticos (HACCP) del Codex y donde se exponen las pautas lógicas para su aplicación. La aplicación del árbol de decisiones deberá ser flexible según el tipo de operación.

**Principio 3. Establecer límites críticos para cada PCC.** Se definen límites críticos como criterios de control que separa lo aceptable de lo inaceptable. Un límite crítico representa los valores absolutos que se usan para juzgar si la operación suministra productos seguros. Los límites críticos deben reunir los requerimientos de las regulaciones gubernamentales y/o deben estar basados en datos científicos. En algunos casos, las autoridades regulatorias que controlan alimentos proporcionan información a partir de la cual se establecen los límites críticos, basados en los peligros alimentarios conocidos y en los resultados del análisis de peligros.

**Principio 4. Establecer un sistema de vigilancia para cada PCC.** Establecer un sistema de vigilancia para cada PCC. La guía de aplicación del Codex define a la vigilancia como "el acto de dirigir una sucesión planeada de observaciones o mediciones de los parámetros de control para evaluar si un PCC está bajo control." La Vigilancia es la medida programada de observación de un PCC para determinar si están respetándose los límites críticos. Los procedimientos supervisados deben determinar la pérdida de control del PCC a tiempo para prevenir la producción de alimento no apto o retenerlo. La vigilancia es la herramienta que confirmará si el plan de HACCP funciona adecuadamente, el cual

debe proporcionar información a tiempo para permitir cualquier ajuste del proceso y prevenir la pérdida de control del proceso y de los límites críticos que se exceden.

**Figura 4.** Ejemplificación de la aplicación de un árbol de decisiones para determinar los PPC.



(Tomado de FAO, 2009).

**Principio 5. Establecer las medidas correctivas que habrán de adoptarse cuando la vigilancia en un PCC indique una desviación respecto a un límite crítico establecido.** El Codex define a la acción correctiva como "cualquier acción a ser tomada cuando los resultados de la vigilancia de un PCC indican una pérdida de control". La pérdida de control es considerada como una desviación del límite crítico de un PCC. Los procedimientos de desviación son un conjunto predeterminado y documentado de acciones que deben llevarse a cabo cuando una desviación ocurre. Todas las desviaciones deben ser controladas mediante acciones establecidas para controlar al producto no conforme y corregir la causa de la desviación. El control del producto incluye la identificación apropiada, control

y disposición del producto afectado y la identificación apropiada. Las acciones correctivas tomadas deben registrarse y archivarse. La diversidad de desviaciones posibles en cada PCC involucra a más de una acción correctiva necesaria en cada PCC. Cuando una desviación ocurre, probablemente se detecte durante la vigilancia rutinaria del PCC. Los procedimientos que prescriben las acciones correctivas a tomar cuando ocurra una desviación, deben ser entendibles para que los empleados responsables del control del PCC puedan realizar dichas acciones en el caso de presentarse una desviación.

**Principio 6. Establecer procedimientos para verificar que el plan HACCP trabaja adecuadamente.** El Codex define la verificación como "la aplicación de métodos, procedimientos, pruebas y otras evaluaciones, que además de vigilar, sirven para determinar la complacencia con el plan HACCP". Vigilan y auditan los métodos, procedimientos y controles, que incluyen muestreos aleatorios, pruebas y análisis, pueden ser utilizados para determinar si el sistema HACCP está trabajando correctamente. Los procedimientos de verificación son necesarios para evaluar la efectividad del plan y confirmar que el sistema HACCP funciona de acuerdo con lo establecido. La verificación le permite al productor contrastar las medidas de control y asegurar que el control es suficiente para cubrir todas las posibilidades de desvíos. La verificación debe ser hecha por un individuo apropiadamente calificado o por varios individuos que sean capaces de detectar las deficiencias en el plan o en su aplicación. La verificación debe emprenderse siempre que haya actualizaciones del plan HACCP, la rutina que supervisa las actividades de los límites críticos no debe confundirse con los métodos de verificación, procedimientos o actividades.

**Principio 7. Establecer un sistema de documentación sobre todos los procedimientos y los registros apropiados para estos principios y su aplicación.** Los registros son evidencia escrita a través de la que se documenta un acto, estos son esenciales para verificar la suficiencia del plan y la adhesión del sistema HACCP al plan. Un registro muestra la historia del proceso, los controles,

las desviaciones y las acciones correctivas (incluso la disposición del producto) que ocurrieron al PCC identificado.

Para una adecuada implementación del plan HACCP, son indispensables dos programas de prerequisites: Buenas prácticas de Manufactura (BPM) y Procedimientos Operativos Estándar de Sanitización (POES), ambos permiten controlar el ambiente alrededor del alimento, de esta manera ayuda a reducir los puntos críticos de control, mientras que el HACCP se ocupa del control de peligros intrínsecos al alimento mismo.

## **2.7. Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA)**

Las enfermedades causadas por alimentos cárnicos contaminados son un problema de salud extendido en el mundo, siendo ocasionadas por microorganismos patógenos (OMS, 2007), las cuales tienden a aumentar en diferentes países. En nuestro país en el año de 1990 se reportaron 28121 casos de enfermedades intestinales, de las que un alto porcentaje está provocado por el consumo de alimentos contaminados (SSA, 2010).

Las ETA continúan siendo un problema real y enorme en los países desarrollados y en desarrollo, provocando grandes pérdidas económicas y sanitarias. Se ha estimado que hasta un tercio de la población de los países desarrollados podría sufrir cada año los efectos de ETA, es probable que el problema de salud sea todavía más extendido en los países en desarrollo, donde las enfermedades diarreicas transmitidas por los alimentos y el agua acaban cada año con la vida de unos 2,2 millones de personas, niños en la mayoría. Los riesgos químicos de los alimentos provocan ocasionalmente enfermedades agudas, y algunos aditivos alimentarios, residuos de plaguicidas y medicamentos veterinarios y contaminantes ambientales pueden plantear riesgos de efectos nocivos a largo plazo en la salud pública (OMS, 2007).

La intoxicación alimentaria por *Staphylococcus* es una ETA importante en el ámbito mundial. De los brotes de intoxicación que se presentan en promedio, el 20% se debe al consumo de alimentos contaminados con enterotoxinas, bacterias

del género *Staphylococcus* y principalmente, por la especie *S. aureus*. En México, el Laboratorio Nacional de Salud Pública, en un estudio realizado 1980 y 1989, se confirmó que en el 45% de los brotes de ETA, el *S. aureus* se encontró como agente causal, ocasionando 792 casos y 5 defunciones; condición que en la actualidad por el porcentaje no ha disminuido significativamente (SSA, 2010).

El avance de los conocimientos científicos sobre los peligros que provocan las ETA y los riesgos que dichos peligros representan para los consumidores, junto con la capacidad de adoptar intervenciones adecuadas, debería permitir a los gobiernos y al sector privado reducir significativamente los riesgos relacionados con la alimentación. No obstante, algunas veces ha habido problemas para relacionar los riesgos de los alimentos y las enfermedades de las personas y mucho más para su cuantificación y cuando se han podido determinar, las intervenciones no han sido siempre técnica, económica y administrativamente viables. Por ello, los responsables de la regulación de la inocuidad de los alimentos continúan encontrándose en muchos países con graves problemas (FAO, 2009).

## **2.8. Importancia sanitaria del *Staphylococcus aureus***

La importancia sanitaria y de salud pública del *S. aureus* se confirma por un número elevado de casos y reportes de intoxicaciones de origen alimentario donde el principal agente patógeno fue *S. aureus*, aislado tanto de humanos como de animales (Loh *et al.*, 2009).

*S. aureus* es un patógeno que produce una toxina resistente al calor, el agente habita en menor frecuencia en la nasofaringe y la piel del ser humano. En la mucosa nasal se encuentra de forma natural sin causar enfermedad, en la nasofaringe se asocia con infecciones como: faringitis, sinusitis y tonsilitis; la mayoría de los individuos son portadores por la presencia del agente en la piel de la cara y manos, en donde persiste sin reacción aparente o bien causando lesiones piógenas cutáneas. También se localiza en el ganado vacuno y en los pollos (Fernández, 2008; Koneman, 1999).



El *S. aureus* produce hemolisinas las cuales tienen un efecto citotóxico y leucocida mostrando una actividad pro-inflamatoria. Además pueden dañar células epiteliales, eritrocitos, fibroblastos, monocitos, macrófagos y linfocitos (Grumann *et al.*, 2013).

Las principales fuente de contaminación por *S. aureus* en los alimentos es el humano y los animales. El humano al estar infectado o ser portador lo trasmite a los alimentos durante la elaboración, en el caso de la contaminación por los animales la situación más frecuente es la mastitis crónica o aguda del ganado lechero, la contaminación es a través de las maquinas ordeñadoras o de las manos de los ordeñadores del ganado. Otros factores que contribuyen a la contaminación son el manejo inapropiado y la conservación en condiciones inadecuadas de los alimentos favoreciendo el desarrollo de los microorganismos. El crecimiento de *S. aureus* en alimentos tiene gran importancia por tratarse de un microorganismo capaz de producir toxinas que al ingerirse causa intoxicaciones alimentarias (Fernández, 2008).

En consecuencia la interacción humano – animales, se ha surgido como una fuente de cepas resistentes y multirresistentes a los antibióticos, que incluyen clonas de alta virulencia entre éstas las de mayor importancia, *S. aureus* ORSA/MRSA, que pueden también ser responsables de las intoxicaciones alimentarias (FB-MRSA). Cuando la cepa colonizante es MRSA, el riesgo de infección es superior al observado en portadores de cepas MSSA, sensibles a metilina (Wertheim, *et al.*, 2005). En un estudio realizado en España, cerca del 30 % de pacientes humanos con colonización nasal por MRSA desarrollaron infección en el curso de los meses siguientes a su detección (Huang y Platt, 2003).

En España se indican que la infección por MRSA, se intensifica en los hospitales de tercer nivel. Sin embargo, paulatinamente se ha observado un aumento de MRSA en hospitales de < 500 camas y su frecuencia es creciente en infecciones CA-MRSA, al producirse entre 1993 y 2003, una tasa de aislamiento de MRSA del 7 al 28% (Asensio, *et al.*, 2006).

Sin embargo, Broseta, *et al.*, 2006, mencionan que en España aumentan los casos de MRSA en población pediátrica y en adultos inmigrantes procedentes de Sudamérica (Cercenado, *et al.*, 2008; Manzur, *et. al.*, 2008). Aunque por otra parte Deurenberg, *et al.*, 2007, consideran la prevalencia de MRSA todavía baja en el Continente Europeo.

### **2.8.1. Biología de *Staphylococcus aureus***

*S. aureus* pertenece a la familia *Staphylococcaceae* observados por primera vez Koch y Pasteur. Hacia 1880, Ogston fue quien los denominó con los siguientes términos derivados del griego staphyle = racimo y Kokkos = granos. Es capaz de crecer hasta con un 20 % de sal común. Por esto puede crecer en agua de mar. Es bastante resistente a la desecación, la congelación y al calor (Fuelle, 2005).

*S. aureus* es un microorganismo de gran importancia médica. Desde hace muchos años se le ha reconocido como uno de los principales agentes patógenos para el humano. Forma parte de la familia *Micrococaceae*, género *Staphylococcus*, el cual contiene más de 30 especies diferentes y muchas de éstas son habitantes naturales de la piel y las membranas mucosas del hombre y de los animales. Es un coco Gram-positivo, no móvil, no forma esporas, puede encontrarse solo, en pares, en cadenas cortas o en racimos. Es un anaerobio facultativo, pero crece mejor en condiciones aerobias. Del mismo modo, produce  $\beta$ -hemólisis en medios con sangre, fermenta el manitol, crece bien altas concentraciones de NaCl, es catalasa, DNAsa y coagulasa positivo, lo que permite diferenciarlo del resto de las especies del género *Staphylococcus*. Sus colonias miden de 1 a 3 mm., producen un típico pigmento amarillo debido a la presencia de carotenoides y muchas cepas producen hemólisis a las 24-36 horas (Howe *et al.*, 1996, Velázquez, 2005, Kanafani y Fowler, 2006; y Bustos *et al.*, 2006). El periodo de incubación oscila entre 30 min y 6 horas dependiendo de la cantidad de toxina ingerida y de la susceptibilidad del individuo, los principales signos de la enfermedad son náuseas, vómito, dolor abdominal y diarrea (Fernández, 2008).

Los *Staphylococcus* de acuerdo con la producción de la enzima coagulasa, se dividen en dos grupos: Estafilococos Coagulasa Positivos (ECP) y Estafilococos Coagulasa Negativos (ECN). Existe una correlación positiva entre la producción de coagulasa y la capacidad patógena de la bacteria, por lo tanto se considera que los ECP son patógenos y los ECN no lo son, sin embargo, hay algunas especies de ECN que se han relacionado con procesos patológicos tanto en el hombre como en los animales (Vadillo *et al.*, 2002).

*S. aureus* posee un alto grado de patogenicidad y es responsable de una amplia gama de enfermedades. Produce lesiones superficiales de la piel y abscesos localizados en otros sitios. Causa infecciones del sistema nervioso central e infecciones profundas como osteomielitis y endocarditis. Es causante de infecciones respiratorias como neumonía, infecciones del tracto urinario y es la principal causa de infecciones nosocomiales. Provoca intoxicación alimentaria al liberar sus enterotoxinas en los alimentos y produce el síndrome del shock tóxico al liberar superantígenos en el torrente sanguíneo. Además, causa septicemia, impétigo y fiebres (Foster 2006; Kanafani y Fowler, 2006; Shopsin y Kreiswirth, 2001; Velázquez, 2005). Sin embargo, el papel de los distintos factores de virulencia en el desarrollo de las infecciones por *S. aureus* sigue siendo incompleto. Algunas cepas están desarrolladas para causar enfermedad en todo el mundo, mientras que otras son menos fuertes (Rachel y Franklin, 2008).

### **2.8.2. Mecanismos de patogénesis de *Staphylococcus aureus***

El *S. aureus* causa en el hombre lesiones superficiales del tejido cutáneo y subcutáneo; dentro de éstas se incluyen foliculitis, forúnculos, celulitis, abscesos e impétigo, y también puede causar infecciones invasivas como neumonía, osteomielitis, miocarditis, meningitis y artritis (Stapleton y Taylor, 2002). De igual forma produce varios tipos de toxicosis, como intoxicación alimentaria, necrólisis epidérmica tóxica y síndrome del choque tóxico (Bustos *et al.*, 2006).

Además es un patógeno de mayor importancia en medicina veterinaria, debido a que afecta a diversas especies de animales como al ganado, en aves de corral,

pequeños rumiantes, conejos, cerdos, caballos, entre otras. En estos animales ocasiona diversas alteraciones clínicas entre las que destacan mastitis, artritis, dermatitis exudativa, abscesos subcutáneos, osteomielitis y septicemias (Hermans *et al.*, 2004; Velázquez *et al.*, 2005).

### 2.8.3. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* posee una gran variedad de factores de virulencia (Cuadro 6) que justifica su capacidad patogénica y de invasión al hospedador al afectar sus mecanismos de defensa y de resistencia a los antimicrobianos utilizados en la clínica (Malouin *et al.*, 2005).

**Cuadro 6. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus***

<b>Componentes Estructurales</b>	<b>Función</b>
Peptidoglicano	Presenta actividad endotóxica, activa el complemento e induce la producción de anticuerpos opsonizantes.
Ácidos tecoicos	Medían la unión de los <i>Staphylococcus</i> a las superficies mucosas.
Proteína A	Activa el complemento y bloquea la fracción Fc de las inmunoglobulinas por lo que previene la fagocitosis e inhibe la opsonización.
Polisacáridos capsulares	Facilita la adhesión bacteriana e inhibe la fagocitosis.
<b>Enzimas</b>	<b>Función</b>
Catalasa	Degrada el peróxido de hidrógeno protegiendo al organismo durante la fagocitosis.
Coagulasa	Formación de coágulos, convierte el fibrinógeno en fibrina, facilitando procesos sépticos y la formación de abscesos.
Hialuronidasa	Degrada el ácido hialurónico de la matriz del tejido conjuntivo facilitando la propagación de la infección.

Fuente: Chambers y De Leo, (2009); Gordon y Lowy, (2008); Sibbald *et al.*, (2006).

Entre los diversos factores de virulencia del agente, está la producción de una enzima llamada coagulasa, que es un indicador de patogenicidad de *S. aureus*, por lo tanto en su identificación en el laboratorio la presencia de esta enzima es necesaria para la confirmación de su existencia. Existen dos tipos de coagulasa; la unida a la pared celular de la bacteria que aglutina los eritrocitos, también llamado *cumpling factor* y la libre (*Staphylocoagulasa*) o verdadera coagulasa capaz de

transformar el fibrinógeno en fibrina, originando un coagulo de fibrina que utiliza para evadir el sistema inmune del hospedero (Hurtado *et al.*, 2002).

#### **2.8.4. *Staphylococcus aureus* y sus mecanismos de resistencia a los antibióticos $\beta$ -lactámicos**

Se han descrito, al menos, tres mecanismos de resistencia de *S. aureus* a los  $\beta$ -lactámicos, en muchas ocasiones relacionados entre sí: la hiper producción de  $\beta$ -lactamasas, fenómenos de tolerancia y resistencia por proteínas fijadoras de penicilina (PBP) modificadas o supernumerarias, conocida como resistencia intrínseca a meticilina.

La pared celular del *S. aureus* está constituida por una malla de glicano (polisacárido) y cadenas interconectadas por enlaces cruzados peptídicos conocidos como peptidoglicano. La síntesis del peptidoglicano se lleva a cabo por enzimas unidas a la membrana conocidas como proteínas de unión a la penicilina (penicillin binding proteins, PBPs) (Llarrull *et al.*, 2009). Las PBPs actúan como enzimas catalíticas produciendo una estructura reticulada de peptidoglicano, dando como resultado una pared celular estable (Hiramatsu *et al.*, 2002).

#### **2.9. *Staphylococcus aureus* Oxacilina / Meticilina Resistente**

La meticilina fue introducida en Europa en 1959 y un año después se detectó la primera cepa de *S. aureus* meticilina resistente (“methicillin resistant *S. aureus*”, MRSA) (Bustos *et al.*, 2006). Esta resistencia fue denominada intrínseca, ya que no se debía a la destrucción del antibiótico por la  $\beta$ -lactamasa (Vásquez *et al.*, 2008).

Las penicilinas resistentes a la penicilinas (oxacilina y meticilina), así como las cefalosporinas, poseen una estructura molecular que las protege frente a la acción de la  $\beta$ -lactamasa. Sin embargo, el género *Staphylococcus* ha desarrollado mecanismos más complejos de resistencia frente a este grupo de antimicrobianos.

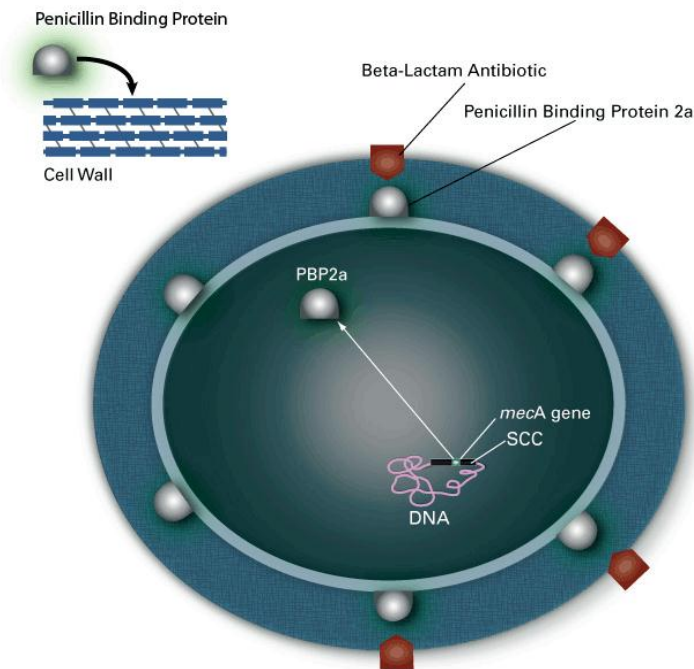
Las cepas resistentes a la meticilina y oxacilina son consideradas como cepas ORSA/MRSA. El mecanismo de resistencia a meticilina de *S. aureus* se asocia en

general a la síntesis de una nueva PBP (PBP2<sup>a</sup> o PBP2') de 78 kDa con baja afinidad por la meticilina y el resto de los β-lactámicos. El determinante genético de esta proteína es de naturaleza cromosómica (gen *mec*). Este gen contiene loci distintos, el *mecA*, que codificaría la PBP2<sup>a</sup>, y el *mecR* o gen regulador. Las cepas ORSA / MRSA con resistencia verdadera o intrínseca a meticilina poseerían los marcadores gen *mecA* y PBP2<sup>a</sup> (Berger-Bachi y Rohre, 2002).

O como lo citan otros autores la resistencia a la meticilina es codificada por el gen *mecA*, lo que resulta en la producción de PBP2<sup>a</sup>, una proteína de unión de penicilina (PBP) que muestra una baja afinidad a los antibióticos β-lactámicos (Chambers, 1997). La PBP2<sup>a</sup> continúa sintetizando el peptidoglicano mientras que las PBPPs habituales son inhibidas por los antibióticos β-lactámicos (Figura 5) (Camarena y Sánchez 2001; Chambers, 1997). La transferencia de esta resistencia es de forma horizontal por medio del casete cromosomal estafilococo *mec* (SCC*mec*) (Katayama *et al.*, 2000).

MRSA se identificaron por primera vez en Inglaterra en 1961 y en los Estados Unidos en 1968 (De Lencastre *et al.*, 1994). Sin embargo, anteriormente, la mayoría de los casos reconocidos de MRSA fueron diagnosticados en los centros de salud, como hospitales, denominados HA-MRSA (MRSA adquirido en Hospitales). En los últimos años, el MRSA se ha diagnosticado con mayor frecuencia en personas que no están en el hospital al momento del diagnóstico, y no ha sido hospitalizado recientemente CA-MRSA (MRSA adquirido en la Comunidad). Además, se han reportado brotes de MRSA más frecuentes en ciertos grupos, como las personas que participan en deportes de equipo, en los niños que asisten a escuelas o guarderías en conjunto, en los reclutas militares, presos de las cárceles o prisiones, y los hombres que tienen sexo con hombres. A veces, las infecciones pueden ser más graves si se producen en ciertas áreas del cuerpo, tales como en la sangre, líquido sinovial, médula ósea y órganos internos llegando a ser potencialmente mortales. Por tal razón algunos países como E.U. a la presencia de MRSA se le considera de notificación obligatoria (Gobierno de Idaho, 2011).

**Figura 5.** Mecanismo de resistencia a la metilina por *S. aureus*. Se observa la participación del gen *mecA* inhibiendo la acción de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.



(Imagen originaria de: <http://depts.washington.edu/hiv aids/derm/case6/discussion.html>).

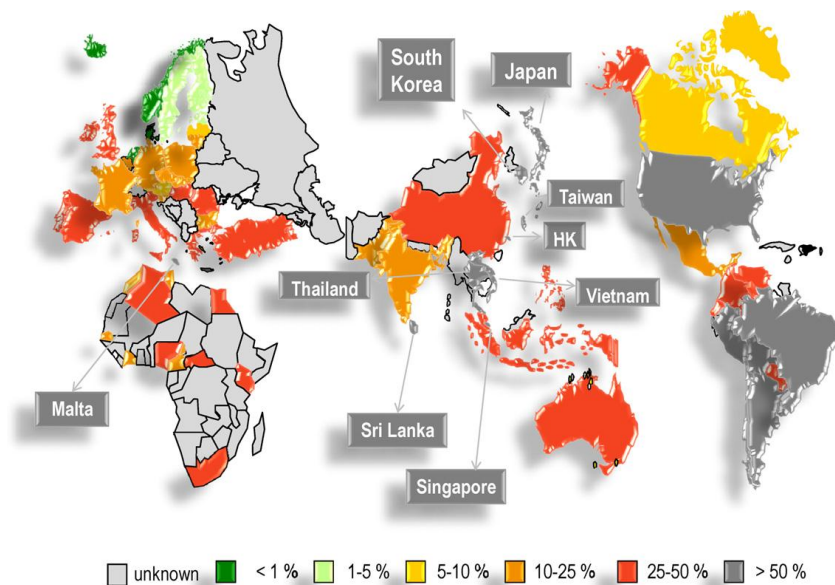
Los aislados de Metilina Resistente a *Staphylococcus aureus* adquiridos en la comunidad (CA-MRSA), poseen el Casete Cromosómico de *Staphylococcus mec* (SCCmec) de tipo IV y con menor frecuencia de tipo V que contienen el gen *mecA* implicado en la resistencia a metilina, pero no los genes que codifican mecanismos de resistencia a otros antibióticos como clindamicina, cotrimoxazol, tetraciclinas o rifampicina, que hasta recientemente eran frecuentes en él Metilina Resistente a *Staphylococcus aureus* adquiridos en hospitales (HA-MRSA) portador del SCCmec de tipo II. La mayoría de cepas de CA-MRSA tienen los genes productores de la leucocidina de Pantón-Valentine (PVL) determinante de la necrosis tisular y la formación de abscesos y causante en gran medida de su mayor virulencia (Vandenesch, *et al.*, 2003).

El MRSA, se transmite fácilmente a partir de infecciones en la piel. Las personas pueden ser "portadoras" asintomáticas del MRSA durante días, semanas o incluso años, facilitando el que puedan contagiar a otros individuos susceptibles (Elana, 2011).

En humanos, *S. aureus* es la mayor causa de morbilidad y mortalidad nosocomial, se ha incrementado por la prevalencia de cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina constituyendo un problema de control en medicina humana, por la asociación con otros factores de virulencia. Detalles patogénicos y estudios epidemiológicos dependen de la disponibilidad de diferentes sistemas de tipificación que diferencien entre cepas que pertenezcan a este tipo de cepas bacterianas (Zadoks, 2002).

La importancia de cepas de adquisición hospitalaria (HA-MRSA), se relaciona con su elevada prevalencia nosocomial en todo el mundo. Aunque los datos epidemiológicos a menudo no son comparables debido a las diferencias en el diseño del estudio y al tamaño de la muestra, las tasas más altas de MRSA (>50%) se registran en el Norte y Sur de América (Figura 6), entre los países que destacan son Estados Unidos, Brasil y Chile. Tasas intermedias (25-50%) son reportadas en México, Venezuela, Túnez, India, China, Australia, África y algunos países de Europa como Portugal (49%), Grecia (40%), Italia (37%) y Rumania (34%). Prevalencias bajas (5-10%) se han observado en los Países Bajos, Canadá y Arabia Saudita (Mejía *et al.*, 2010; Stefani *et al.*, 2012).

**Figura 6.** Prevalencia de HA-MRSA a nivel mundial.



(Tomada de Stefani *et al.*, 2012).



La evolución de las cepas MRSA ha dado origen a clonas pandémicas, identificándose cinco tipos: Ibérica, Pediátrica, Húngara, Nueva York/Japón y Brasileña, provocando un alarma epidemiológica a nivel mundial por su diseminación y su corta acción terapéutica en contra de ellas (Velázquez, 2005).

En los años 90 se describieron en Australia brotes por MRSA en grupos de personas sin los factores clásicos de HA-MRSA, empezándose a reconocer como infecciones de MRSA adquiridas en la comunidad (CA-MRSA), para diferenciarlo de aquellos adquiridos en el hospital (García, 2011).

El Centro de Control de Prevención de Enfermedades de EUA, define que la infección por CA-MRSA ocurre en aquellas personas que no tiene un historial clínico de infección, sin antecedentes de hospitalización o asilo en una casa de reposo en el último año, además de no contar con un historial médico en el último año de: hospitalización, cirugía, diálisis, catéteres permanentes o dispositivos médicos (Millar *et al.*, 2007).

El CA-MRSA se relaciona comúnmente con infecciones de piel y tejidos blandos, estas infecciones suelen manifestarse como celulitis, forúnculos y abscesos; algunos casos pueden ser severos y estar asociados a neumonía necrotizante, empiema, sepsis, bacteriemia, osteomielitis, fascitis necrotizante y púrpura fulminans; en cuyo caso se asocian a altas tasas de morbilidad y mortalidad (Benoit *et al.*, 2008).

Las cepas CA-MRSA y las HA-MRSA difieren no solamente en su cuadro clínico y en su epidemiología, sino que representan en general características fenotípicas y genotípicas distintas (Zhang *et al.*, 2008).

En México el primer reporte descrito de CA-MRSA, fue reportado en un hospital de Nuevo León en el año 2011, otros casos se han reportado en países de Sudamérica, Uruguay, Argentina, Paraguay, Chile, Ecuador, Colombia, Venezuela y Brasil (García 2011; Ma *et al.*, 2005; Velázquez *et al.*, 2011).

En la actualidad se está produciendo un rápido aumento en la prevalencia de CA – MRSA en algunos países, principalmente en EUA a menudo, su número se incrementa sustituyendo a las cepas propiamente hospitalarias, de forma que la barrera entre ambos tipos es cada vez menor. Esto se refleja en que cepas consideradas CA-MRSA es ocasiones están presentando resistencia a antibióticos no  $\beta$ -lactámicos no propias de estos clones (Deresinski, 2005).

Recientemente están surgiendo infecciones en la comunidad producidas por cepas cuyo origen parece estar relacionado con animales de producción (Voss *et al.*, 2005; Wulf *et al.*, 2008).

### **2.9.1. Infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en los animales**

*S. aureus* causa un amplio rango de infecciones oportunistas en animales de compañía, como infecciones superficiales de la piel, infecciones post-operatorias y en ocasiones es el causante de grandes patologías (Cuny *et al.*, 2010; Walther *et al.*, 2008).

El primer reporte de infección de MRSA en animales de compañía fue en gatos (Lilenbaum *et al.*, 1998). Desde entonces se han aislado en numerosos casos y en diferentes países (Pinto *et al.*, 2011). Así mismo, se han detectado MRSA en hospitales de equinos en Japón, EUA, Reino Unido, Australia, Alemania e Irlanda (Leonar y Markey, 2008; Van den Eede *et al.*, 2009). Incluso se han aislado cepas de MRSA en animales exóticos como en tortuga, loro y murciélago (Walther *et al.*, 2008).

Algunos estudios han demostrado que la mayoría de las cepas de MRSA obtenidas de animales de compañía, muestran características similares a las aisladas en el los humanos (Strommenger *et al.*, 2006). Por lo tanto no se descarta el posible origen humano de estas cepas, siendo el hombre el que probablemente disemine estos clones en hospitales, en la comunidad y a los propios animales (Walther *et al.*, 2008; Weese *et al.*, 2005).

Por el contrario, los animales portadores constituyen un reservorio de cepas de MRSA, pudiendo transferir dichos microorganismos al ser humano, aumentando así la capacidad de diseminación y consecuentemente de infección (Cuny *et al.*, 2010; Voss *et al.*, 2005).

Dada la importancia de *S. aureus* como agente causal de mastitis bovina y el uso generalizado de los antibióticos intramamarios en esta especie, no es sorprendente que los primeros aislamientos de MRSA asociados a los animales de producción (LA-MRSA) fueron en vacas lecheras (Lee, 2003). El MRSA se ha aislado también en otros animales de producción como cerdos (Voss *et al.*, 2005) y en menor medida en pollos (Lee, 2003), ovejas y conejos (Leonard y Markey, 2008).

La detección de MRSA en los animales desempeña un papel importante en la epidemiología ya que éstos representan un reservorio natural y el contacto con animales portadores implica un riesgo para la salud humana (Lee, 2003; Voss *et al.*, 2005; Weese *et al.*, 2005).

En un estudio longitudinal, se demostró que la prevalencia de MRSA disminuye rápidamente durante la ausencia del contacto con los animales, durante vacaciones y entre los ciclos de producción (Graveland *et al.*, 2011b), observándose que la higiene de la granja y el uso adecuado de los antibióticos se asocia a una baja prevalencia de MRSA en los animales (Graveland *et al.*, 2011a).

Actualmente se han descubierto en Dinamarca, Francia, Canadá y en los Países Bajos, que la cepa MRSA CC398 (complejo clonal) de origen animal se encuentra en la población humana (Lewis *et al.*, 2008).

La infección por *S. aureus* en el hombre y en el ganado presenta un desafío epidemiológico mundial para los problemas de salud humana y animal. El incremento de la prevalencia de MRSA implica un serio problema terapéutico en el ambiente hospitalario, comunitario y asociado al ganado (Brody *et al.*, 2008; Gil, 2000).

En años recientes se han identificado cepas MRSA en alimentos frescos y procesados (FB-MRSA), implicando un riesgo mayor para la salud pública por la fácil diseminación de estas cepas a la población humana (Velázquez *et al.*, 2011).

### **2.10. Biotipificación de *Staphylococcus aureus***

Al encontrarse *S. aureus* presente en la flora normal de piel y las membranas mucosas de los mamíferos y aves, puede diseminarse en diferentes hospederos y sobrevivir por largos períodos de tiempo; donde pueden desarrollar enfermedades, su alta frecuencia justificó el desarrollo de métodos para subdividir las especies en variedades y subespecies. La caracterización fenotípica mediante la biotipificación del *S. aureus* se ha empleado para estimar el origen presuntivo de este microorganismo en la industria alimentaria y en investigaciones epidemiológicas de brotes por intoxicación alimentaria (Hennekinne *et al.*, 2003). Se puede realizar por medio de crecimiento en agar cristal violeta, esta prueba bioquímica es utilizada por primera vez por Chapman en 1934, en su investigación descubre que este medio es el mejor para aislar *Staphylococcus*, utilizó diferentes concentraciones desde 1:1,000,000 hasta 1:50,000 llegando a la conclusión que la óptima es de 1:100,000 en el cual las colonias adquieren diferente color, lo que permite definir los biotipos A (de origen humano), C (de origen bovino) y E (de origen canino) (Meyer, 1967).

Después se utilizaron otras pruebas bioquímicas para dividir los organismos en biotipos, como son coagulación de plasma humano, bovino y de conejo, actividad fibrinolítica, producción de alfa, beta y delta hemólisis, pigmentación de las UFC y características del crecimiento en agar cristal violeta (Dimitracopoulos, *et al.*, 1977).

*S. aureus* de origen humano (A) se asocia con la coagulación del plasma humano, producción de estafilocinasa, crecimiento en agar cristal violeta de color violeta, hemólisis alfa-beta, susceptibilidad a los fagotipos de los grupos diferentes al grupo IV. La producción de fibrinolisisina determina las cepas de origen humano, esto no ocurre en ningún biotipo animal, las cepas de origen bovino (C) coagulan

plasma humano y bovino, muestran un pigmento amarillo-crema, colonias amarillas en agar cristal violeta, no producen estafilocinasa, tienen actividad hemolítica beta o beta delta y son susceptibles a los fagocitos del grupo IV. Los aislamientos de *S. aureus* de origen canino (E) forman un grupo de cepas no pigmentadas, provenientes de perros, caballos, palomas, visones. Estos difieren por sus características aberrantes y no ser lisadas por los fagos de los grupos del I al IV, coagulan el plasma bovino, muestran pigmento de color blanco y colonias blancas en agar cristal violeta, carecen de producción de estafilocinasa y no son típicables con los grupos básicos de fagos (Cohen, 1977; Cohen, 1982).

Las especies animales son portadores de cepas de *S. aureus*, pero estas difieren en cada especie animal, a consecuencia de que la misma bacteria causa diferentes condiciones patológicas en diferentes hospederos animales por la diferencia en sus características genéticas. Las cepas de *S. aureus* que se aíslan de varias especies animales difieren una de otra. Algunos investigadores proponen diferentes pruebas para diferenciar las cepas humanas de las de otras especies animales (Devriese, 1984).

Es una herramienta que se utiliza para estimar el origen de este organismo en varios productos alimenticios, principalmente por el gran aumento de brotes por intoxicación alimentaria en humanos alrededor del mundo (Lamprell, 2004).

## **2.11. Formación de biofilms bacterianos**

Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo. El crecimiento en biofilms representa la forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza. La capacidad de formación de biofilm no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos y se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas todos los microorganismos son capaces de formar biofilms (Costerton, *et al.*, 1995).

Si una superficie permanece húmeda durante un tiempo suficiente, se formará biofilm en ella, tanto si es una piedra en un estanque, el casco de un barco, una

lente de contacto o las superficies donde se manipulan alimentos. En la primera fase de formación, las células bacterianas se adhieren a la superficie en un proceso que puede ser activo o pasivo, en función de si las células son móviles o no y de factores ambientales. Una vez que se adhieren las células a la superficie, es muy difícil eliminarlas sin una acción mecánica o el uso de productos químicos.

Los biofilms se desarrollan más rápido cuando disponen de una fuente continua de nutrientes. En general, se adhieren a superficies como el acero inoxidable, el aluminio o el vidrio y también pueden encontrarse en superficies de contacto con alimentos, como juntas, correas transportadoras y grietas. Tras la unión, las bacterias del biofilm empiezan a agruparse y a crecer para crear microcolonias (Chavarrías, 2013).

La formación de biofilm mejora la resistencia bacteriana, la cual puede estar asociada en algunos casos con meticilina resistente a *Staphylococcus aureus*, complicando los tratamientos de las enfermedades infecciosas (Zhou *et al.*, 2015)

### **2.11.1 Biofilms y Resistencia a los Antibióticos**

La característica que mejor distingue las infecciones crónicas relacionadas con biofilms de las infecciones agudas es su respuesta a tratamientos antibióticos. Mientras que las infecciones agudas pueden ser eliminadas tras un breve tratamiento antibiótico, las infecciones por biofilms normalmente no consiguen ser completamente eliminadas, producen episodios recurrentes y la mayoría de las veces deben resolverse sustituyendo el implante. Esto se debe a que las bacterias del biofilm pueden ser hasta 1.000 veces más resistentes a los antibióticos que esas mismas bacterias crecidas en medio líquido (Donlan y Costerton, 2002; Mah y O'Toole, 2001; Stewart y Costerton, 2001).

La explicación para la baja eficacia de los antibióticos contra las bacterias en biofilm es la incapacidad del antibiótico para penetrar la matriz exopolisacáridica. El biofilm protege a las bacterias de la acción opsonizante de los anticuerpos, el ataque de las células fagocíticas y el tratamiento antimicrobiano (Lasa *et al.*, 2005).

Dado que existen pocos estudios que determinen la importancia de la contaminación de las canales de conejos por *S. aureus* y la caracterización de los aislamientos ORSA/MRSA para determinar la presencia de cepas MRSA, se hace necesario evaluar el nivel de contaminación de este microorganismo patógeno en las canales de conejo de rastros comerciales, así también su caracterización de los aislamientos para identificar las cepas MRSA.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El Estado de México es un importante productor de conejos (*Oryctolagus cuniculus*) a nivel nacional, además de ser el principal consumidor de carne para abasto, la cual es consumida en los centros gastronómicos de Texcoco, Amecameca, La Marquesa, Valle de Bravo y Atlacomulco principalmente. El abasto de la producción de carne de conejo va en incremento en los diferentes sectores de la población, obligando con esto, una producción higiénica de las canales para asegurar la inocuidad alimentaria y la prevención de ETA en la población humana.

En la actualidad existen diferentes riesgos de contaminación para los productos cárnicos, desconociéndose ampliamente el origen de los microorganismos patógenos que le causan daño al hombre. Dentro de ellos se encuentra el *S. aureus*, que es un patógeno muy versátil presente en el ser humano y en los animales como huésped natural, capaz de causar una amplia gama de enfermedades. Su presencia en alimentos tiene gran importancia por tratarse de un microorganismo capaz de producir enterotoxinas que al ingerirse causan intoxicación alimentarias, razón por la cual se considera una de las principales ETA. Así mismo, por la ocurrencia de que existan cepas de *S. aureus* meticilina resistente (MRSA) de origen animal consideradas de alto riesgo a la salud pública por la posibilidad de que sean diseminadas a partir de los animales de compañía, de producción y los mismos alimentos de origen animal. En México no existen estudios en los cuales se ha determinado el nivel de contaminación de canales de conejo asociadas a *S. aureus* y a la identificación de cepas MRSA.



#### **4. HIPÓTESIS**

La contaminación por *Staphylococcus aureus* en canales de conejos (*Oryctolagus cuniculus*) es igual o mayor a 17.2 % de cepas meticilina resistente en rastros cunícolas del Estado México.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo General

Determinar los niveles de contaminación microbiana por *Staphylococcus aureus* y la caracterización del antibiotipo ORSA/MRSA en canales de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) procedentes del Estado México.

### 5.2. Objetivos Específicos

Determinar la contaminación de la superficie de las canales de conejos en tres rastros cunícolas comerciales del Estado de México.

Determinar la frecuencia de los fenotipos de *S. aureus* asociados a la contaminación de la canal relacionados con el biotipo, la producción de biofilm y el antibiotipo ORSA/MRSA.

Determinar la presencia del gen *mecA* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Establecer la asociación de la contaminación de *S. aureus* meticilina resistente y los riesgos sanitarios en el proceso de obtención de las canales de conejos determinando los puntos críticos de control en los rastros estudiados.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. MATERIALES**

#### **Biológico**

217 aislamientos de *Staphylococcus aureus* obtenidos de superficie de canales de conejos en tres de rastros cunícolas del Estado de México.

#### **Cepas de referencia**

Cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Cepa *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (ATCC 43300).

Cepa *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228).

#### **Material de Muestreo**

Bolsas con refrigerante.

Hielera.

Plantillas Estériles (2.5 cm por 2.5 cm, 5.0 cm por 5.0 cm y 10.0 cm por 10.0 cm)

Etiquetas auto-adheribles.

Hojas de registro.

Gradilla metálica.

Marcador.

Guantes de látex.

Toallas desechables.

Tubos de ensaye de 20 x 125 mm con tapón de rosca.

Tubos Falcón de 10 ml.

Hisopos estériles.

## **Material de Laboratorio**

### **Medios de cultivo**

Agar Baird Parker (Bioxon).

Agar Base de Gelosa Sangre (Bioxon).

Agar Vogel Johnson (Bioxon).

Agar Sal y Manitol (Bioxon).

Agar Triple Azucar y Hierro TSI (Bioxon).

Caldo Muller Hinton (Bioxon).

Agua Peptonada (Difco)

Agar Muller Hinton (Bioxon).

Caldo Infusión Cerebro Corazón (Bioxon).

Cloruro de Sodio (Baker).

Telurito de Potasio (Sigma Chemical).

### **Cristalería**

Cajas de petri de vidrio de 15 x 100 mm.

Matraces Erlenmeyer de 250 y 500 mL.

Portaobjetos de 26 x 62 mm.

Probetas graduadas 1, 3,5 y 10 mL.

Tubos de ensaye con tapón de rosca de 13 x 100 mm.

## **Equipo**

Asa bacteriológica de nicromel de 10 mL.

Autoclave.

Balanza analítica (Ohaus).

Balanza granatária 2.610 g (Ohaus).

Baño María de 0 a 100 °C.

Termómetro de mercurio.

Centrífuga.

Cronómetro.

Estufa bacteriológica (Riossa).

Mecheros Bunsen de alta temperatura.

Microscopio óptico (Carl - Zeiss).

Micropipetas de 0.5- 10.0, 5.0 – 50, 20.0 – 200, 200 – 1000.ml.

Refrigerador (Nieto).

Vortex (Thermolyne / Maxi mix II).

Termociclador para PCR convencional.

Termociclador para PCR tiempo real.

## **Reactivos y sustancias**

Aceite mineral.

Agua destilada.

Clorhidrato de oxacilina (Sigma, Chemical)

Tren de tinción de Gram.

Unidiscos de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 µg), oxacilina (1 µg) y cefoxitina (30 µg) (BBL- Becton Dickinson; Loveton Circle Sparks, USA).

Azul de Tripan.

Rojo Congo.

Sucrosa.

## 6.2. MÉTODOS

Se realizó un estudio trasversal, mediante un muestreo por conveniencia durante los meses de abril a octubre del año 2014 en tres rastros comerciales del Estado de México para determinar el nivel de contaminación de la superficie de las canales de conejo por *S. aureus* y su caracterización fenotípica relacionada con el biotipo, biofilm y las cepas MRSA.

### 6.2.1. Estudio preliminar

Para establecer el método de muestreo de superficie en la canal de conejo se realizó un estudio piloto dividido en dos fases:

#### **FASE I. Identificación de un método de muestreo no destructivo para determinar la contaminación bacteriana en canales de conejos**

Se tomó como base, la técnica empleada para el análisis microbiológico de las superficies de las canales en especies de abasto de talla mayor y mediana muestreando cuatro regiones de la canal (muslo, lomo, costillar y cuello) en las cuales se establecen muestreos de las regiones con plantillas de 5 cm por 5 cm y 10 cm por 10 cm (USDA, 1996; Commission Decision, 2001; SENASICA, 2010b), para el estudio se propuso el muestreo de superficies en las canales de conejos de una plantilla de 2.5 cm por 2.5 cm con un área total de 25 cm<sup>2</sup> de las regiones similares en las tallas de los animales mencionados.

Esta investigación se realizó con 15 conejos de la raza Nueva Zelanda y California, edad promedio 75 días y peso promedio 3 Kg obtenidos de un establecimiento habilitado para el sacrificio de conejos, ubicado en la comunidad de Santa Cruz Atizapán, Toluca, Estado de México (19° 27' 9" de latitud norte y de 99° 46' 58" de longitud oeste).

Esta técnica de muestreo se efectuó en tres grupos de conejos considerados como grupo 1, 2 y 3, cada uno constituido por 5 conejos, delimitando la zona de muestreo diferente para cada conejo y cada grupo; en el primer grupo se delimito una superficie de 2.5 cm por 2.5 cm, considerando cuatro regiones a muestrear

para los primeros cuatro conejos, una región por conejo, señaladas como: Región 1 (R1) para el muslo, Región 2 (R2) para el lomo, Región 3 (R3) para el costillar y Región 4 (R4) para el cuello, al conejo número cinco del grupo uno, se realizó el muestreo de las cuatro regiones para un solo análisis (R1+R2+R3+R4); el mismo procedimiento se realizó para los dos grupos restantes, delimitando en el grupo dos por una región de 5 cm por 5 cm y en el grupo tres por una región de 10 cm por 10 cm. Después de señalar el área a muestrear en la canal del conejo para cada grupo individualmente con la plantilla de 2.5 cm, 5 cm y 10 cm previamente esterilizada, se realizó hisopado en las distintas regiones de la canal con un hisopo estéril humedecido en un tubo con 10 mL de solución de agua peptonada al 2 %, depositando el hisopo al tubo con la misma solución y resguardándolo a 4° C. como lo indica la NOM-109-SSA1-1994 hasta analizar las muestras en laboratorio.

Las muestras se analizaron para identificar la presencia de *S. aureus* siguiendo lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994 (Determinación de *S. aureus* en alimentos), realizando seis diluciones ( $1 \times 10^{-1}$  a  $1 \times 10^{-6}$ ) (NOM-110-SSA1-1994), inoculando 0.1 mL en el medio agar Baird Parker, distribuyendo en todo el medio con varilla estéril de vidrio ángulo recto e incubando a 37° C por 48 horas con el fin de contabilizar las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) presentes en las canales de conejo. Así mismo, se realizó un conteo de unidades formadoras de colonias por centímetro cuadrado (UFC/cm<sup>2</sup>) con el estimador  $N_s = (N * F / A) * D$ , de acuerdo al protocolo establecido para estimar la carga microbiana en la superficie (MAP-SOIC, 2004), en donde:

$N_s$  = las UFC presentes por centímetro cuadrado.

$N$  = al número de UFC en 1 mL de líquido de dilución.

$F$  = la cantidad en mililitros diluyente en el tubo de dilución.

$A$  = a la superficie en cm<sup>2</sup> muestreada.

$D$  = al recíproco de la dilución usada por el factor.



## **FASE II. Instrumentar el método no destructivo para el muestreo de superficie en canales de conejos**

Se evaluaron las regiones de muestreo (R1) para el muslo, (R2) para el lomo, (R3) para el costillar y (R4) para el cuello, las cuales se compararon con el muestreo de las cuatro regiones (R1+R2+R3+R4) en una muestra compuesta.

Para corroborar el procedimiento propuesto en la primer fase del estudio piloto se consideraron muestrear 45 canales de conejos de forma aleatoria en la línea de sacrificio para efectuar la estimación de la contaminación de superficie en las diferentes regiones de las canales de conejo obtenidas de un rastro comercial registrado, localizado en el municipio de Huixquilucan, Estado de México (19°18'07" y 19°26'27" de latitud norte; 99°14'10" y 99°24'15" de longitud oeste), la técnica de muestreo utilizada se efectuó en tres grupos considerados como grupo 1A, 2A y 3A, cada grupo constituido por 15 conejos, delimitando una zona de muestreo diferente cada grupo; en el primer grupo se demarco una superficie de 2.5 cm por 2.5 cm, considerando cuatro zonas a muestrear tanto individualmente como en un solo muestreo por conejo. El mismo procedimiento se realizó para los dos grupos restantes, delimitando al grupo 2A, una superficie de 5 cm por 5 cm y en el grupo 3A, una área de 10 cm por 10 cm, mediante el método aprobado y descrito por USDA, 1996; Commission Decision, 2001 y SENASICA 2010b. Se realizó hisopado en las distintas regiones de la canal con un hisopo estéril humedecido en un tubo con 10 mL de solución de agua peptonada al 2 %, posteriormente se regresó el hisopo al tubo con la misma solución y se resguardo a 4° C. como lo indica la NOM-109-SSA1-1994 hasta analizar las muestras en laboratorio.

Las muestras se analizaron para identificar la presencia de *S. aureus* siguiendo lo establecido en la NOM-115-SSA1-1994, realizando seis diluciones ( $1 \times 10^{-1}$  a  $1 \times 10^{-6}$ ) (NOM-110-SSA1-1994), inoculando 0.1 mL en el medio agar Baird Parker, distribuyendo en todo el medio con varilla estéril de vidrio ángulo recto e incubando a 37° C por 48 horas con el fin de contabilizar las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) presentes en las canales de conejo. Así mismo, se

realizó un conteo de unidades formadoras de colonias por centímetro cuadrado (UFC/cm<sup>2</sup>) con el estimador  $N_s = (N \cdot F/A) \cdot D$  (MAP-SOIC, 2004), a partir de la dilución  $1 \times 10^{-3}$ .

### 6.2.2. Evaluación de la contaminación microbiológica de las canales de conejos

Para estimar el nivel de contaminación por *S. aureus* en las superficies de las canales de conejos en rastros, se evaluaron 217 canales obtenidas de la línea de sacrificio en tres rastros comerciales del Estado de México (Figura 7).

La identificación de los rastros se consideró de la siguiente forma:

**Rastro A:** establecimiento localizado en el municipio de Huixquilucan.

**Rastro B:** establecimiento localizado en el municipio de San Felipe del Progreso.

**Rastro C:** establecimiento localizado en el municipio de Tecámac.

**Figura 7.** Ubicación de los municipios donde se encuentran los tres rastros cunícolas cooperantes. (A) Huixquilucan, (B) San Felipe del Progreso y (C) Tecámac.



(Tomada de <http://www.travelbymexico.com/estados/estadodemexico>, 2015).

### 6.2.3. Selección de rastros comerciales

La selección de los rastros comerciales para el estudio se efectuó con base a su registro vigente ante la Secretaría de Salud (SSA) y su volumen de sacrificio anual; el rastro A procesa 19,200 conejos anuales y el rastro B 31,200 conejos respectivamente; el rastro C se consideró por su certificación como rastro Tipo Inspección Federal otorgada por la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) a través del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) y su volumen de sacrificio anual de 42,000 conejos. Además de su distribución comercial en el abasto de canales de conejo en el Estado de México.

#### Rastro A, Huixquilucan

El rastro comercial registrado en el municipio de Huixquilucan se localiza en la parte centro del Estado de México en la vertiente oriental del monte de Las Cruces. En las coordenadas 19°18'07" y 19°26'27" de latitud norte; 99°14'10" y 99°24'15" de longitud oeste, a una altura variable que va de los 2,501 a los 3,500 msnm (msnm: metros sobre el nivel del mar) (Figura 8).

**Figura 8.** Localización topografía del municipio de Huixquilucan.



(Tomada de INAFED, 2015a).

## Rastro B, San Felipe del Progreso

El rastro comercial registrado en el municipio de San Felipe del Progreso, se localiza al nor-noroeste del Estado de México. Entre los 19°43' de latitud norte, 99°57' de longitud oeste (Figura 9).

**Figura 9.** Localización topografía del municipio de San Felipe del Progreso.

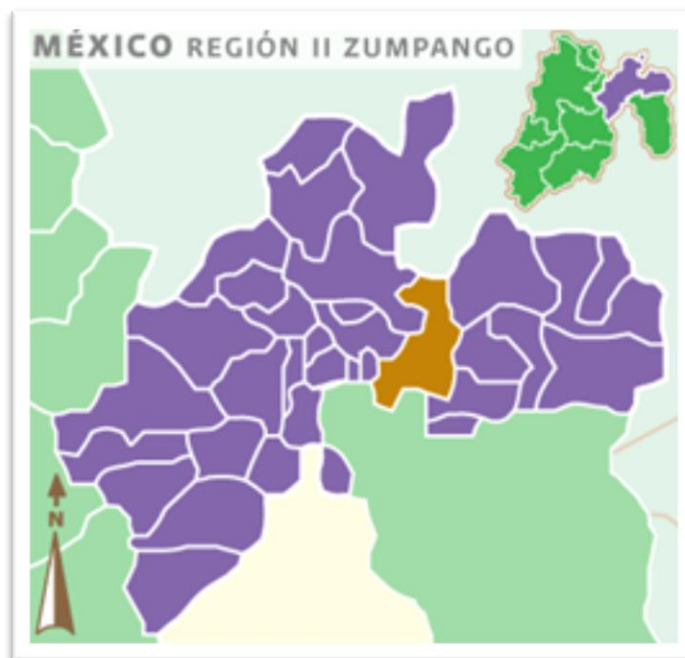


(Tomada de INAFED, 2015b).

## Rastro C, Tecámac

El rastro comercial localizado en el municipio de Tecámac se encuentra en la parte nororiente de la capital del estado de México y al norte del Distrito Federal, en la región conocida como el Valle de México. Sus coordenadas son 19°43' latitud norte y 98°58' de longitud oeste, a una altura de 2,340 sobre el nivel del mar (Figura 10).

**Figura 10.** Localización topografía del municipio de Tecámac.



(Tomada de INAFED, 2015c.)

#### **6.2.4. Determinación del tamaño de muestra**

Para determinar el tamaño de muestra se consideró la fórmula recomendada por Jaramillo y Martínez, 2010, con una prevalencia de 17.2 % basada en (Ortega *et al.*, 2009) y un nivel de confianza del 95 % como se marca en la siguiente fórmula:

$$n = \frac{Z^2 pq}{d^2}$$

Donde:

$Z^2 = 1.96^2$  (Nivel de confianza de 95%)

p = proporción esperada (en este caso 17 % = 0.17)

q = 1-p (en este caso 1 – 0.17 = 0.83)

$d^2 =$  margen de error  $(0.05)^2$

$$n = 216.8909 \text{ (217)}$$

Una vez que se determinó el tamaño total de la muestra (217) se ponderaron en los 3 rastros de forma proporcional al número de sacrificio estimado anual con datos proporcionados por los mismos establecimientos (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Tamaño y proporción de la muestra.

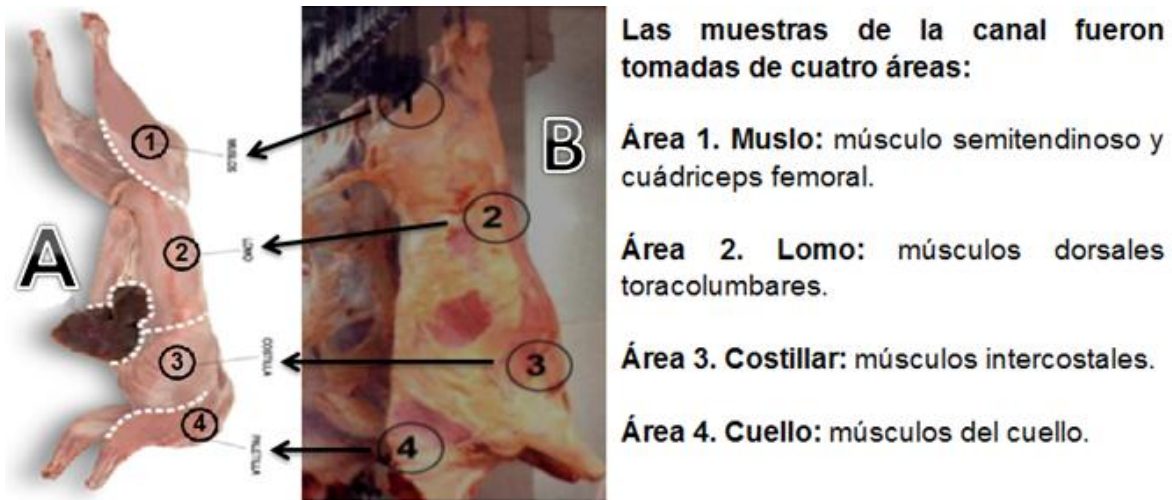
Rastro	Sacrificio Anual	No de la muestra	% de la muestra
A	19,200	45	21 %
B	31,200	74	34 %
C	42,000	98	45 %
Total	92,400	217	100 %

### 6.2.5. Recolección de las muestras

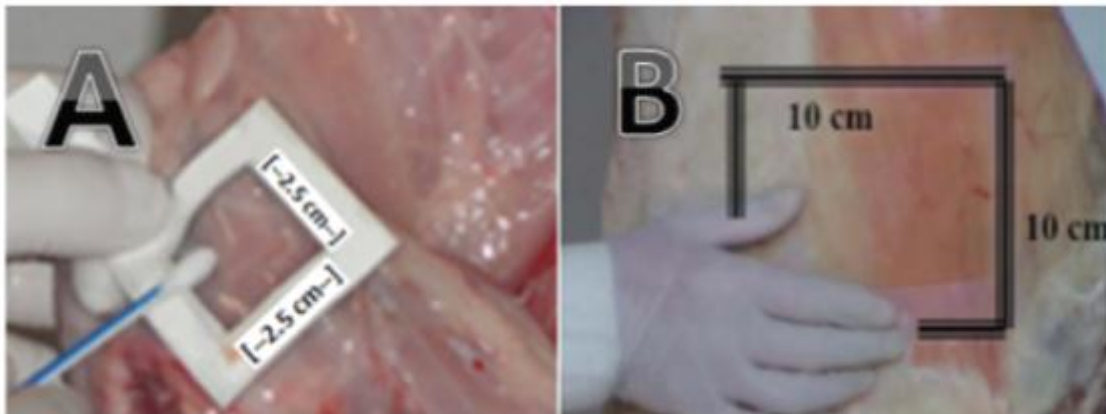
Las canales analizadas fueron seleccionadas mediante un muestreo aleatorio simple, después del eviscerado y antes del lavado. Para la toma de muestras en cada rastro, se utilizó equipo de protección personal como es; overol, botas, cofia y cubre boca, posteriormente se procedió a lavar y desinfectar las manos y botas, se secaron las manos usando toallas desechables de papel, posteriormente fueron colocados guantes estériles.

Las muestras fueron tomadas de cuatro regiones de la canal considerando el muslo, lomo, costillar y cuello (Figura 11) en una sola toma, bajo condiciones asépticas mediante el método no destructivo y antes de ser sometidas a refrigeración (4° C), según lo establecido por la USDA, 1996; Commission Decision, 2001; SENASICA 2010b, para especies de abasto de talla mayor. Modificando la plantilla de muestreo utilizada en la superficie del área de la canal a 2.5 cm x 2.5 cm y sustituyendo la esponja por hisopo estéril (Figura 12).

**Figura 11.** Áreas muestreadas en la canal de conejo. A) Canales de abasto de talla menor (canal de conejo). B) Canales de abasto de talla mayor (canal de bovino).



**Figura 12.** Colocación de la plantilla en la canal. A) Se ejemplifica la delimitación de un área en canal de conejo. B) Se ejemplifica la delimitación de un área en canal de bovino.

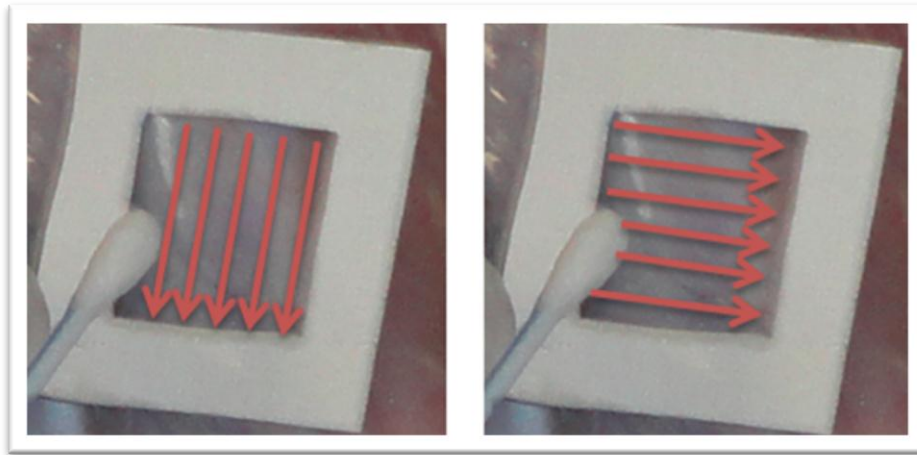


Al momento del muestreo se humedeció cada hisopo estéril con agua peptonada al 2% y se procedió a frotar las superficies en las cuatro áreas delimitadas por la plantilla; primero se frotó diez veces verticalmente (arriba hacia abajo) y después diez veces horizontalmente (derecha a izquierda) (Figura 13). Posteriormente cada hisopo fue colocado en tubos Falcón con 10 mL. de agua peptonada al 2%,



previamente identificados. Las muestras se refrigeraron a 4°C hasta el momento de su estudio en el laboratorio (Nom-109-SSA1-1994).

**Figura 13.** Ejemplo de frotación de la canal; vertical (izquierda) y Horizontal (derecha).



Al finalizar el muestreo en cada rastro, las muestras fueron transportadas inmediatamente al Centro de Investigación de Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) en el Área de Inocuidad Alimentaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México.

#### **6.2.6. Conteo microbiológico de unidades formadoras de colonias en placa y por cm<sup>2</sup>**

Para el conteo de las unidades formadoras de colonias en placa se utilizó la técnica descrita en la norma oficial NOM-115-SSA1-1994.

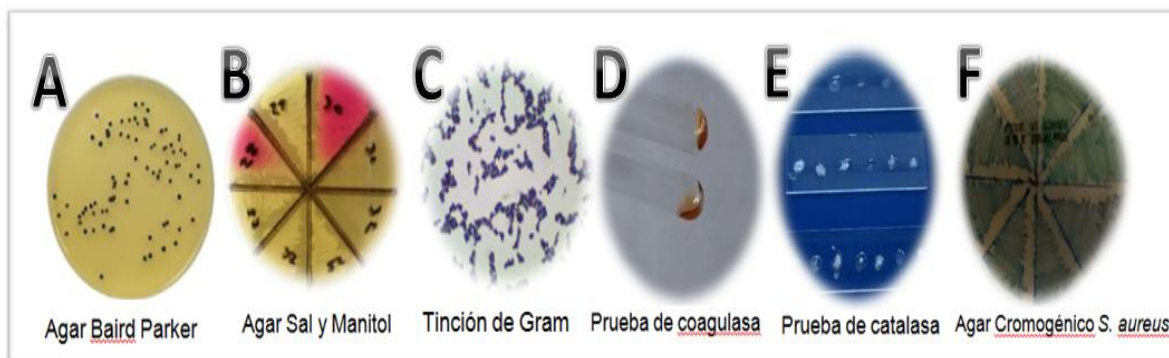
La estimación de las unidades formadoras de colonia por centímetro cuadrado (UFC/cm<sup>2</sup>) presentes en las canales de conejo, se determinó a partir de las UFC en placa de la dilución  $1 \times 10^{-3}$ , considerando cuatro regiones a muestrear (muslo, lomo, costillar y cuello) en un total de 25 cm<sup>2</sup>, calculadas a través del estimador  $N_s = (N \cdot F / A) \cdot D$ , en donde N= al número de UFC en 1 mL. de líquido de dilución; F= es la cantidad en mililitros diluyente en tubo; A= es la superficie en cm<sup>2</sup> muestreada y D= al recíproco de la dilución usada (MAP-SOIC, 2004).



### 6.2.7. Aislamiento bacteriológico de *Staphylococcus aureus*

El aislamiento de *S. aureus* se efectuó directamente en placas de BD Agar Baird Parker, medio de cultivo selectivo y diferencial para este agente patógeno como lo indica la NOM-115-SSA1-1994. A cada tubo Falcón que contenía las muestras de las canales se les realizaron seis diluciones decuples seriadas (Nom-110-SSA1-1994), inoculando 0.1 mL. en cada una de las diluciones ( $1 \times 10^{-1}$  a la  $1 \times 10^{-6}$ ) sobre el agar, distribuyendo uniformemente con varilla estéril de vidrio en ángulo recto, incubándose a  $37^{\circ} \text{C}$  por 48 horas. La estimación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *S. aureus* se realizó a partir de las que presentaron una coloración negra (telurito positivo) y un halo amarillo (lecitinasasa positiva) (Baird-Parker, 1962). Posteriormente se inocularon en BD Agar Sal y Manitol; incubándose a  $37^{\circ} \text{C}$  por 48 horas, las colonias confirmadas de *S. aureus* mostraron color amarillo debido a la fermentación del manitol (Bautista-Trujillo *et al.*, 2013). Finalmente se identificaron con tinción de Gram, prueba de catalasa, coagulasa, oxidasa, (Wichelhaus *et al.*, 1999) y crecimiento en agar CRHOMagar<sup>®</sup> STAPH AUREUS, medio cromogénico específico confirmatorio para *S. aureus* (Figura 14).

**Figura 14.** Identificación bacteriológica de *S. aureus* por métodos microbiológicos y bioquímicos. Imágenes propias del estudio. A) Muestra el crecimiento positivo visualizando colonias negras, convexas, oscuras, brillantes y con un ligero halo alrededor de las colonias. B) Las colonias positivas fermentan el manitol y viran a amarillo, las colonias negativas mantienen el color rojo del medio. C) Se observan las colonias características de *S. aureus* a través del resultado visual de un microscopio óptico. D) Se visualiza prueba positiva en tubo superior y negativa para el tubo inferior. E) La formación de espuma muestra una reacción positiva al peróxido de hidrógeno al 3%. F) El crecimiento de colonias verdes brillantes es la característica positiva en agar cromogénico.



Se emplearon las cepas de *S. aureus* ATCC 25923 como control positivo y *S. epidermidis* ATCC 12228 como testigo negativo del análisis bacteriológico.

Se seleccionaron las colonias típicas de *S. aureus* y se incubaron 37° C por 24 h. en infusión cerebro corazón (BHI), posteriormente se les agrego glicerol 50% volumen / volumen para ser preservadas a -80° C.

#### **6.2.8. Resistencia Antimicrobiana**

Para la detección de aislamientos ORSA/MRSA se realizó la prueba de tamizado de Oxacilina (1µg), en la cual se hizo una suspensión directa de colonias en caldo Mueller-Hinton, con una concentración bacteriana a una densidad de 0,5 McFarland (1.5 X 10<sup>8</sup> UFC/ml.) (Anexo A). Cada cultivo se inoculó por duplicado en placas de agar Mueller-Hinton adicionadas con 4% de NaCl, empleando unidiscos de Oxacilina (1µg) e incubando por 24 horas a 35° C (Peterson *et al.*, 1993). Se emplearon las cepas ATCC 43300 como control positivo y la ATCC 25953 como testigo sensible del análisis bacteriológico.

Para esta prueba se consideraron como ORSA/MRSA aquellos aislamientos que resistieron esta concentración, para identificar posteriormente las cepas MRSA.

Para la detección del fenotipo de *S. aureus* resistente a la meticilina, se emplearon los unidiscos de Oxacilina (1µg), Cefoxitina (30µg) y Amoxicilina/Ácido Clavulánico (20/10µg) para caracterizar la resistencia a la meticilina (CLSI, 2012).

El inóculo se preparó empleando el método de suspensión directa de colonias en caldo Mueller-Hinton, se comparó la turbidez del crecimiento bacteriano establecida por el método de McFarland 0.5. Para inocular el agar Mueller-Hinton se utilizó un hisopo estéril de algodón, el cual se humedeció con la suspensión y se distribuyó uniformemente en toda la superficie del medio, se dejaron secar por 5 minutos y posteriormente se depositaron los discos correspondientes (CLSI, 2012).

El diámetro de las zonas de inhibición se determinaron después de 24 horas de incubación a 35° C y fueron comparadas con los valores establecidos por (CLSI,

2012) para determinar el fenotipo de resistencia, intermedio y sensibilidad a los antibióticos para el género *Staphylococcus spp.* Como controles de la prueba se utilizaron las cepas de *S. aureus* ATCC 25923 (sensible) y ATCC 43300 (resistente).

#### **6.2.9. Identificación de biotipos de *Staphylococcus aureus***

Para estimar la presencia del Biotipo de *S. aureus* de las canales de conejo se efectuaron los procedimientos bacteriológicos estandarizados por (Devriese *et al.*, 1981), al inocular placas de agar cristal violeta (agar tripticasa soya adicionado con cristal violeta 1:100,000), incubadas a 37° C durante 24 h. Los biotipos se identificaron por las características de crecimiento (Cuadro 8) y la reacción positiva al cristal violeta (CV) de las UFC; la prueba de coagulasa en tubo con plasma bovino y humano (tubos de 12 mm con 0,3 ml diluido 1 en 3), producción de staphylokinasa y la hemolisina en agar sangre preparado con eritrocitos de ovino y conejo (Devriese, 1984). Los biotipos se interpretaron a partir de las UFC y las reacciones de las pruebas, considerándose como biotipo A (humano), al cuagular el plasma humano y mostrar una reacción positiva al CV formando UFC color violeta y ligero halo amarillento en la placa, staphylokinasa positiva y  $\alpha$ -hemolisis (Hájek y Marsalek, 1971); biotipo C (bovino/ovino), al coagular plasma humano y bovino, reacción negativa al CV formando UFC color crema y ligero halo amarillento en placa, staphylokinasa negativa y  $\beta$ -hemolisis (Devriese, 1990 y Manjarrez *et al.*, 2012); biotipo identificado como E (canino/equino), coagulo plasma bovino, reacción negativa al CV formando UFC de color blanco y ligero halo amarillento en placa, staphylokinasa negativa y  $\beta$ -hemolisis hemolisis (Hájek y Marsalek, 1971 y Shimizu *et al.*, 1986). El biotipo no específico (NE) presento diferentes variantes coagulando plasma humano y/o bovino, UFC con reacción negativa al CV, staphylokinasa negativa así como  $\alpha$ -hemolisis y/o  $\beta$ -hemolisis (Devriese y Hommez, 1975 y Devriese *et al.*, 1981).

**Cuadro 8.** Biotipos de *S. aureus*.

Características	A	B	C	D	E	F	G
Staphylokinasa	+	-	-	-	-	-	+
Pigmentación	+	+	+	v-	-	-	+
Coagulación en plasma humano	+	+	+	+	v-	+	+
Coagulación en plasma bovino	-	-	+	-	+	+	+
Alpha hemolisis	+	v	v	-	-	v-	v+
Beta hemolisis	v-	v+	+	+	+	+	v
Crecimiento en agar cristal violeta	+	v+	v	-	+	+	v
Origen presuntivo	Humano	Aves de corral. Cerdos.	Vacas. Ovejas.	Liebres.	Perros. Caballos.	Palomas. Zorros.	Ratones. Ratas.

(+) = reacción positiva; (-) = reacción negativa; (v) = variable o con predominancia + ó -.

Fuente: Devriese y Hommez, 1975; Devriese *et al.*, 1981; Devriese, 1984; Devriese, 1990; Hájek y Marsalek, 1971; Manjarrez *et al.*, 2012; Shimizu *et al.*, 1986.

## 6.2.10. Identificación de biofilm

### 6.2.10.1. Método de Agar Rojo Congo

El medio se compone de infusión de cerebro corazón caldo (BHI) 37 g/L., sucrosa 50 g/L., agar bacteriológico (AB) 10 g/L. y rojo Congo (RC) 0 8 g/L. El agar se prepara como una solución acuosa concentrada y en autoclave (121° C durante 15 minutos) el rojo Congo se preparó por separado de los otros constituyentes del medio y después se añadió cuando el agar se había enfriado a 55° C. Las placas se inocularon con las cepas de *S. aureus* previamente identificadas y se incubaron aeróbicamente 37° C durante 24 horas. Un resultado positivo se indicó mediante colonias de color negro con una consistencia cristalina seco. Los productores negativos generalmente tienen un crecimiento rosa. Un resultado intermedio se indica por un oscurecimiento de las colonias, pero con la ausencia de una morfología colonial cristalino seco (Freeman *et al.*, 1989). Como apoyo para identificación positiva de biofilm se utilizó la cepa (SA 113) ATCC 35556.

### **6.2.10.2. Identificación de biofilm con el método de Christensen**

Este método se realizó en tubos Falcón de polipropileno de 15 ml. a los cuales se les administro 2 ml. de caldo soya tripticasa (TSB) esterilizado en autoclave (121° C durante 15 minutos) posteriormente se inocularon con colonias previamente identificadas de *S. aureus* y se incubaron 37° C por 48 horas, después el contenido de cada tubo se decantó y añadió un volumen de 1 mL de una solución acuosa al 0.4 % de azul de tripano (Sigma Chemical Co, St Louis, Missouri). Acto seguido, a cada tubo se hizo girar suavemente para asegurar la tinción uniforme sobre la superficie interior y finalmente los contenidos se decantaron suavemente. Los tubos se colocaron boca abajo para drenar. Un resultado positivo se indicó por la presencia de una capa adherente de material pintado en la superficie interna del tubo. Presencia en la interface líquido-aire por sí sola no se considerada como indicativo de producción de biofilm (Christensen *et al.*, 1982). Como apoyo para identificación positiva de biofilm se utilizó la cepa (SA 113) ATCC 35556.

### **6.2.11. Reacción en Cadena de la Polimerasa punto final y tiempo real**

#### **6.2.11.1 Extracción de ADN para PCR punto final**

Los aislamientos de *S. aureus* obtenidos de los rastros cunícolas del Estado de México se cultivaron en tubos con caldo infusión cerebro corazón (BHI); el total del crecimiento bacteriano se traspasó a viales para ser centrifugados a 12000 rpm (revoluciones por minuto) por 1.5 minutos. Posteriormente se decantó el sobrenadante y se re suspendió con 1 mL de solución buffer fosfato (PBS) y se incubó a 37° C durante 10 minutos, centrifugándose nuevamente a 12000 rpm. Así mismo, se añadió 50 µl de 0.5% M-KOH para lisar las células bacterianas y se incubó durante 5 minutos más, seguido de neutralización con 50µl, de 1 M-Tris-HCl (pH 6-7). Por último se centrifugo ligeramente para quitar el condensado y se conservó en congelación a -20° C, hasta su utilización para PCR (Kobayashi *et al.*, 1994).

### 6.2.11.2. Extracción de ADN para PCR tiempo real

La extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) se realizó mediante el kit comercial Insta Gene™ Matrix (Bio-Rad). Catálogo 732-6030. (Anexo B)

### 6.2.11.3. Cuantificación del ADN

La concentración y pureza del ADN extraído se cuantificó mediante el espectrofotómetro y programa informático de cuantificación NANO-DROP. La pureza del ADN se obtiene por la relación entre la absorbancia de 260nm y 280nm. La preparación pura del ADN presenta un cociente entre 1.8 y 2.0.

### 6.2.11.4. Amplificación del gen *mecA* por PCR punto final

El total de los aislamientos de *S. aureus* fueron probados para la detección de los productos de amplificación del gen *mecA* relacionados con las cepas MRSA, empleando los iniciadores descritos por Kobayashi *et al.*, 1994, los cuales se aprecian en el Cuadro 9. Como control positivo se utilizó la cepa *S. aureus* ATCC 43300 y como control negativo la cepa de *S. aureus* ATCC 25923.

**Cuadro 9.** Secuencias de los iniciadores para el gen *mecA*

Gen	Secuencia de nucleótidos (5'~3')	Tamaño del fragmento (pb)	Referencia
<i>mecA</i>	Sentido: AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	533	Kobayashi <i>et al.</i> , (1994)
	Anti sentido: AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC		

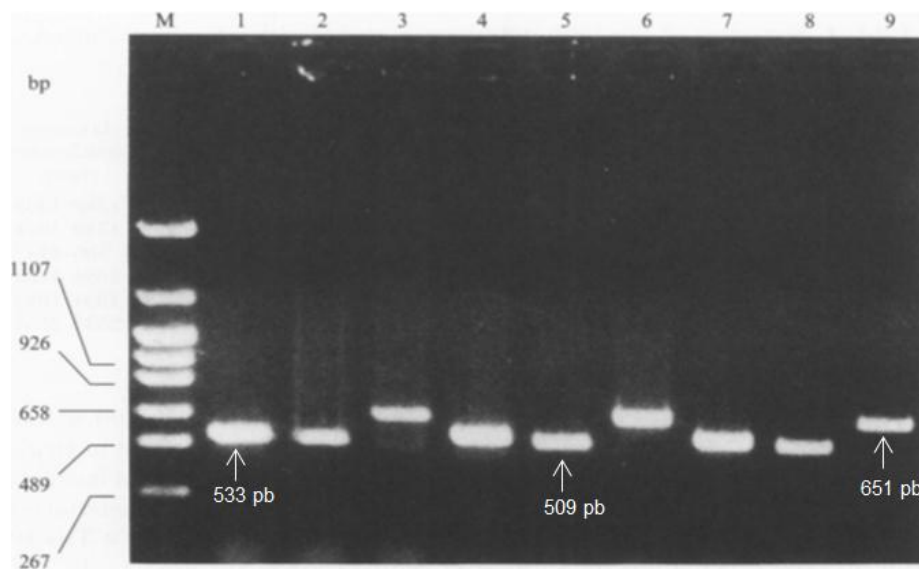
Las condiciones de amplificación empleadas fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 5min; desnaturalización 94°C por 1min; alineación a 57°C por 1min; extensión a 72°C por 2min y extensión final a 72°C por 7 min, por 30 ciclos.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 25µL. La mezcla de reacción consistió en 100ng de ADN, 200 µM de cada dNTPs (dATP, dCTP,

dGTP, y dTTP), 10µM de los iniciadores, 1U de GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, EUA), 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> y Buffer 10X.

Del producto final de la PCR se tomaron 5 µl de cada reacción y se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1.5% por 45 minutos a 100 V., con 1.5 µl de buffer de carga (TBE 1X). Los productos de la PCR fueron aclarados con bromuro de etidio y se visualizaron los amplicones de 533 pb mediante un transiluminador de UV como se observa en la Figura 15 según lo recomendado por Kobayashi *et al.*, 1994.

**Figura 15.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación de la PCR. De los genes *mecA*, *femA* y *femB* asociados a *S. aureus* meticilina resistente. M = marcador de peso molecular; Carril 1, 4 y 7 gen *mecA*; Carril 2,5 y 8 gen *femA*; Carril 3,6 y 9 gen *femB*.



(Kobayashi *et al.*, 1994).

#### 6.2.11.5. Amplificación del gen *mecA* por PCR tiempo real

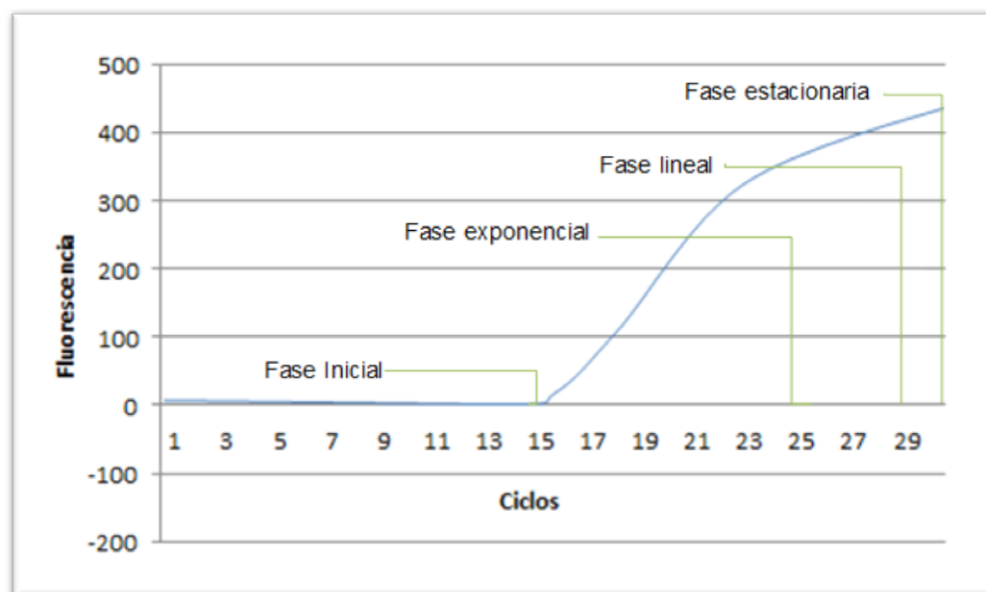
Los aislamientos de *S. aureus* se analizaron mediante la cuantificación relativa de los productos de amplificación del gen *mecA* mediante la PRC en tiempo real, utilizando los iniciadores descritos por Kobayashi *et al.*, 1994, al emplear la secuencia de nucleótidos (5'~3') en Sentido: AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC y Anti sentido: AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC. Las condiciones de amplificación del ADN genómico de la bacteria de realizaron con un volumen final de 25 µL, del

cual se utilizaron: 5  $\mu\text{L}$  de ADN, 1  $\mu\text{L}$  de cada nucleótido, 12.5  $\mu\text{L}$  de Taq PCR Master Mix Kit (QIAGEN Quality, Iberia S.L, Madrid, Spain). Catálogo 201443, Lote 133198112) y 5.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ .

El programa de la PCR tiempo real se ajustó a una temperatura de desnaturalización inicial a  $94^\circ\text{C}$  por 5min; desnaturalización  $94^\circ\text{C}$  por 1min; alineación a  $57^\circ\text{C}$  por 1min; extensión a  $72^\circ\text{C}$  por 2min y extensión final a  $72^\circ\text{C}$  por 7 min, por 30 ciclos (Kobayashi *et al.*, 1994). Como control positivo se utilizó la cepa *S. aureus* ATCC 43300 y como control negativo la cepas *S. aureus* ATCC 25923.

Los productos de amplificación se visualizaron a partir de los reporteros fluorescentes, que al ser oxidados generan la cronometría emitida y capturada en la tapa de exención de los ciclos, proporcional a las copias de ADN de doble cadena apreciadas en la curva de amplificación; en el eje "Y" la fluorescencia emitida y en el eje "X" los ciclos de reacción para establecer el umbral de las curvas visualizadas en la cinética de amplificación de la PCR en su fase inicial, exponencial, lineal y estacionaria (Figura 16). La fase exponencial es en la cual se producen proporcionalmente el mayor número de copias de ADN, lo cual ocurre entre los ciclos 15 a 25 (Aguilera *et al.*, 2014).

**Figura 16.** Representación gráfica de las fases de amplificación de la PCR en tiempo real.





### **6.2.12. Determinación de puntos críticos de control en rastros**

Para la evaluación de riesgos, se realizó un diagrama de flujo de las actividades en rastro mediante el modelo HACCP, tomando en cuenta las BPM y los POES y posteriormente una descripción de cada una de dichas actividades; así se logró determinar los peligros asociados a cada etapa. Una vez finalizada esta etapa, se procedió a la realización del cuestionario de diagnóstico de riesgos para rastros (Anexo C) utilizado por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), basado en el sistema HACCP. En este estudio solo se evaluó hasta el Principio 2. Determinar los Puntos Críticos de Control (PCC). Aplicando la secuencia de decisiones en cada fase para determinar los puntos críticos de control.

### **6.2.13. Evaluación de Resultados**

Los resultados fueron evaluados con el programa estadístico IBM-SPSS Statistics 20 (Copyright IBM Corporation 1989, 2011), en donde se realizó la prueba de Análisis de Varianza de un factor y prueba de Tukey con una significancia de  $P < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Estudio Preliminar

#### 7.1.1. FASE I. Identificación de un método de muestreo no destructivo para determinar la contaminación bacteriana en canales de conejos

Los resultados obtenidos del análisis independiente de cada región de las canales de conejos muestran valores semejantes a los resultados de la canal donde se muestrearon las cuatro regiones en un mismo análisis utilizando una plantilla de 2.5 cm por 2.5 cm (6.25 cm<sup>2</sup>). Como se observa en el Cuadro 10 la sumatoria de las regiones individuales presentaron resultados totales de 103 UFC en placa y 412,000 UFC/cm<sup>2</sup>, comparados con los resultados de las cuatro regiones en un mismo análisis que fueron de 101 UFC en placa y 404,000 ambos en la en la dilución 1x10<sup>-3</sup>, se puede apreciar que solo existe un variación de 2 UFC en placa y 8,000 UFC/cm<sup>2</sup>. Así mismo, se observa que existe diferente contaminación de *S. aureus* en cada una de las regiones analizadas, siendo mayor para la región del costillar y la región del cuello.

**Cuadro 10. Resultados del estudio piloto con plantilla de 2.5 cm por 2.5 cm.**

DATOS	SD	1X10 <sup>-1</sup>	1X10 <sup>-2</sup>		1X10 <sup>-3</sup>		1X10 <sup>-4</sup>		1X10 <sup>-5</sup>	1X10 <sup>-6</sup>
	UFC en placa	UFC en placa	UFC en placa	UFC por cm <sup>2</sup>	UFC en placa	UFC por cm <sup>2</sup>	UFC en placa	UFC por cm <sup>2</sup>	UFC en placa	UFC en placa
<b>C1-R1</b>	I	I	51	81600	5	80000	2	320000	0	0
<b>C2-R2</b>	I	I	56	89600	17	272000	4	640000	0	0
<b>C3-R3</b>	I	I	175	280000	45	720000	3	480000	0	0
<b>C4-R4</b>	I	I	148	236800	36	576000	6	780000	0	0
<b>SUMA</b>	I	I	<b>430</b>	<b>172000</b>	<b>103</b>	<b>412000</b>	<b>15</b>	<b>600000</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>MEDIA</b>	I	I	107.5	43000	25.75	103000	3.75	150000	0	0
<b>DESVEST</b>	I	I	63.35	—	18.09	—	1.70	—	0	0
<b>C5 (R1+R2+R3+R4)</b>	I	I	<b>423</b>	<b>169200</b>	<b>101</b>	<b>404000</b>	<b>13</b>	<b>520000</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

Donde C= Conejo; R= Región; SD= Siembre Directa I= Incontables; DESVEST= Desviación Estándar.

Los resultados utilizando la plantilla de 5.0 cm por 5.0 cm mostraron contaminación similar entre el promedio individual de los aislamientos de *S. aureus* y la muestra de las cuatro regiones en un mismo análisis. En el Cuadro 11 se observa que la sumatoria de las regiones individuales aisló 157 UFC en placa en comparación con las 167 UFC en placa que se obtuvo del muestro las cuatro regiones en un mismo análisis. Así mismo, se observa que presento mayor contaminación en las regiones del costillar y del cuello.

**Cuadro 11. Resultados del estudio piloto con plantilla de 5.0 cm por 5.0 cm.**

DATOS	SD	1X10 <sup>-1</sup>	1X10 <sup>-2</sup>		1X10 <sup>-3</sup>		1X10 <sup>-4</sup>		1X10 <sup>-5</sup>	1X10 <sup>-6</sup>
	UFC en placa	UFC en placa	UFC en placa	UFC por cm <sup>2</sup>	UFC en placa	UFC por cm <sup>2</sup>	UFC en placa	UFC por cm <sup>2</sup>	UFC en placa	UFC en placa
<b>C1-R1</b>	I	I	83	33200	17	68000	2	80000	0	0
<b>C2-R2</b>	I	I	53	21200	26	104000	1	40000	0	0
<b>C3-R3</b>	I	I	173	69200	55	220000	4	160000	0	0
<b>C4-R4</b>	I	I	181	72400	59	236000	3	120000	0	0
<b>SUMA</b>	I	I	<b>490</b>	<b>49000</b>	<b>157</b>	<b>157000</b>	<b>10</b>	<b>100000</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>MEDIA</b>	I	I	122.5	12550	39.25	39250	2.5	25000	0	0
<b>DESVEST</b>	I	I	64.19	—	20.88	—	1.29	—	0	0
<b>C5 (R1+R2+R3+R4)</b>	I	I	<b>503</b>	<b>50300</b>	<b>167</b>	<b>167000</b>	<b>9</b>	<b>90000</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

Donde C= Conejo; R= Región; SD= Siembra Directa I= Incontables; DESVEST= Desviación Estándar.

Con respecto a la plantilla utilizada de 10.0 cm por 10.0 cm los resultados de contaminación bacteriana fueron igualmente similar entre los aislados por región individual en comparación con el aislamiento que compendio las cuatro regiones de la canal del conejo observándose una mayor contaminación en la región del costillar (Cuadro 12).

Todos los aislamientos presentaron colonias incontables en la dilución 1X10<sup>-1</sup>, así como, en la siembra sin dilución. Para el caso de las diluciones 1x10<sup>-5</sup> y 1X10<sup>-6</sup> no existió crecimiento bacteriano.

**Cuadro 12. Resultados del estudio piloto con plantilla de 10.0 cm por 10.0 cm.**

DATOS	SD	1X10 <sup>-1</sup>	1X10 <sup>-2</sup>		1X10 <sup>-3</sup>		1X10 <sup>-4</sup>		1X10 <sup>-5</sup>	1X10 <sup>-6</sup>
	UFC en placa	UFC en placa	UFC en placa	UFC por cm <sup>2</sup>	UFC en placa	UFC por cm <sup>2</sup>	UFC en placa	UFC por cm <sup>2</sup>	UFC en placa	UFC en placa
<b>C1-R1</b>	I	I	33	3300	4	4000	2	20000	0	0
<b>C2-R2</b>	I	I	170	17000	41	41000	3	30000	0	0
<b>C3-R3</b>	I	I	202	20200	56	56000	7	70000	0	0
<b>C4-R4</b>	I	I	105	10500	11	11000	7	70000	0	0
<b>SUMA</b>	I	I	<b>510</b>	<b>12750</b>	<b>112</b>	<b>28000</b>	<b>19</b>	<b>47500</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>MEDIA</b>	I	I	127.5	3187.5	28	7000	4.75	11875	0	0
<b>DESVEST</b>	I	I	74.81		24.61		2.69		0	0
<b>C5 (R1+R2+ R3+R4)</b>	I	I	<b>550</b>	<b>13750</b>	<b>119</b>	<b>29750</b>	<b>16</b>	<b>40000</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

Donde C= Conejo; R= Región; SD= Siembre Directa I= Incontables; DESVEST= Desviación Estándar.

### 7.1.2. FASE II. Instrumentar el método no destructivo para el muestreo de superficie en canales de conejos

El nivel de contaminación por *S. aureus* que se observa en los resultados presentados en el Cuadro 13, 14 y 15 muestra una diferencia máxima de 50.03 UFC en placa, considerando la media de análisis de las cuatro regiones con respecto al uso de las diferentes plantillas.

Las UFC/cm<sup>2</sup> fueron decreciendo con respecto a cada plantilla utilizada, considerando los resultados de la media del análisis de las cuatro regiones, en el caso de la plantilla de 2.5 cm por 2.5 cm resultaron 154,106.67 UFC/cm<sup>2</sup> para la plantilla de 5.0 cm por 5.0 cm fueron 43,533 UFC/cm<sup>2</sup> y para el caso de la de 10.0 cm por 10.0 cm presentaron 10,356.7 UFC/cm<sup>2</sup>.

**Cuadro 13. Nivel de contaminación de *Staphylococcus aureus* considerando una superficie de muestreo de 2.5 cm por 2.5 cm en una dilución  $1 \times 10^{-3}$ .**

No de Canal	(R1) MUSLO		(R2) LOMO		(R3) COSTILLAR		(R4) PALETILLA		(R1+R2+R3+R4)	
	UFC/P	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/P	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/P	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/P	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/P	UFC/cm <sup>2</sup>
1	43	68800	95	152000	136	217600	151	241600	415	166000
2	53	84800	103	164800	146	233600	169	270400	455	182000
3	33	52800	93	148800	128	204800	132	211200	390	156000
4	29	46400	89	142400	141	225600	136	217600	370	148000
5	65	104000	78	124800	159	254400	155	248000	433	173200
6	45	72000	25	40000	145	232000	156	249600	419	167600
7	15	24000	29	46400	40	64000	41	65600	117	46800
8	32	51200	84	134400	189	302400	199	318400	493	197200
9	27	43200	62	99200	119	190400	133	212800	315	126000
10	52	83200	115	184000	167	267200	189	302400	513	205200
11	45	72000	62	99200	172	275200	176	281600	477	190800
12	28	44800	59	94400	112	179200	145	232000	310	124000
13	33	52800	85	136000	177	283200	183	292800	487	194800
14	8	12800	17	27200	19	30400	25	40000	65	26000
15	97	155200	109	174400	189	302400	184	294400	520	208000
Media	40.333	64533.33	73.67	117866.67	135.93	217493.33	144.93	231893.33	<b>385.27</b>	154106.67

**Cuadro 14. Nivel de contaminación de *Staphylococcus aureus* considerando una superficie de muestreo de 5.0 cm por 5.0 cm en una dilución  $1 \times 10^{-3}$ .**

No de Canal	MUSLO		LOMO		COSTILLAR		PALETILLA		(R1+R2+R3+R4)	
	UFC/P	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/P	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/P	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/P	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/P	UFC/cm <sup>2</sup>
1	89	35600	41	16400	137	54800	127	50800	401	40100
2	51	20400	52	20800	104	41600	95	38000	370	37000
3	51	20400	92	36800	178	71200	163	65200	526	52600
4	39	15600	91	36400	146	58400	98	39200	452	45200
5	48	19200	51	20400	141	56400	136	54400	425	42500
6	57	22800	96	38400	153	61200	148	59200	486	48600
7	49	19600	89	35600	178	71200	188	75200	522	52200
8	42	16800	41	16400	71	28400	79	31600	315	31500
9	56	22400	39	15600	113	45200	126	50400	412	41200
10	47	18800	77	30800	158	63200	192	76800	518	51800
11	53	21200	47	18800	96	38400	119	47600	315	31500
12	51	20400	69	27600	185	74000	97	38800	456	45600
13	59	23600	39	15600	88	35200	129	51600	358	35800
14	58	23200	57	22800	135	54000	175	70000	456	45600
15	45	18000	76	30400	175	70000	197	78800	518	51800
Media	53	21200	63.8	25520	137.2	54880	137.9	55173.33	<b>435.3</b>	43533

**Cuadro 15. Nivel de contaminación de *Staphylococcus aureus* considerando una superficie de muestreo de 10.0 cm por 10.0 cm en una dilución 1X10<sup>-3</sup>.**

No de Canal	MUSLO		LOMO		COSTILLAR		PALETILLA		(R1+R2+R3+R4)	
	UFC/P	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/P	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/P	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/P	UFC/cm <sup>2</sup>	UFC/P	UFC/cm <sup>2</sup>
1	33	3300	170	17000	202	20200	105	10500	473	11825
2	26	2600	160	16000	185	18500	59	5900	395	9875
3	15	1500	61	6100	178	17800	89	8900	379	9475
4	21	2100	68	6800	165	16500	69	6900	311	7775
5	19	1900	110	11000	158	15800	115	11500	426	10650
6	17	1700	58	5800	204	20400	152	15200	436	10900
7	17	1700	83	8300	129	12900	113	11300	394	9850
8	29	2900	159	15900	215	21500	113	11300	502	12550
9	15	1500	91	9100	96	9600	94	9400	316	7900
10	28	2800	159	15900	201	20100	75	7500	458	11450
11	23	2300	117	11700	157	15700	84	8400	349	8725
12	38	3800	95	9500	176	17600	145	14500	478	11950
13	29	2900	185	18500	209	20900	95	9500	528	13200
14	14	1400	56	5600	189	18900	77	7700	356	8900
15	25	2500	97	9700	164	16400	111	11100	413	10325
Media	23.267	2326.7	111.3	11126.7	175.2	17520	99.73	9973.33	<b>414.3</b>	10356.7

El resultado del análisis, con base a la utilización de las diferentes plantillas no mostro diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en el promedio de las unidades formadoras de colonia en placa que fue de 98.71 UFC a 102.37 UFC (Cuadro 16), asimismo, las superficies de mayor contaminación presentada en la canal de conejo fueron la región del costillar y la del cuello.

**Cuadro 16. Nivel de contaminación por *Staphylococcus aureus* en las diferentes zonas de muestreo considerando el área en cm<sup>2</sup>.**

Plantilla utilizada	Parámetros de medición	Zona Muestra				Promedio
		Muslo	Lomo	Costillar	Cuello	
Grupo uno 2.5 cm por 2.5 cm (6.5 cm <sup>2</sup> )	Promedio UFC/Placa	40.33	73.67	135.93	144.93	98.71
Grupo dos 5.0 cm por 5.0 cm (25 cm <sup>2</sup> )	Promedio UFC/Placa	53	63.8	137.2	137.9	97.97
Grupo tres 10 cm por 10 cm (100 cm <sup>2</sup> )	Promedio UFC/Placa	23.26	111.3	175.2	99.73	102.37

( $P < 0.05$ ).

## 7.2. Evaluación de la contaminación microbiológica de las canales de conejos

### 7.2.1. Conteo microbiológico de UFC en placa

De las 45 muestras realizadas en el rastro A se obtuvo un límite máximo de 520 UFC en placa y un límite mínimo de 65 UFC en placa, correspondientes a las cuatro regiones de la canal analizadas (Cuadro 17).

**Cuadro 17. Conteo bacteriológico de las UFC en placa del Rastro A.**

No de muestra	UFC en placa	No de muestra	UFC en placa	No de muestra	UFC en placa
1	415	16	393	31	315
2	455	17	270	32	287
3	390	18	509	33	314
4	370	19	377	34	298
5	433	20	390	35	316
6	419	21	463	36	412
7	117	22	<b>520</b>	37	259
8	493	23	212	38	357
9	315	24	319	39	269
10	513	25	509	40	354
11	477	26	289	41	278
12	310	27	399	42	367
13	487	28	287	43	405
14	<b>65</b>	29	413	44	358
15	<b>520</b>	30	503	45	391

Los resultados mostrados son con base a la dilución decimal  $1 \times 10^{-5}$ .

De las 74 muestras realizadas en el rastro B se obtuvo un límite máximo de 562 UFC en placa y un límite mínimo de 309 UFC en placa, correspondientes a las cuatro regiones de la canal analizadas (Cuadro 18).

**Cuadro 18. Conteo bacteriológico de las UFC en placa del Rastro B.**

No de muestra	UFC en placa	No de muestra	UFC en placa	No de muestra	UFC en placa
1	357	26	450	51	349
2	365	27	313	52	380
3	422	28	417	53	532
4	512	29	369	54	356
5	389	30	415	55	372
6	<b>562</b>	31	313	56	421
7	345	32	415	57	358
8	417	33	362	58	475
9	502	34	368	59	496
10	363	35	340	60	437
11	415	36	445	61	362
12	487	37	517	62	400
13	356	38	485	63	423
14	412	39	378	64	398
15	326	40	<b>309</b>	65	390
16	847	41	393	66	376
17	368	42	387	67	514
18	456	43	523	68	374
19	507	44	455	69	436
20	389	45	468	70	452
21	487	46	361	71	445
22	351	47	178	72	326
23	512	48	531	73	487
24	406	49	412	74	367
25	408	50	316		
Los resultados mostrados son con base a la dilución decimal $1 \times 10^{-3}$ .					

De las 98 muestras realizadas en el rastro C se obtuvo un límite máximo de 517 UFC en placa y un límite mínimo de 100 UFC en placa, correspondientes a las cuatro regiones de la canal analizadas (Cuadro 19).



**Cuadro 19. Conteo bacteriológico de las UFC en placa del Rastro C.**

No de muestra	UFC en placa	No de muestra	UFC en placa	No de muestra	UFC en placa	No de muestra	UFC en placa
1	280	26	290	51	234	76	502
2	320	27	345	52	403	77	470
3	289	28	321	53	267	78	493
4	199	29	290	54	378	79	392
5	323	30	245	55	377	80	113
6	412	31	343	56	333	81	<b>517</b>
7	320	32	278	57	234	82	160
8	378	33	217	58	289	83	493
9	276	34	321	59	239	84	439
10	289	35	345	60	367	85	433
11	217	36	412	61	493	86	<b>100</b>
12	321	37	389	62	197	87	413
13	230	38	365	63	170	88	373
14	206	39	342	64	320	89	293
15	217	40	321	65	362	90	114
16	421	41	356	66	327	91	460
17	326	42	278	67	410	92	405
18	376	43	401	68	450	93	505
19	289	44	265	69	375	94	403
20	356	45	341	70	280	95	470
21	234	46	345	71	287	96	350
22	256	47	289	72	410	97	500
23	250	48	291	73	275	98	401
24	280	49	234	74	465		
25	267	50	390	75	510		

Los resultados mostrados son con base a la dilución decimal  $1 \times 10^{-3}$ .

### 7.2.2. Conteo microbiológico de UFC/cm<sup>2</sup>

De las 45 muestras realizadas en el rastro A se obtuvo un límite máximo de 2,080,000 UFC/cm<sup>2</sup> y un límite mínimo de 260,000 UFC/cm<sup>2</sup>, correspondientes a las cuatro regiones de la canal analizadas (Cuadro 20).

**Cuadro 20. Conteo bacteriológico de las UFC/cm<sup>2</sup> del Rastro A.**

No de muestra	UFC/cm <sup>2</sup>	No de muestra	UFC/cm <sup>2</sup>	No de muestra	UFC/cm <sup>2</sup>
1	1,660,000	16	1,572,000	31	1,260,000
2	1,820,000	17	1,080,000	32	1,148,000
3	1,560,000	18	2,036,000	33	1,256,000
4	1,480,000	19	1,508,000	34	2,500,000
5	1,732,000	20	1,560,000	35	1,264,000
6	1,676,000	21	1,852,000	36	1,648,000
7	468,000	22	<b>2,080,000</b>	37	1,036,000
8	1,972,000	23	848,000	38	1,428,000
9	1,260,000	24	1,276,000	39	1,076,000
10	2,052,000	25	2,036,000	40	1,416,000
11	1,908,000	26	1,156,000	41	1,112,000
12	1,240,000	27	1,596,000	42	1,468,000
13	1,948,000	28	1,148,000	43	1,620,000
14	<b>260,000</b>	29	1,652,000	44	1,432,000
15	<b>2,080,000</b>	30	2,012,000	45	1,564,000
Los resultados mostrados son con base a la dilución decimal 1X10 <sup>-3</sup> .					

De las 74 muestras realizadas en el rastro B se obtuvo un límite máximo de 2,248,000 UFC/cm<sup>2</sup> y un límite mínimo de 1,236,000 UFC/cm<sup>2</sup>, correspondientes a las cuatro regiones de la canal analizadas (Cuadro 21).

**Cuadro 21. Conteo bacteriológico de las UFC/cm<sup>2</sup> del Rastro B.**

No de muestra	UFC/cm <sup>2</sup>	No de muestra	UFC/cm <sup>2</sup>	No de muestra	UFC/cm <sup>2</sup>
1	1,428,000	26	1,800,000	51	1,396,000
2	1,460,000	27	1,252,000	52	1,522,000
3	1,688,000	28	1,668,000	53	2,128,000
4	2,048,000	29	1,476,000	54	1,424,000
5	1,556,000	30	1,660,000	55	1,488,000
6	<b>2,248,000</b>	31	1,252,000	56	1,684,000
7	1,380,000	32	1,660,000	57	1,432,000
8	1,668,000	33	1,448,000	58	1,900,000
9	2,008,000	34	1,472,000	59	1,984,000
10	1,452,000	35	1,360,000	60	1,748,000
11	1,660,000	36	1,780,000	61	1,448,000
12	1,948,000	37	2,068,000	62	1,600,000
13	1,424,000	38	1,940,000	63	1,692,000
14	1,648,000	39	1,512,000	64	1,592,000
15	1,304,000	40	<b>1,236,000</b>	65	1,560,000
16	1,948,000	41	1,572,000	66	1,504,000
17	1,472,000	42	1,548,000	67	2,056,000
18	1,824,000	43	2,092,000	68	1,496,000
19	2,028,000	44	1,820,000	69	1,744,000
20	1,556,000	45	1,872,000	70	1,808,000
21	1,948,000	46	1,444,000	71	1,780,000
22	1,416,000	47	1,512,000	72	1,304,000
23	2,048,000	48	2,124,000	73	1,948,000
24	1,624,000	49	1,648,000	74	1,468,000
25	1,632,000	50	1,264,000		
Los resultados mostrados son con base a la dilución decimal 1X10 <sup>-3</sup> .					

De las 98 muestras realizadas en el rastro C se obtuvo un límite máximo de 2,068,000 UFC/cm<sup>2</sup> y un límite mínimo de 400,000 UFC/cm<sup>2</sup>, correspondientes a las cuatro regiones de la canal analizadas (Cuadro 22).

**Cuadro 22. Conteo bacteriológico de las UFC/cm<sup>2</sup> del Rastro C.**

No de muestra	UFC/cm <sup>2</sup>	No de muestra	UFC/cm <sup>2</sup>	No de muestra	UFC/cm <sup>2</sup>	No de muestra	UFC/cm <sup>2</sup>
1	1,120,000	26	1,160,000	51	936,000	76	2,008,000
2	1,280,000	27	1,380,000	52	1,612,000	77	1,880,000
3	1,156,000	28	1,284,000	53	1,068,000	78	1,972,000
4	796,000	29	1,160,000	54	1,512,000	79	1,568,000
5	1,292,000	30	980,000	55	1,508,000	80	452,000
6	1,648,000	31	1,372,000	56	1,332,000	81	<b>2,068,000</b>
7	1,280,000	32	1,112,000	57	936,000	82	640,000
8	1,512,000	33	868,000	58	1,156,000	83	1,972,000
9	1,104,000	34	1,284,000	59	956,000	84	1,756,000
10	1,156,000	35	1,380,000	60	1,468,000	85	1,732,000
11	868,000	36	1,648,000	61	1,972,000	86	<b>400,000</b>
12	1,284,000	37	1,556,000	62	788,000	87	1,652,000
13	920,000	38	1,460,000	63	680,000	88	1,492,000
14	824,000	39	1,368,000	64	1,280,000	89	1,172,000
15	868,000	40	1,284,000	65	1,448,000	90	456,000
16	1,684,000	41	1,424,000	66	1,308,000	91	1,840,000
17	1,304,000	42	1,112,000	67	1,640,000	92	1,620,000
18	1,504,000	43	1,604,000	68	1,800,000	93	2,020,000
19	1,156,000	44	1,060,000	69	1,500,000	94	1,612,000
20	1,424,000	45	1,364,000	70	1,120,000	95	1,880,000
21	936,000	46	1,380,000	71	1,148,000	96	1,400,000
22	1,024,000	47	1,156,000	72	1,640,000	97	2,000,000
23	1,000,000	48	1,164,000	73	1,100,000	98	1,604,000
24	1,120,000	49	936,000	74	2,580,000		
25	1,068,000	50	1,560,000	75	2,040,000		
Los resultados mostrados son con base a la dilución decimal 1X10 <sup>-3</sup> .							

### 7.3. Prevalencia de *Staphylococcus aureus*

De un total de 217 muestras recolectadas de la superficie de canales de conejos en los tres rastros del Estado de México, se obtuvo una prevalencia de 57.76 % de *S. aureus* comprendida en 121 aislamiento positivos (Cuadro 23).

**Cuadro 23. Prevalencia de *Staphylococcus aureus* en los rastros cunícolas.**

Rastro	Sacrificio Anual	Muestra		Prevalencia de <i>S. aureus</i>	
		No.	%	No.	%
A (Huixquilucan)	19,200	45	21%	28	62.22%
B (San Felipe del Progreso)	31,200	74	34%	42	56.75%
C (Tecámac)	42,000	98	45%	51	52.04%
Total	92,400	217	100%	121	57.76%

### 7.4. Resistencia Antimicrobiana

De los aislamientos de *S. aureus* se obtuvo una resistencia a la prueba de tamizado de Oxacilina (1µg) en un 32.23% (Cuadro 24).

**Cuadro 24. Prueba de tamizado de Oxacilina (1µg).**

Aislamientos de <i>S. aureus</i> analizados	Aislamientos Resistentes		Aislamientos Sensibles	
	No cepas	%	No cepas	%
121	39	32.23	82	67.76

Los resultados de resistencia obtenidos para amoxicilina con ácido clavulánico fueron de 51.23 %, seguida de la cefoxitina con un 35.53 % quedando con menor resistencia la oxacilina presentando el 32.2 % (Cuadro 25) en las muestras aisladas de superficie de canales de conejos.

**Cuadro 25. Patrón de resistencia antimicrobiana a meticilina.**

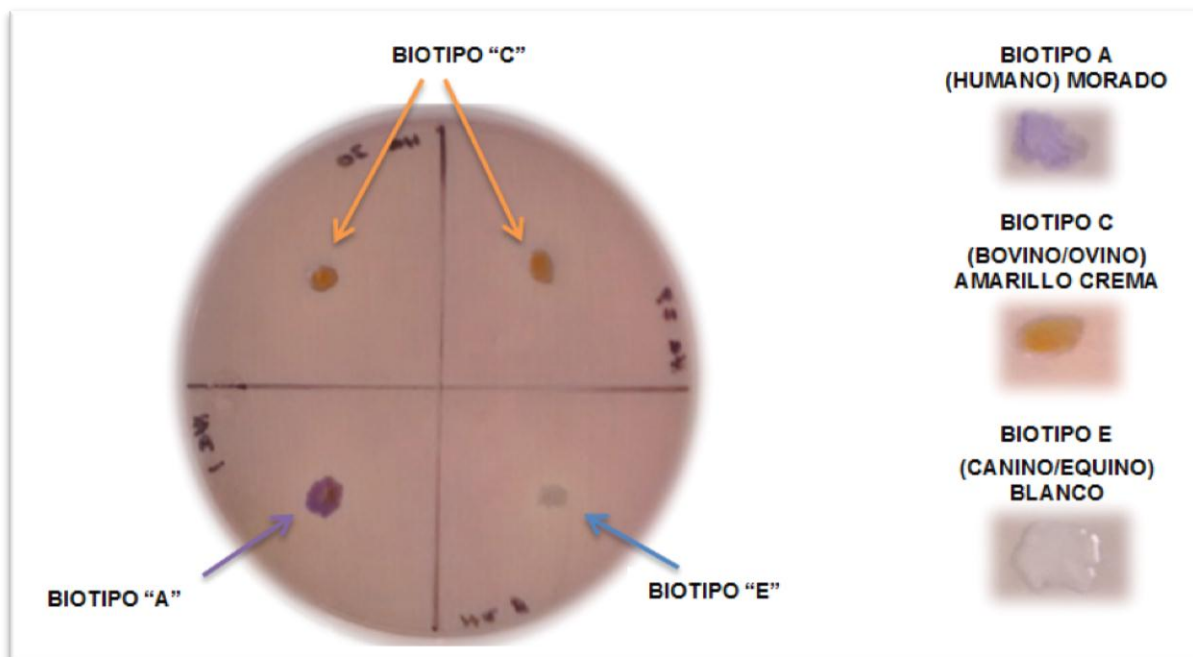
Aislamientos de <i>Staphylococcus aureus</i>			OX				AmC				FOX			
Rastro			Resistente		Sensible		Resistente		Sensible		Resistente		Sensible	
	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%
A	28	62.22	4	3.30	24	19.83	15	12.39	13	10.74	4	3.30	24	19.83
B	42	56.75	17	14.04	25	20.66	30	24.93	12	9.91	18	14.87	24	19.83
C	51	52.04	18	14.87	33	27.27	17	14.04	34	28.09	21	17.35	30	24.79
Total	121	100	39	32.2	82	67.76	62	51.23	59	48.76	43	35.53	78	64.46

OX (Oxacilina 1µg), AmC (Amoxicilina con Ácido Clavulánico 30µg), FOX (Cefoxitina 30µg)

### 7.5. Identificación de biotipos

Las UFC en crecimiento de agar cristal violeta (Figura 17) se visualizaron claramente para los biotipos A (UFC violetas), C (UFC amarillo-crema) y E (UFC blancas).

**Figura 17. Identificación de biotipos en agar cristal violeta.**



Los biotipos de *S. aureus* identificados fueron diferentes en su frecuencia; el 77.68 % correspondieron al biotipo A (Humano), el 9.09 % al biotipo C (Bovino/Ovino), el

1.65 % al biotipo E (Canino/Equino) y el 11.57 % se consideraron como hospederos no específicos (NE). El biotipo A se consideró predominante en los aislamientos identificados (Cuadro 26).

**Cuadro 26. Distribución de biotipos de *Staphylococcus aureus* aislados de canales de conejo.**

Biotipos	Origen	Número de aislamientos de <i>S. aureus</i>	Rastro A	Rastro B	Rastro C	% de Aislamientos	Promedio de aislamientos de <i>S. aureus</i>
A	Humano	94	21	36	37	77.68	31.33 <sup>a</sup>
C	Bovino/Ovino	11	3	4	4	9.09	3.66 <sup>b</sup>
E	Canino/Equino	2	2	0	0	1.65	0.66 <sup>b</sup>
NE	No específico	14	2	2	10	11.57	4.66 <sup>b</sup>
Total		121	28	42	51	100	40.33

Literales diferentes por fila indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

## 7.6. Identificación del biofilm

Se determinó la identificación de cepas de *S. aureus* positivas a biofilm por el método de placa en agar rojo Congo (Figura 18). De igual manera se identificaron también en tubo por el método Christensen (Figura 19).

Figura 18. Identificación de biofilm por el método de agar rojo Congo.



Figura 19. Identificación de biofilm por el método Christensen.



De los aislamientos positivos a *S. aureus* se determinó un 14.8 % de biofilm positivo en tubo, utilizando el método de Christensen. Sin embargo, con el método de agar rojo Congo se obtuvo solo un 6.6 % positivo a biofilm (Cuadro 27).

**Cuadro 27. Determinación de biofilm en aislamientos de *Staphylococcus aureus*.**

Aislamientos de <i>Staphylococcus aureus</i>			Biofilm en placa (Rojo Congo)						Biofilm en Tubo (Christensen)					
Rastro	No	%	P	%	I	%	N	%	P	%	I	%	N	%
A	28	13.36	2	1.6	10	8.2	16	13.2	9	7.4	17	14.0	2	1.6
B	42	20.04	4	3.3	13	10.7	25	20.6	3	2.4	30	24.7	9	7.4
C	51	24.34	2	1.6	18	14.8	31	25.6	6	4.9	29	23.9	16	13.2
Total	121	100	8	6.6	41	33.8	72	59.5	18	14.8	76	62.8	27	22.3

P (Positivo); I (Intermedio); N (Negativo).

## 7.7. Amplificación de gen *mecA* por medio la Reacción en Cadena de la Polimerasa en punto final y tiempo real

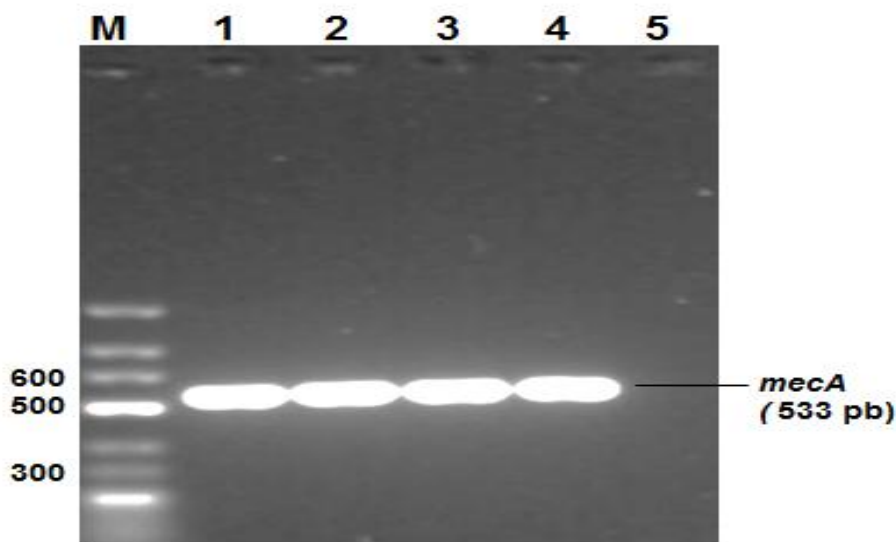
### 7.7.1. Cuantificación del ADN

La concentración y pureza del ADN oscilo de 237.44 ng. a 430.55 ng.

### 7.7.2. PCR punto final

Se corrió PCR punto final (Figura 20) en los aislamientos positivos a *S. aureus* para determinar la resistencia a meticilina amplificando el gen *mecA* en un 35.53%.

**Figura 20. Amplificación de ADN por PCR punto final del gen *mecA*.** El carril M es el marcador de peso molecular; carril 1 cepa control positiva ATCC 43300; carril 2 aislamiento MRSA de rastro A; carril 3 aislamiento MRSA de rastro B; carril 4 aislamiento MRSA de rastro C y carril 5 control negativo ATCC 25923.

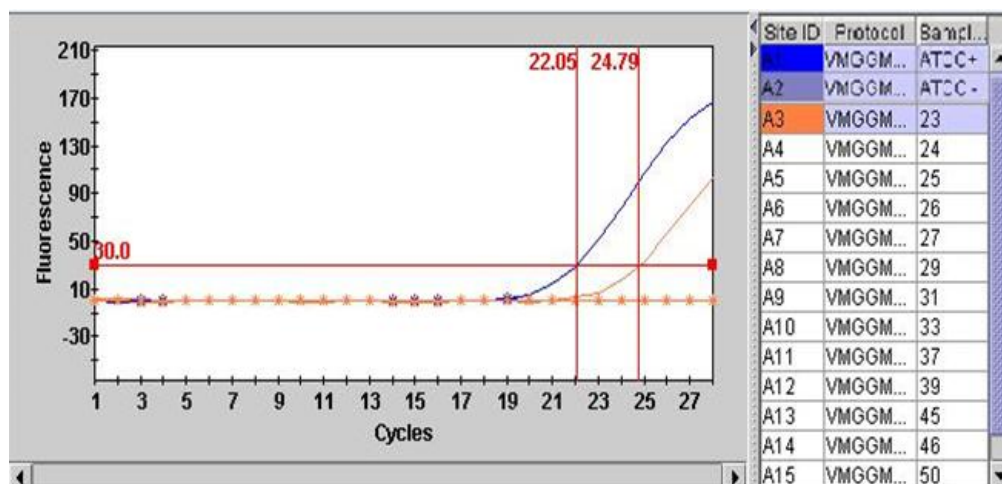




### 7.7.3. PCR tiempo real

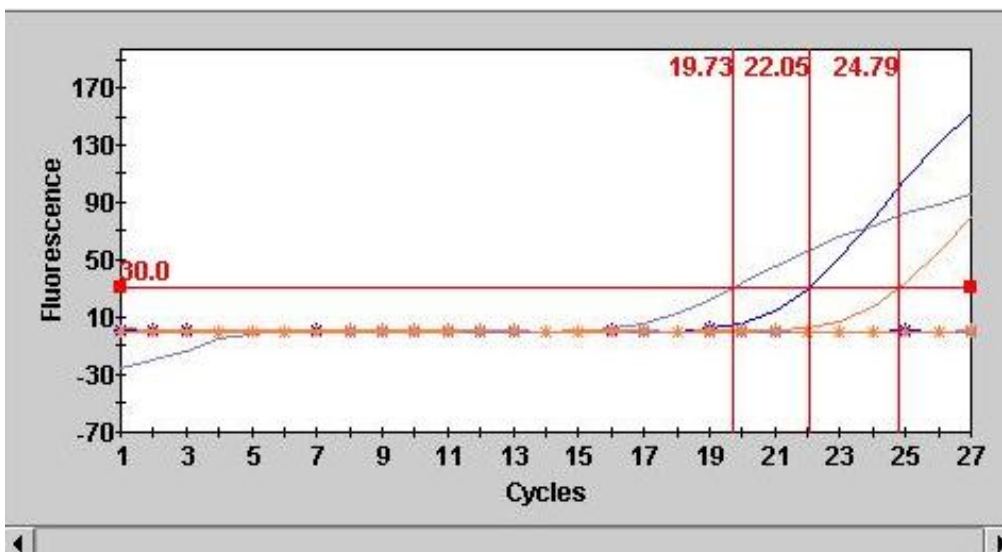
Se corrió PCR tiempo real (Figura 21, 22, 23 y 24) identificando la presencia del gen *mecA* en los aislamientos positivos por *S. aureus* que determinaron resistencia a meticilina en un 35.53 %.

**Figura 21. Gráfica de la PCR tiempo real para identificación del gen *mecA*.** A1) Muestra la amplificación de la cepa control positivo ATCC 43300 (MRSA) en el ciclo 22.05; A2) Presenta la ATCC 25923 (MSSA) control negativo, no se visualiza amplificación en la gráfica; A3) Se observa amplificación del gen *mecA* en un aislamiento de *S. aureus* meticilina resistente en el ciclo 24.79.



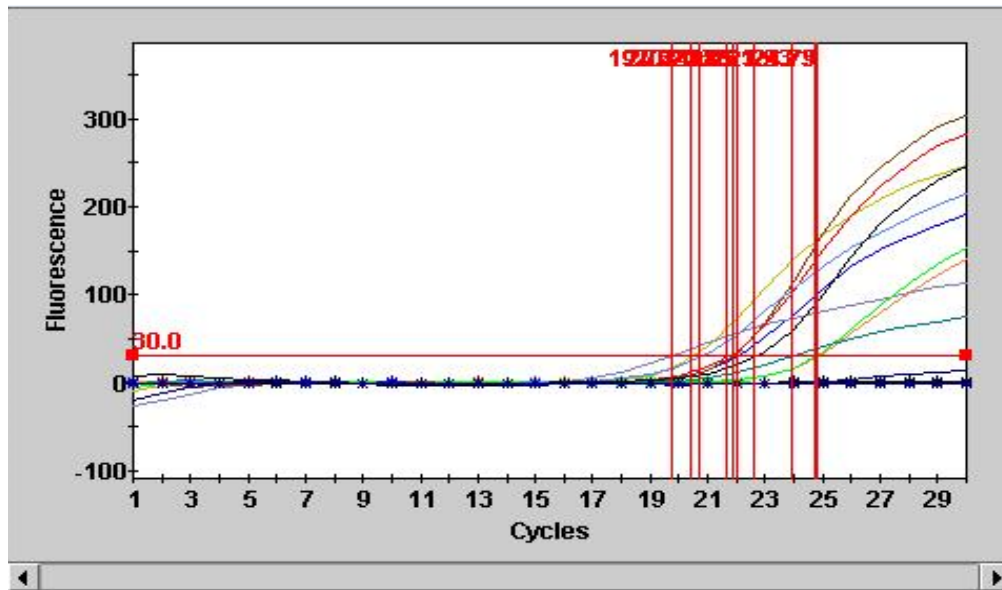
(Amplificación de cepa control y aislamiento 3 de MRSA).

**Figura 22. Gráfica de la PCR tiempo real con amplificaciones del gen *mecA* en rastro A.**



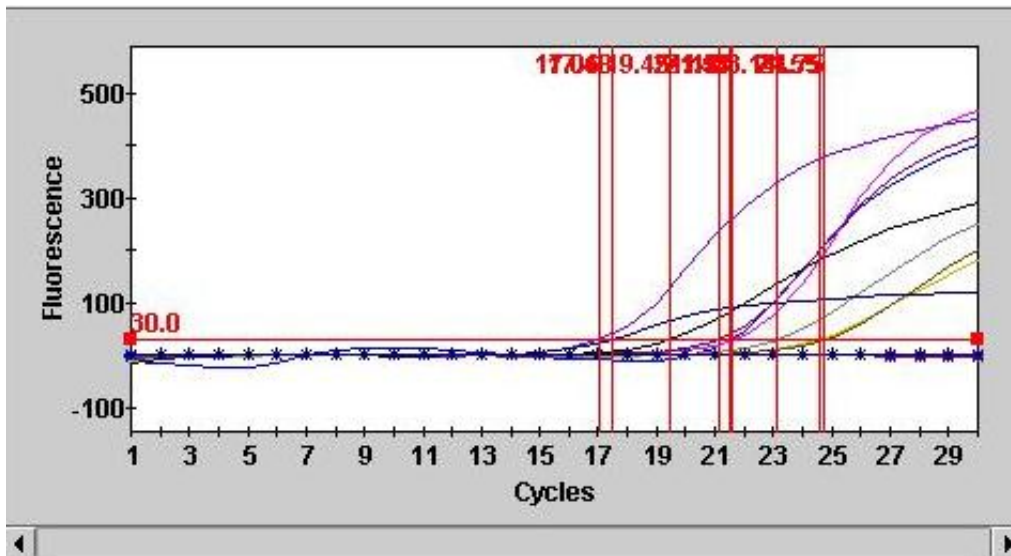
(Amplificación de cepa control y aislamiento 3 y 5 de MRSA).

Figura 23. Gráfica de la PCR tiempo real con amplificaciones del gen *mecA* en rastro B.



(Amplificación de cepa control y aislamiento 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 15 y 16 de MRSA).

Figura 24. Gráfica de la PCR tiempo real con amplificaciones del gen *mecA* en rastro C.



(Amplificación de cepa control y aislamiento 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14 y 15 de MRSA).

#### 7.7.4. Genotipo MRSA

De los aislamientos de *S. aureus* se obtuvieron 43 cepas portadoras del gen *mecA* identificadas mediante la técnica de PCR punto final y PCR tiempo real, representando un 35.53 % positivo a MRSA (Cuadro 28).

**Cuadro 28. Identificación genotípica para MRSA**

Rastro	<i>S. aureus</i>		Presencia del gen <i>mecA</i>	
	No.	%	No.	%
A (Huixquilucan)	28	62.22%	4	14.28 %
B (San Felipe del Progreso)	42	56.75%	18	42.85 %
C (Tecámac)	51	52.04%	21	41.17 %
Total	121	57.76%	43	35.53 %

## 7.8. Determinación de los puntos críticos de control en los rastros

La aplicación del sistema de análisis de riesgos en el proceso de obtención de carne de conejo en los rastros figuro de la siguiente manera:

**Análisis de riesgo.** En esta etapa se evaluó el proceso de obtención de la carne, de tal manera que en cada uno de los rastros se supervisó el manejo en que se realiza a cada uno de los trabajadores, para poder así empezar a realizar la evaluación.

### Descripción de producto y descripción del uso presunto

Cuadro 29. Ficha de descripción del producto y determinación de uso presunto en los rastros.

Tipo de proceso	Obtención de la carne
<b>Datos de los establecimientos</b>	
<b>Rastro cunícola de Huixquilucan</b>	Número de empleados: 9 Sacrificio semanal promedio: 400 conejos Horario de trabajo: 08:00-15:00
<b>Rastro cunícola de San Felipe del Progreso</b>	Número de empleados: 6 Sacrificio semanal promedio: 650 conejos Horario de trabajo: 07:00- 20:00
<b>Rastro cunícola de Tecámac</b>	Número de empleados 35 Sacrificio semanal promedio: 875 conejos Horario de trabajo 08:00-:16:00
<b>Nombre del producto</b>	Carne fresca en canal
<b>Composición del producto</b>	% en peso húmedo Agua: 70 Proteína: 19-25 Grasa: 3-8 pH: 6-7 Carbohidratos: 0
<b>Uso</b>	En el caso del rastro de Huixquilucan la carne de conejo es distribuida para su venta y consumo en la zona gastronómica de la marquesa. Para el rastro de San Felipe del Progreso su distribución se realiza en el comercio de varios municipios de la zona norte del Estado de México. En el caso del rastro de Tecámac, la carne es distribuida directamente en centros de autoservicio comerciales de zonas conurbadas del Estado de México y Distrito Federal.
<b>Tipo de presentación</b>	En el caso del rastro de Huixquilucan y de San Felipe del Progreso la canal del conejo no se empaca, sale entera o piezas. En el caso de Tecámac la canal se empaca al alto vacío y su presentación es canal entera, media canal o por piezas.

<b>Vida de anaquel</b>	Esto es de acuerdo a la temperatura y humedad relativa de almacenamiento. Con un conservación entre los 2°y 4° C su vida de anaquel esta entre los 6 y 8 días.
<b>Tipo de venta</b>	Al menudeo y mayoreo.
<b>Instrucciones de manejo</b>	No se especifica en el producto. Se recomienda la refrigeración o congelación hasta el momento de la preparación para el consumo.

## **Rastro cunícola de Huixquilucan**

### **Verificación de material de trabajo**

El establecimiento cuenta con un Médico Veterinario, el cual es el encargado de verificar que antes de realizar el sacrificio de los conejos se cuente con todo el equipo e instrumental necesario para tal fin.

Los utensilios de trabajo se encuentran en buen estado, la principal problemática recae en el personal que no realiza bien su higienizado antes de realizar las faenas diarias.

### **Arribo de animales e Inspección ante mortem**

Los conejos son transportados en camionetas para su arribo al establecimiento y son colocados en jaulas dentro de una nave para su inspección antes de ser sacrificados (Figura 25). Los animales sospechosos de alguna enfermedad son colocados en jaulas separadas para su seguimiento. La nave donde son colocados los conejos se encuentra en buenas condiciones, sin embargo no manejan medidas de bioseguridad para su ingreso.

**Figura 25. Arribo de conejos en el Rastro de Huixquilucan.**



### **Área de Aturdimiento**

El aturdimiento es realizado en la parte exterior de la sala de matanza, se realiza mecánicamente por concusión, una persona es la encargada de realizar este procedimiento.

### **Izado**

Los conejos son colgados en ganchos para realizarle las demás faenas del proceso de obtención de la canal, con esta acción facilita el proceso de degüelle y evitan una posible contaminación al no tener contacto el animal con otra superficie.

### **Degüelle**

Se realiza conforme a la normatividad, sin embargo, las instalaciones del establecimiento, aún no están totalmente habilitadas (Figura 26), lo que puede representar un riesgo de contaminación en las canales de los conejos.

**Figura 26. Área de degüelle en el rastro de Huixquilucan.**



### **Desollado**

El desollé se realiza de manera eficaz, sin embargo, las pieles no son colocadas de manera correcta en los contenedores correspondientes para estas (Figura 27), ocasionando que se contaminen otras áreas del establecimiento o ensucien su indumentaria los mismos trabajadores.

**Figura 27. Pieles de conejos desolladas.**



### **Eviscerado**

Este proceso se realizó de manera rápida y adecuada evitando perforar las vísceras verdes, así como la vesícula biliar. El único problema es que los trabajadores no esterilizan o lavan los cuchillos frecuentemente con los cuales realizan esta actividad.

## **Inspección post mortem**

Es realizada por el Médico Veterinario del establecimiento, el cual garantiza que las canales de los conejos sean aptas para el consumo humano (Figura 28).

**Figura 28. Inspección post mortem de una canal de conejo.**



## **Lavado**

Se realiza de manera rápida e inadecuada con el uso de una manguera de agua, no visualizan en la parte interior de la canal el correcto lavado.

## **Escurrimiento**

Las canales de los conejos son puestas en rejillas para su escurrimiento antes de ser conservadas en refrigeración por un periodo de 15 minutos, sin embargo, algunas de las rejillas utilizadas no estaban bien lavadas presentando condiciones higiénicas inaceptables.

## **Conservación**

Finalizado el escurrimiento, las canales de conejo son apiladas para ser conservadas en refrigeración a una temperatura entre los 0-4° C. Si alguna canal no fue lavada correctamente existe el riesgo de contaminación cruzada.



## **Rastro cunícola de San Felipe del Progreso**

### **Verificación de material de trabajo**

El equipo y material de trabajo no es supervisado por ninguna persona en especial, no existe un encargado que prevea las necesidades primordiales del buen funcionamiento de las herramientas de trabajo que son utilizadas en el proceso de sacrificio de los conejos.

Los diferentes materiales utilizados en todo el proceso de faena se encontraron funcionales para su correcto uso pero descuidados en su generalidad.

### **Arribo de animales e Inspección ante mortem**

Los conejos destinados al sacrificio son resguardados en jaulas (Figura 29) colocadas de forma táctica dentro de una nave de producción la cual contiene vientres en reproducción. No existen medidas de bioseguridad en la nave de producción. No existe personal capacitado que realice una inspección ante mortem.

**Figura 29. Jaulas de resguardo para conejos.**



### **Área de Aturdimiento**

El aturdimiento se realiza mecánicamente por concusión, una persona es la encargada de realizar este procedimiento. No existe un área establecida para realizar este proceso.

## Izado

Una vez aturdidos los conejos, estos son sujetados de las patas para ser izados y posteriormente realizar las demás actividades del proceso (Figura 30).

**Figura 30. Delimitación del área de izado.**



## Degüelle

El degüelle es realizado como lo menciona la normatividad, sin embargo, el área destinada para este proceso no cuenta con las medidas de bioseguridad.

## Desollado

Este proceso es realizado de manera manual, las pieles son colocadas en botes de plástico. Una mala práctica identificada fue que los faenadores manipulan en su totalidad las canales de los conejos con el fin de quitar la piel, no utilizan cuchillos y no se observa que se laven las manos frecuentemente, lo que puede representar un riesgo de contaminación entre varias canales.

## Eviscerado

La cuchillería utilizada para este proceso no se esteriliza, dado que no se cuentan con esterilizadores en este establecimiento. No se apreció ruptura de vísceras ni de vesícula biliar. El escurrimiento del contenido visceral contamina el suelo del establecimiento durante el proceso de faenado y no es lavado hasta el final de la labor, lo que puede ocasionar un riesgo por el crecimiento bacteriano.

## **Inspección post mortem**

No existe personal capacitado que realice esta tarea tan importante.

## **Lavado**

Se realiza introduciendo las canales en botes de plástico con agua por varias ocasiones. Una mala práctica detectada en los operadores fue que en la misma agua donde se introducen las canales, ellos se lavan las manos.

## **Escurrimiento**

Las canales de los conejos son puestas en mesas de plástico para su escurrimiento y otras tantas son colgadas en tubos previamente lavados. Las mesas se visualizaron percutidas y los tubos percutidos, siendo esto un posible factor de contaminación.

## **Conservación**

Las canales son conservadas en refrigeración a 4° C hasta su proceso de entrega en los diferentes puntos de venta. Las canales al ser acomodadas para su conservación tienen contacto una con otra; si alguna canal no fue lavada correctamente puede ocasionar proliferación bacteriana y contaminar a las demás canales.

## **Rastro cunícola de Tecámac**

### **Verificación de material de trabajo**

Este establecimiento cuenta con un Médico Veterinario Responsable Autorizado en Establecimientos TIF (MVRATIF), autorizado como coadyuvante de la SAGARPA, el cual es el encargado de verificar que antes de realizar el proceso de faenado de los conejos, las instalaciones se encuentren sanitizadas en su totalidad. El rastro no puede iniciar su proceso sin la presencia del MVRATIF. Todo el equipo y material de trabajo se encontró funcional y en buen estado.

## **Arribo de animales e Inspección ante mortem**

La producción en este establecimiento es netamente privada, por lo que no existe arribo de animales de producciones externas. Existen naves definidas para el resguardo de los animales destinados al sacrificio (Figura 31), en las cuales el MVRATIF es el encargado de realizar la inspección ante mortem.

El establecimiento maneja estrictas medidas de bioseguridad.

**Figura 31. Nave de resguardo para animales destinados al sacrificio.**



## **Área de Aturdimiento**

Existe un área específica para realizar el aturdimiento. El cual es realizado por electro insensibilización (Figura 32). La sala de aturdimiento y el equipo electro insensibilizador se encuentran en buenas condiciones.

**Figura 32. Método de electro insensibilización en conejos.**



## Izado

Los conejos son colgados en ganchos para realizarle las demás faenas del proceso de obtención de la canal, con esta acción facilita el proceso de degüelle y evitan una posible contaminación al no tener contacto el animal con otra superficie (Figura 33).

**Figura 33. Izado del conejo.**



## Degüelle

Se realiza con forme a la normatividad, los cuchillos son cambiados constantemente y colocados en los esterilizadores para evitar un posible riesgo por contaminación (Figura 34).

**Figura 34. Degüelle del conejo.**



## **Desollado**

Se realiza con el uso de cuchillería previamente esterilizada (Figura 35). Las pieles son colocadas en carritos de acero inoxidable. Todo el equipo se encuentra en buenas condiciones.

**Figura 35. Desollado del conejo.**



## **Eviscerado**

Este proceso se realizó de manera rápida y adecuada, evitando perforar las vísceras verdes, así como la vesícula biliar (Figura 36). El personal que realiza esta actividad está altamente capacitado, cambia constantemente de cuchillo para evitar riesgos de contaminación entre las canales evisceradas.

**Figura 36. Eviscerado del conejo.**



## **Inspección post mortem**

Es realizada por el MVRATIF del establecimiento, el cual garantiza que las canales de los conejos sean aptas para el consumo humano identificando las posibles patologías existentes (Figura 37).

**Figura 37. Patología en hígado de conejo identificada en la Inspección post mortem.**



## **Lavado**

Se realiza con agua corriente utilizando una manguera a presión (Figura 38), posteriormente se efectúa un sanitizado pasando por un túnel de sanitización, con el propósito de disminuir la contaminación lo mayormente posible.

**Figura 38. Lavado de la canal del conejo.**





## **Escurrimiento**

Las canales se colocan en rejillas para su escurrimiento antes de ser conservadas. El equipo que se encontraba en esta área se visualizó en perfecta condiciones (Figura 39).

**Figura 39. Área de escurrimiento de canales de conejo.**



## **Conservación**

La conservación de las canales se realiza en cámaras de refrigeración (0-4°C) y congelación (-18°C) después de realizado el empaque (Figura 40).

**Figura 40. Conservación en refrigeración de una canal de conejo.**





### 7.8.1. Evaluación de riesgos sanitarios de los rastros cunícolas de Huixquilucan, San Felipe del Progreso y Tecámac.

Los resultados obtenidos indican que el rastro cunícola de San Felipe del Progreso se encuentra clasificado con un alto riesgo sanitario, así mismo, el rastro de Huixquilucan se diagnosticó con riesgo sanitario medio, mientras que los resultados para el rastro de Tecámac lo consideraron en riesgo sanitario bajo (Cuadro 30) de acuerdo a la evaluación ajustada a rastros cunícolas de riesgos sanitarios de los rastros de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS).

**Cuadro 30. Evaluación de riesgos sanitarios de los rastros cunícolas de Huixquilucan, San Felipe del Progreso y Tecámac.**

Rastro	Huixquilucan	San Felipe del Progreso	Tecámac
Ubicación	Rural	Rural	Suburbano
Instalaciones cercadas	Sí	Sí	Sí
Tipo de acceso	Camino terracería	Camino terracería	Camino pavimentado
Área de arribo de animales	Sí	Sí	Sí
Jaulas de descanso	Sí	Sí	Sí
Jaulas para animales en observación	No	No	Sí
Realizan inspección ante-mortem	Sí	Sí	Sí
¿Quién realiza inspección sanitaria?	Médico Veterinario	No existe inspección sanitaria	MVRATIF
Exámenes clínicos a personal	No	No	Sí
Método de sacrificio	Mecánico por concusión	Mecánico por concusión	Insensibilizador eléctrico
Se cuenta con rieles para el manejo de la canal	Sí	No	Sí
Se realiza faenado aéreo	Sí	Sí	Sí
La sangre se destina a algún proceso	No	No	No

Se produce harina de Sangre	No	No	No
Como se separa la piel	Manual	Manual	Manual
Existen esterilizadores de cuchillos y sierras	No	No	Sí
Se capacita al personal para realizar su trabajo	Sí	Sí	Sí
En que se depositan las vísceras	Botes de plástico	Botes de plástico	Carritos de acero inoxidable
Existen salas separadas para el manejo de vísceras verdes y rojas	No	No	Sí
Se identifican las vísceras de cada canal	Sí	Sí	Sí
Existe registros de los decomisos	No	No	Sí
Se cuenta análisis bacteriológicos y fisicoquímicos del agua	Sí	No	Sí
El personal cuenta con vestimenta de trabajo	Sí	No	Sí
Se cuenta con incineradores	Sí	Sí	Sí
Cuenta con planta de rendimiento	No	No	Sí
Existe fosa de Sedimentación	No	No	Sí
Cuál es el destino de las vísceras y canales decomisadas	Se incineran	Se incineran	Planta de Rendimiento
Se lavan las canales después de remover la piel	Sí	Sí	Sí
El agua que se utiliza es potable	Sí	Sí	Sí
Procedencia del agua	Red Publica	Red pública	Red Publica
Las aguas residuales se vierten en	Drenaje Público	Drenaje público	Drenaje Público

Existe cámaras de refrigeración canales	Sí para	No	Sí
Programa trazabilidad productos	de de	No	Sí
<b>Puntaje total</b>	<b>67</b>	<b>83</b>	<b>44</b>
<b>Tipo de riesgo sanitario</b>	<b>MEDIO</b>	<b>ALTO</b>	<b>BAJO</b>

## 7.8.2. Desarrollo de los principios de Análisis de Riesgos y Determinación de Puntos Críticos de Control en los rastros cunícolas de Huixquilucan, San Felipe del Progreso y Tecámac

**Principio 1. Análisis de peligros.** Enumeración de todos los peligros asociados con cada fase del proceso y estudio de las medidas preventivas para el control de los riesgos.

En este estudio se evaluó la contaminación por *S. aureus* meticilina resistente (MRSA) la cual constituye un riesgo biológico de peligro moderado, dado que si se realizan las medidas higiénico – sanitarias adecuadas en el proceso de obtención de las canales de conejos, este riesgo puede ser reducido o eliminado de la canal.

**Principio 2. Establecer puntos críticos de control.** Aplicación de la secuencia de decisiones en cada fase para determinar los PCC.

Se encontró que en los rastros cunícolas de Huixquilucan, San Felipe del Progreso y Tecámac los puntos críticos de control están presentes en el degüelle, en el corte de cabeza y patas, en el desollado, en el eviscerado, en el lavado, en el escurrimiento y en la conservación (Cuadro 31).

**Cuadro 31. Hoja de Análisis de Peligros**

Etapa del proceso	Identifique Peligros potenciales biológicos	¿Algún peligro es significativo para la inocuidad del alimento?	Justifique su decisión de la columna anterior	¿Qué medidas preventivas pueden ser	¿Es esta etapa un PCC? (sí / no)
-------------------	---	---	---	-------------------------------------	----------------------------------

		(sí / no)		aplicadas?	
<b>Arribo de los animales</b>	Ninguno	No	Solo es la llegada de los animales. Esta actividad no genera ningún tipo de contaminación biológica.		No
<b>Aturdimiento</b>	Ninguno	No	El uso del electro insensibilizador o mazo no genera ningún problema de contaminación.		No
<b>Izado</b>	Ninguno	No	Solo es la colocación del animal en los ganchos. Esta actividad no genera ningún tipo de contaminación.		No
<b>Degüelle</b>	MRSA	Sí	La limpieza que se realiza en los cuchillos es un punto crítico, ya que estos pueden estar contaminados.	Realizar una adecuada sanitización de los utensilios de corte.	Sí
<b>Corte de cabeza y patas</b>	MRSA	Si	La limpieza de la cizalla, es un punto crítico ya que esta puede estar contaminada.	Realizar una adecuada sanitización de la cizalla utilizada en el corte de cabeza y patas.	Si
<b>Desollado</b>	MRSA	Sí	Cuchillos o manos insalubres pueden ser un riesgo de contaminación.	Realizar una adecuada sanitización de los utensilios de corte y en las manos de los operadores.	Sí
<b>Evisceración</b>	MRSA	Sí	Manipulación inadecuada de las vísceras, una ruptura de estas puede ocasionar una contaminación.	Tener una adecuada manipulación de las vísceras evitando la ruptura de estas. Capacitación de personal.	Sí
<b>Lavado</b>	MRSA	Sí	Un lavado deficiente puede no eliminar los microorganismos. Otro riesgo es lavar con agua contaminada.	Realizar un lavado a presión y monitorear las propiedades fisicoquímicas y bacteriologías	Sí

				del agua.	
<b>Escurrimiento</b>	MRSA	Sí	Sanitizado deficiente en las superficies para escurrimiento pueden permitir proliferación bacteriana.	Realizar una limpieza y desinfección estricta en las superficies de escurrimiento.	Sí
<b>Conservación</b>	MRSA	Sí	Resguardado de canales sucias pueden contaminar a otras canales. La variación de temperatura puede afectar la calidad microbiológica.	Supervisar el higienizado correcto de las canales y realizar monitoreo constante a las cámaras de conservación.	Sí

---

## 8. DISCUSIÓN

El presente trabajo, se realizó para determinar los niveles de contaminación microbiana de *Staphylococcus aureus* y la caracterización del antibiograma ORSA/MRSA para identificar las cepas MRSA, en los aislamientos obtenidos de canales de conejo procedentes de rastros comerciales del Estado México, se observó un nivel elevado de contaminación de la superficie de las canales por *S. aureus* en los rastros evaluados. Esta situación puede influir sobre la inocuidad de la carne de conejo en su comercialización, lo cual coincide con el estudio realizado por Velázquez *et al.*, 2008, en donde se identificó un 36 % de las canales contaminadas por *S. aureus* en mercados populares y supermercados en el Valle de Toluca. Asimismo, la identificación de los fenotipos de los aislamientos realizados permitió establecer una asociación del nivel de contaminación y el origen presuntivo de los aislados con factores de virulencia que pueden implicar un riesgo a la salud animal y humana.

El análisis de la contaminación de la canal de conejo en los rastros evaluados se realizó de forma fácil y confiable, a partir de la modificación del método de muestreo de superficie en canales de abasto (Garduño *et al.*, 2015a), permitiendo establecer una relación entre la superficie de muestreo proporcional para las regiones del muslo, lomo, costillar y cuello con la contaminación por cm<sup>2</sup> de las superficies de la canal del conejo (Garduño *et al.*, 2015b). El nivel de contaminación observado en las canales de conejo estudiadas en los rastros puede ser atribuido a factores de manipulación inadecuada durante el proceso de faenado o por la posible contaminación ambientales del establecimiento (Signorini *et al.*, 2005).

En el estudio se apreció una elevada contaminación de *S. aureus* en la superficie de las canales de conejo, mayor a la establecida por la normatividad mexicana que establece no más de 100 UFC por 25 g o ml. (NOM115-SSA1-1994). La inspección sanitaria de las canales destinadas al abasto de carne establece que en la superficie de las canales exista ausencia de *Salmonella*, *E. coli* y *Listeria* en 25 g., sin embargo, no precisa cual es el nivel de contaminación por *S. aureus*

(SENSICA, 2010b). Las diferencias de contaminación de las canales observadas entre los diferentes rastros pueden ser atribuidas a la línea de sacrificio, equipo, materiales, la manipulación del personal durante el proceso, manejo de la carne y su conservación (USDA, 1996).

En los resultados del estudio se obtuvo que las superficies consideradas con las plantillas de 2.5 cm por 2.5 cm, proporcionalmente mostraron una relación semejante con los valores obtenidos de las áreas delimitada de 5 cm por 5 cm y las de 10 cm por 10 cm. El estudio propuso que la evaluación de la contaminación en superficie de canales de conejos puede ser evaluada a través de cuatro áreas delimitadas por una plantilla de 2.5 cm por 2.5 cm para establecer la cuenta total microbiana expresada en UFC/cm<sup>2</sup> (MAP-SOIC, 2004), en un procedimiento similar al recomendado para las especies de abasto de talla mediana y mayor que consideran plantillas de 5 cm por 5 cm y 10 cm por 10cm (USDA, 1996; Commission Decision, 2001; SENASICA 2010b).

En salud pública se considerada al *S. aureus* una bacteria oportunista, debido a que ocasiona enfermedades al humano, principalmente cuando éste atraviesa lapsos de vulnerabilidad asociados a circunstancias anómalas que disminuyen la competencia de su sistema inmunológico. Bajo tales condiciones, el microorganismo es capaz de provocar afecciones en casi cualquier región anatómica, lo cual refleja su amplio poder en cuanto a genes de virulencia que lo habilitan para establecerse, reproducirse, sobrevivir y diseminarse en diversas clases de tejidos (Massey, 2006).

La identificación de los biotipos de *S. aureus* en los aislamientos obtenidos de los canales de conejo estudiadas, permitió establecer entre el nivel de contaminación, el origen presuntivo de los aislamientos, lo cual sugiere una relación con los factores de virulencia identificados y los ecovars del biotipo de *S. aureus* en las canales implicando un riesgo a la salud animal y humana (Devriese *et al.*, 1981; Ortega *et al.*, 2009).

El estudio sugiere una amplia distribución de los biotipos entre los rastros determinada posiblemente por las unidades de producción que los abastecen, al considerar que el *S. aureus* puede estar presente en la piel de animales sanos y en los que presentan infecciones superficiales y profundas (Ortega *et al.*, 2009). La biotipificación puede identificar el origen presuntivo de *S. aureus* para establecer medidas de prevención para reducir el riesgo sanitario por la contaminación. El *S. aureus* y los biotipos asociados pueden ser considerados un indicador del nivel de contaminación de la superficie de la canal, atribuida a una manipulación inadecuada de canales y posible contaminación ambiental de los rastros (SENASICA, 2010b).

Los biotipos identificados en el estudio fueron A (humano), C (bovino/ovino), E (canino/equino) y NE (no específico), los cuales indican una variación importante entre los aislamientos relacionados con los ecovares presentes en los rastros comerciales estudiados. Algunos de los biotipos de *S. aureus* están asociados a factores de virulencia de riesgo a la salud pública que se han identificado en ciertas clonas del patógeno en los conejos (Devriese, 1981).

La mayor frecuencia de los biovares en las canales fue atribuida al biotipo A de origen humano, sugiriendo también una fuente de contaminación durante el proceso de faenado de las canales que incrementa el riesgo a la salud pública por la ocurrencia de enfermedades alimentarias e infecciones cruzadas hombre – animal (Devriese, 1990).

La presencia de *S. aureus* en las canales de conejo indica un alto grado de contaminación asociada a la manipulación e inadecuadas prácticas de higiene durante el proceso de obtención de la canal, la cual frecuentemente puede estar asociada al ecovares de los biotipos (A) humano, (B) cerdos (C) ovino/bovino, (D) conejos (F) aves, (G) ratas/ratones y (E) canino/equino (Hájek and Marsalek, 1971; Menes *et al.*, 1984).

El biovar de *S. aureus* del biotipo C (Ovino/Bovino) denota su importancia en las unidades de producción cunícola asociados al ambiente de producción (Devriese



*et al.*, 1981). Otros estudios relacionados mencionan que los aislamientos de *S. aureus* de origen animal muestran menor proporción de cepas enterotoxigénicas comparadas con los biotipos de origen humano (Yasser *et al.*, 2009). Las cuales generalmente poseen una tendencia a producir cantidades apreciables de proteína A y alfa toxina, incrementando el peligro para la población humana en cepas de *S. aureus* de tipo epidémico (Isigidi *et al.*, 1990 y Velázquez *et al.*, 2004).

En el estudio se identificó una proporción de ecovares de biotipos de *S. aureus* asociados a hospederos NE, lo que representa una alerta epidemiológica. La relación de los biotipos con hospederos NE, se puede asociar epidemiológicamente a un origen probable de los conejos. Algunos de estos aislamientos producen  $\beta$ -hemólisis, no coagulan el plasma de bovino y difieren en la actividad de la staphylokinasa (Devriese *et al.*, 1981). También se ha propuesto que los biotipos NE se asocian a ecovares del biotipo humano (Devriese, 1984).

Existe la posibilidad de que los biotipos de las cepas de *S. aureus* pueden ser portadoras de genes de virulencia asociados con la producción de enterotoxinas, biofilms y plásmidos de resistencia a los antibióticos (Leonard y Markey, 2008).

En la industria alimentaria es muy común la presencia de biofilms en equipos y materiales ya que pueden formarse en cualquier tipo de superficie, incluyendo plástico, cristal, madera, metal y sobre los alimentos (Chmielewsky y Frank, 2003). Considerando que estas formaciones pueden contener microorganismos patógenos y presentan una mayor resistencia a la desinfección, se incrementan las probabilidades de contaminación del producto y de provocar infecciones alimentarias, razón por la que se considera que la presencia de biofilms en las superficies de contacto de la industria alimentaria constituye un evidente riesgo para la salud (Di Ciccio *et al.*, 2015). Uno de los principales problemas en la industria alimentaria está representado por la supervivencia de microorganismos patógenos o alterantes debido a una desinfección insuficiente de las superficies o de los instrumentos en contacto con los alimentos. (Carpentier y Cerf, 1993; Fuster y Valls, 2006).

La presencia de biofilms en superficies es la causa principal de contaminación del producto final. Las consecuencias de esta contaminación pueden conducir a pérdidas económicas debidas tanto al necesario rechazo del producto como, incluso a el desarrollo de enfermedades, si intervienen microorganismos patógenos como el *S. aureus* (Piera Serra, 2003). Los biofilms formados sobre las carnes crudas y en el entorno del manipulador aumentan considerablemente los problemas de contaminación cruzada, resistencia microbiana y de contaminaciones posteriores en el procesado. Esto se debe a que las bacterias del biofilm pueden ser hasta 1000 veces más resistentes a los antibióticos que las mismas bacterias crecidas en medio líquido (Donlan y Costerton, 2002; Mah y O'Toole, 2001; Stewart y Costerton, 2001). Dentro del biofilm, las bacterias están protegidas de la acción de los anticuerpos, del ataque de las células fagocíticas y de los tratamientos antimicrobianos (Lasa *et al*, 2005).

Considerando estas premisas se identificó el biofilm en los aislamientos de las canales de conejo por dos métodos de crecimiento, el primero en agar rojo congo (Freeman *et al.*, 1989), que permitió identificar el tiempo crítico de crecimiento por la temperatura de incubación y el segundo con el método de detección en tubo (Christensen *et al.*, 1982). Los resultados positivos obtenidos en el estudio con el método de rojo congo se presentaron en menor proporción a comparación con el método en tubo, sin embargo, algunos investigadores recomiendan más el método en tubo para la detección de biofilm por que se visualiza una adherencia en una superficie bien definida que representa la biopelícula bacteriana (Freeman *et al.*, 1989).

Los mayores riesgos en la salud pública por la presencia de los biofilm bacterianos es que estos se pueden encuentran involucrados en superficies como el acero inoxidable, el aluminio, el vidrio, catéteres, superficies de contacto con alimentos e indicar un riesgo en la contaminación de alimentos de origen animal y su transmisión al hombre (Chavarrías, 2013).

El aislamiento de *S. aureus* a partir de las canales de conejo estudiadas, indica una contaminación cruzada derivada de procedimientos inadecuados de

sanitización, así como de una mala ejecución de las buenas prácticas de manufactura ocasionando riesgos a la salud. La solución a esta situación se garantiza al realizar estos programas en los establecimientos de una manera oportuna y con estricto control sanitario para reducir el riesgo por la posible presencia de cepas de *S. aureus* potencialmente patógenas las cuales causan enfermedades transmisibles por alimentos a causa de posibles enterotoxinas o resistencia a los antibióticos (FAO, 2009).

Los alimentos pueden servir de vehículo para diseminar *S. aureus* meticilina resistente (MRSA). Existen estudios en los que se reporta que la carne de venta al menudeo contiene un bajo nivel de contaminación por *S. aureus* (Kluytmans, 2010). Sin embargo, otros estudios reportan la presencia de MRSA en una variedad de carnes como: pollo, pavo, cerdo, ternera, res, cordero e incluso conejo (Harper *et al.*, 2010; Kitai *et al.*, 2005; Kluytmans, 2010; Kwon *et al.*, 2006; Weese *et al.*, 2010; Lozano *et al.*, 2009; Van den Broek *et al.*, 2009;). Los niveles que se informan varían ampliamente desde < 0.5% hasta 35%, dependiendo del tipo de carne y del país de origen. La identificación de MRSA en las canales de conejos analizadas de los rastros de estudio se reportó mayor a la de 17.2 % mencionada en una investigación similar realizada en otro país (Ortega, *et al.*, 2009).

De igual manera, se han identificado MRSA a partir de otras fuentes en animales de producción como son: granjas lecheras, médicos veterinarios, empleados de rastros, trabajadores de granjas (Haran *et al.*, 2011; Huber *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2013), condiciones ambientales (Missohou *et al.*, 2011), así como a partir de los alimentos cárnicos y lácteos (Vandendriessche, 2013; Normanno *et al.*, 2007). En diferentes estudios se concluye que los aislamientos de *S. aureus* en los alimentos, pueden no ser de origen animal y que en una gran mayoría son de origen humano, pero pueden proceder de personas que tienen contacto con animales (Turutoglu *et al.*, 2009; Sakwinska *et al.*, 2011; Haenni *et al.*, 2011). Sin embargo, también el aislamiento de *S. aureus* puede provenir de la contaminación del medio ambiente influyendo sobre la contaminación animal y en los procesos de transformación de los productos de origen animal (Missohou *et al.*, 2011). Es

posible que los resultados obtenidos en el estudio se denoten de una contaminación del proceso de faenado, el cual pudiera tener relación con los niveles de contaminación ambiental en las unidades de procesamiento de las canales y la contaminación cruzada por manipulación (Signorini *et al.*, 2005).

La identificación de *S. aureus* meticilina resistente en las canales de conejos establece un riesgo importante a la salud pública, al estar asociadas a la contaminación de superficies de la canal, con cepas productoras de biofilm durante el proceso (Da Silva *et al.*, 2012), incrementando la posibilidad de que ocurra la contaminación de la carne y de otros productos procesados, poniendo en riesgo la salud de la población, al ocurrir una diseminación de las cepas MRSA de origen animal al hombre por un riesgo ocupacional en los rastros (Cha *et al.*, 2013; Devriese, 1984). La identificación genotípica de la resistencia intrínseca a la meticilina en los aislamientos obtenidos de *S. aureus*, mediante la amplificación del gen *mecA* con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) establece la evidencia en la ocurrencia de cepas MRSA en canales de conejos de abasto. Demostrando la utilidad de la PCR tradicional para detectar en gen *mecA* siguiendo el protocolo establecido por (Kobayashi *et al.*, 1994), la cual confirmó la presencia del gen *mecA*, igualmente por la PCR tiempo real.

La confirmación a través de la PCR alerta de manera definitiva sobre el peligro de las cepas MRSA de origen animal, las cuales se pueden transmitir al hombre e incrementar las infecciones a la población humana (Huber *et al.*, 2010). La diseminación potencial de las cepas MRSA a la población humana puede ocurrir por medio de los alimentos y la manipulación de animales portadores de estas cepas MRSA-LA que potencialmente pueden ser de carácter comunitario y epidémico tanto para el hombre y como para los animales. (Leonard y Markey, 2008).

Siguiendo el método descrito por Kobayashi *et al.*, 1994, los resultados del estudio a través de la PCR punto final mostraron visualizaciones de la amplificación del gen *mecA* de 533 pares de bases, mientras que con la técnica de la PCR en tiempo real se observó la cuantificación de las amplificaciones de las cepas

portadoras del gen *mecA*. Los resultados obtenidos de la PCR convencional no mostraron diferencia con los datos adquiridos de la PCR tiempo real para la amplificación del mismo gen, pero esta última técnica fue más eficaz en sus tiempos de diagnóstico y menos riesgosa si consideramos el uso de productos cancerígenos como el bromuro de etidio utilizado generalmente en la PCR convencional (Huletsky et al., 2004; Tamay *et al.*, 2013).

Considerando los riesgos sanitarios en los rastros de estudio, no existe información reportada de análisis de riesgos en rastros cunícolas, pero esta investigación coinciden con otros estudios donde se determina que el riesgo sanitario se debe a malas condiciones sanitarias, instalaciones deficientes, equipo inadecuado de limpieza y desinfección, malos hábitos de higiene de los trabajadores y deficiencia en la limpieza de utensilios e indumentaria de trabajo (Reyes, 2010). Asimismo, se observa que la inadecuada ejecución de las Buenas Prácticas de Manufactura y los deficientes Procedimientos de Operación Estándar de Sanitización son de vital importancia para contrarrestar los riesgos y como menciona (Peace *et al.*, 2004) los riesgos de seguridad no pueden ser eliminados, pero pueden prevenirse o reducirse.

## 9. CONCLUSIONES

La frecuencia de la contaminación por *Staphylococcus aureus* en las canales de conejos fue de 57.76 %, mostrando un 35.53 % de resistencia a la meticilina.

El método de muestreo no invasivo realizado en superficie de canales de conejo utilizando una plantilla de 2.5 cm por 2.5 cm analizando cuatro regiones de la canal permitió establecer el nivel de contaminación de la superficie en las canales en rastros comerciales. Evidenciando que las regiones con mayor contaminación de la canal en la línea de sacrificio fueron las regiones del costillar y del cuello.

Los biotipos de *S. aureus* identificados correspondieron al A, C, E y NE asociados a la elevada contaminación de las superficies de canales de conejo en los rastros comerciales evaluados, indicando el origen presuntivo de los ecovares relacionados al hombre y los animales de producción.

Al evaluar el riesgo sanitario en los rastros cunícolas, bajo el protocolo modificado de la COFEPRIS en el proceso de obtención de la carne de conejo se apreciaron diferencias entre los rastros C (Tecámac), fue el más bajo; el rastro A (Huixquilucan) mostro valores medios y el rastro C (San Felipe del Progreso) los valores más altos.

Los puntos críticos que se identificaron en los rastros cunícolas A, B y C respectivamente fueron en las áreas de degüelle, corte de cabeza y patas, desollado, eviscerado, lavado, escurrimiento y conservación se determinó donde de determino que existe riesgo de que la canal se contamine.

## 10. SUGERENCIAS

Se recomienda realizar más estudios que determinen la fuente de contaminación microbiológica de las canales de conejos al efectuar el análisis de los genotipos de *S. aureus*.

Identificar el tipo de cepas de *S. aureus* metilicina resistente asociadas a los genotipos presentes en los rastros.

Realizar capacitación de BPM, POES y HACCP en los establecimientos dedicados al sacrificio de conejos para reducir los riesgos sanitarios y cumplir la normatividad mexicana para garantizar la inocuidad de los productos cárnicos.

Evaluar el riesgo sanitario de las cepas MRSA de origen cunícola en la salud pública y su posible diseminación a través de la canal del conejo.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. **Aguilera P., Ruiz T.M., Graciela M.M.G., Pineda O.B., Chánez C.M.E. 2014.** Herramientas moleculares aplicadas en ecología. PCR en tiempo real. Laboratorio de Biología Molecular, Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental, Instituto Nacional de Ecología. México, D.F. P.p. 175-201.
2. **ANCUM. 2010.** Asociación Nacional de Cunicultores de México A. C. Seminario de Producción Cunícola. Memorias del VIII Encuentro Nacional de Cunicultores, México D.F.
3. **ANCUM. 2011.** Asociación Nacional de Cunicultores de México A. C. Consulta en página Web. <http://ancum.org.mx/prospectiva.html> Fecha de Consulta: 11 de Noviembre del 2014.
4. **Asensio A., Canton R., Vaque J., Rossello J., Calbo F., Garcia C.J. 2006.** Nosocomial and community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in hospitalized patients (Spain, 1993-2003). *Journal of Hospital Infection.* 63:465-71.
5. **Baird-Parker A.C. 1962.** An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase-positive staphylococci. *Journal of Applied Bacteriology.* 25: 12-19.
6. **Bautista-Trujillo G.U., Solorio-Rivera J.L., Rentería-Solórzano I., Carranza-Germán S.I., Bustos-Martínez J.A., Arteaga-Garibay R.I., Baizabal-Aguirre V.M., Cajero-Juárez M., Bravo-Patiño A., Valdéz-Alarcón J.J. 2013.** Performance of culture media for the isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Journal of Medical Microbiology.* 62:369–376.
7. **Benoit S.R., Estivariz C., Mogdasy C., Pedreira W., Galiana A., Bagnulo H., Gorwitz R., Fosheim G.E., McDougla L.K., Jernigan D. 2008.** Community Strains of Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus* as Potential Cause of Healthcare-associated Infections, Uruguay, 2002-2004. *Emerging Infectious Diseases journal.* 14(8):1216-1223.



8. **Berger-Bachi B. and Rohrer S. 2002.** Factors influencing methicillin resistance in Saphylococci. Archives of Microbiology. 178: 165-171.
9. **Brody T., Yavatkar A.S., Lin Y., Ross J., Kuzin A., Kundu M., Fann Y., Odenwald W.F. 2008.** Horizontal Gene Transfer Link a Human MRSA Pathogen to Contagious Bovine Mastitis Bacteria. PLoS ONE, 3(8):1-8.
10. **Broseta A., Chaves F., Rojo P., Otero J.R. 2006.** Emergence of a single clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in southern Madrid children. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 24:31-5.
11. **Bustos M.J.A., Hamdan P.A., Gutiérrez C.M. 2006.** *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Revista Biomédica. 17:287-305.
12. **Camarena J.J y Sánchez R. 2001.** Infección por *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina. Departamento de Microbiología. Hospital.
13. **CLSI. 2012.** Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. 32(3):M100-S22.
14. **Campos B. C. A. 2004.** Proceso de obtención de la carne. Prevención de riesgos sanitarios mediante el sistema HACCP. México.
15. **Carpentier B., Cerf O. 1993.** Biofilms and their consequences with particular references to hygiene in the food industry. Journal of Applied Bacteriology. 75, pp: 499 511.
16. **Cercenado E., Cuevas O., Marin M., Bouza E., Trincado P., Boquete T. 2008.** Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Madrid, Spain: transcontinental importation and polyclonal emergence of Panton-Valentine leukocidin-positive isolates. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 61:143-9.

- 17. Cha J.O., Yoo J.I., Yoo J.S., Chung H.S., Park H.S., Kim H.S., Lee Y.S., Chung G.T. 2013.** Investigation of Biofilm Formation and its Association with the Molecular and Clinical Characteristics of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Osong Public Health Res Perspect.* 4(5), 225-232.
- 18. Chambers H.F. 1997.** Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. *Clinical Microbiology Reviews.* 10 (4): 781-891.
- 19. Chambers H.F. and De Leo F. 2009.** Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the Antibiotic Era. *Nature Reviews Microbiology.* 7:629-641.
- 20. Chavarrías M. 2013.** Biofilms, qué son y cómo evitarlos. *Revista El diario del consumidor. EROSKI CONSUMER,* Publicación 17 de Enero 2013.
- 21. Chmielewsky R.A.N., Frank, J.F. 2003.** Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 2, pp: 22-32.
- 22. Christensen G.D., Simpson W.A., Bisno A.L., Beachey E.H. 1982.** Adherence of Slime-Producing Strains of *Staphylococcus epidermidis* to Smooth Surfaces. *Infection and Immunity.* P.p. 318-326.
- 23. Cohen G. 1977.** *Microbiología y Biología molecular.* Omega, Barcelona. Colección métodos. España.
- 24. Cohen G. 1982.** The Staphylococci bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *Wiley-interscience.* London pp.431-441.
- 25. Colín M., Lebas F. 1992.** Situación actual de la producción mundial de carne de conejo. *Cunicultura,* XVII. Pp. 25 – 31.
- 26. Commission Decision of June 8, 2001.** (2001/471/EC). *Official Journal of the European Communities,* L 165, 48-53.
- 27. Copyright IBM Corporation 1989, 2011.** IBM-SPSS Statistics 20. GSA ADP Schedule Contract con IBM Corporation, USA.

- 28. Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin S.H.M. 1995.** Microbial biofilms. Annual Review of Microbiology. 49: 711-745.
- 29. Cuny C., Friedrich A., Kozytska S., Layer F., Nübel U., Ohlsen K., Strommenger B., Walther B., Wieler W. 2010.** Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) indifferent animal species. International Journal of Medical Microbiology. 300:109-117.
- 30. Cottral, G. E. 1978.** The *Staphilococcoci* bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. Wiley-interscience. London pp.431-441.
- 31. Da Silva M.Q.G., De Medeiros B.I., Aguilár A.A.J., Pinto De Siqueira J.J., De Sousa L.E. 2012.** Influence of temperatura and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surface and sensitivity to sanitizers. Food Control. 25: 469-475.
- 32. Dainty R., Chaw B. G., Roberts, T. A. 1983.** Microbial and changes in chill stored red meats. Food Microbiology. P.p. 151-178.
- 33. De Lencastre H., De Jonge B.L.M., Matthews P.R., Tomasz A. 1994.** Molecular aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Journal Antimicrob Chemother. 33:7-24.
- 34. Deresinski S. 2005.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. Clinical Infectious Diseases. 40:562-573.
- 35. Devriese L.A. and Hommez J. 1975.** Epidemiology of metthcillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds. Research in Veterinary Science. 19, 23-27.
- 36. Devriese L.A., Godard C., Okerman, L. Renault L. 1981.** Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains from rabbits. Annales de Recherches Vétérinaires. 12, 327-332.
- 37. Devriese L.A. 1984.** A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. Journal of Applied Bacteriology. 56, 215-220.

- 38. Devriese L.A. 1990.** *Staphylococci* in healthy and diseased animals. Journal of Applied Bacteriology. 71S-80S.
- 39.**
- 40. Deurenberg R.H., Vink C., Kalenic S., Friedrich A.W., Bruggeman C.A., Stobberingh E.E. 2007.** The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology and Infection. 13:222-35.
- 41. Di Ciccio P., Vergara A., Festino A.R., Paludi D., Zanardi E., Ghidini S., Ianieri A. 2015.** Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperatura and cell surface hydrophobicity. Food Control. 50: 930-936.
- 42. Dimitracopoulos G., Sakellariou C., Papavassilius J. 1977.** Animal Fecal Carriership and Biotypes of *Staphylococcus aureus*. Applied and Environmental Microbiology.
- 43. Donlan R.M. and Costerton J.W. 2002.** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiology Reviews. 15: 167-193.
- 44. Elana P.B. 2011.** The Nemours Foundation. [http://kidshealth.org/parent/en\\_espanol/infecciones/mrsa\\_esp.html#](http://kidshealth.org/parent/en_espanol/infecciones/mrsa_esp.html#)  
Fecha de consulta: 21 de Noviembre del 2013.
- 45. FAO, 2009.** Buenas prácticas de manufactura (BMP) y Análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Disponible en <http://www.inppaz.org.ar>. Fecha de consulta: 30 de Septiembre del 2015.
- 46. Farkas J. 2001.** Physical Methods of Food Preservation. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 2nd ed. ASM Press, Washintongton, D.C. P.p 567-591.
- 47. Fernández E.E. 2008.** Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. Segunda Edición. México.

- 48. Foster T. 2006.** *Staphylococcus*. En: Baron S, Editor. Medical Microbiology. 4a ed. <http://gsbs.utmb.edu/microbook> (21 Noviembre 2013).
- 49. Freeman D.J., Falkiner F.R., Keane C.T. 1989.** New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. Journal of Clinical Pathology. 42:872-874.
- 50. Fuelle M.J. 2005.** Frecuencia y tipos de toxinas superantígenos en *Staphylococcus aureus* de diferentes antígenos: relacionados con tipos genéticos. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo.
- 51. Fuster I., Valls N. 2006.** Importancia del control higiénico de las superficies alimentarias mediante técnicas rápidas y tradicionales para evitar y/o minimizar las contaminaciones cruzadas. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. P.p 150-157.
- 52. Gallardo N. J. L. 2003.** Reunión del Comité Nacional Sistema – Producto – Cunícola, SAGARPA, México D.F.
- 53. García A.C. 2011.** *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad. Acta Médica Peruana. 28(2):159-162.
- 54. Garduño G.V.M., Velázquez O.V., Alonso F.M.U., Zamora E.J.L., Talavera R.M., Domínguez V.I.A. Mendoza B.J. 2015.** Non destructive standardised method to determine bacterial contamination by *Staphylococcus aureus* in rabbit carcasses. Journal of the world rabbit science asociation. 23: 76.
- 55. Garduño G.V.M., Velázquez O.V., Valladares C.B., Alonso F.M.U., Talavera R.M., Rodríguez C.J.L. 2015b.** Estimación de la contaminación por *Staphylococcus aureus* en superficie de canales de conejos en un rastro comercial. Memorial del XVII Congreso Internacional de Inocuidad de Alimentos y XXXII Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos. Nuevo Vallarta, Nayarit, México.
- 56. Gill C. O. 1998.** Microbial contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs. Blackie Academic and Professional, London P.p. 118-157.

- 57. Gil D.M. 2000.** *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. Revista Chilena de Infectología. 17(2):145-152.
- 58. Gobierno de Idaho. 2011.** Departamento de Salud y Bienestar del Estado de Idaho, E.U.A. Publicación 13 de diciembre de 2011. [http://www.healthandwelfare.idaho.gov/Health/DiseasesConditions/MethicillinresistantStaphylococcusaureus\(MRSA\)/tabid/203/Default.aspx](http://www.healthandwelfare.idaho.gov/Health/DiseasesConditions/MethicillinresistantStaphylococcusaureus(MRSA)/tabid/203/Default.aspx)  
Consultado: 21 de Noviembre del 2013.
- 59. González G., Aguilar A., León F., Altamirano A., Fernando J., Gómez O. 1997.** Modelo de análisis de riesgos, identificación y control de puntos críticos en rastros, bajo un desarrollo sustentable. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal. 5: 619-621.
- 60. Gordon R.J. and Lowy F.D. 2008.** Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* infection. Clinical Infectious Diseases. 46: 1-16.
- 61. Graveland H., Duim B., Van Duijkebernb E., Heederika D., Wagenaarb J.A. 2011a.** Mini Review Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals and humans. International Journal of Medical Microbiology. 301:630-634.
- 62. Graveland H., Wagenaarb J.A., Bergs K., Heesterbeek H., Heederik D. 2011b.** Persistence of livestock associated MRSA CC398 in humans is dependent on intensity of animals contact. PLoS One 6, e16830.
- 63. Grumann D., Nubel U., Broker B.M. 2013.** *Staphylococcus aureus* toxins. Their functions and genetics. Infection, Genetics and Evolution. 21: 583–592.
- 64. Hájek V. and Marsalek E. 1971.** The differentiation of pathogenic staphylococci and a suggestion for their taxonomic classification. Zentralblatt, für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Abt. 1. Orig. A 217, 17-182.
- 65. Haran K.P., Godden S.M., Boxrud D., Jawahir S., Bender J.B., Sreevatsana S. 2011.** Prevalence and Characterization of

- Staphylococcus aureus*, Including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Isolated from Bulk Tank Milk from Minnesota Dairy Farms. Journal of Clinical Microbiology. 50, 688-695.
- 66. Haenni M., Galofaro L., Ponsin C., Bes M., Laurent F., Madec J.Y. 2011.** Staphylococcal bovine mastitis in France: enterotoxins, resistance and the human Geraldine methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clone. Journal Antimicrob Chemother., 66: 216–225.
- 67. Harper A.L., Ferguson D.D., Leedom Larson K.R., Hanson B.M., Male M.J., Donham K.J., Smith T.C. 2010.** An overview of livestock-associated MRSA in agriculture. Journal Agromedicine. 15(2):101-4.
- 68. Hermans K., Devriese L. A., Haesebrouck F. 2004.** Pathogenesis of bacterial infections in animals. Third edition. Blackwell publishing, EUA.
- 69. Hennekinne J.A., Kerouanton A., Brisabois A., De Buyser M.L. 2003.** Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. Journal of Applied Microbiology. 94, 321-329.
- 70. Hiramatsu K., Katayana Y., Yuzawa H., Ito T. 2002.** Molecular genetics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. International Journal of Medical Microbiology. 292: 67-74.
- 71. Howe R.A., Brown N.M., Spencer R.C. 1996.** The new threats of Gram positive pathogens: re-emergence of things past. Journal of Clinical Pathology. 49:444-9.
- 72. Huang S.S., Platt R. 2003.** Risk of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection after Previous Infection or Colonization. Clinical Infectious Diseases. 36:281-5.
- 73. Huber H., Koller S., Giezendanner N., Stephan R., Zweife C. 2010.** Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland, 2009. Euro Surveill 5, 19542.
- 74. Huletsky R., Giroux V., Rossbach M., Gagnon M., Vaillancourt M., Bernier F., Gagnon K., Truchon M., Bastien F., Picard J.A., Belkum**

- V., Ouellette M., Roy P.H., Bergeron M.G. 2004.** New Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Specimens Containing a Mixture of *Staphylococci* A. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 42, No. 5.P.p. 1875–1884.
- 75.Hurtado M.P. de la Parte M.A., Brito A. 2002.** *Stahylococcus aureus*: Revision of the mechanisms of phathogenicity and physiopathology of staphylococcal infections. Rev. Soc. Ven Microbiol., 22 (2).
- 76.INAFED. 2015a.** Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. Características topografías del municipio de Huixquilucan. Fecha de Consulta: 01 de Septiembre de 2015. <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM15mexico/municipios/15037a.html>
- 77.INAFED. 2015b.** Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. Características topografías del municipio de San Felipe del Progreso. Fecha de Consulta: 01 de Septiembre de 2015. <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM15mexico/municipios/15074a.html>
- 78.INAFED. 2015c.** Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. Características topografías del municipio de Tecámac. Fecha de Consulta: 01 de Septiembre de 2015. <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM15mexico/municipios/15081a.html>
- 79.INEGI. 2007.** Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Censo Agropecuario 2007, VIII Censo Agrícola, Ganadero y Forestal. México D.F.
- 80.Jaramillo A.C.J. y Martínez M.J.J. 2010.** Epidemiología Veterinaria. Manual Moderno. México, D.F. P.p. 103-126.
- 81.Kanafani Z.A. and Fowler V.G. 2006.** *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 24:182-93.



- 82. Katayama Y., Ito T., Hiramatsu K. 2000.** A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44: 1549-1555.
- 83. Kawada M.M. and Komatsuzawa H. 2012.** Factors affecting susceptibility of *Staphylococcus aureus* to antibacterial agents. *Journal of Oral Biosciences*. 54: 86–91.
- 84. Kitai S., Shimizu A., Kawano J., Sato E., Nakano C., Uji T., Kitagawa H. 2005.** Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw chicken meat in Japan. *Journal Veterinary Medical Association*. 67(1):107-10.
- 85. Kluytmans J.A. 2010.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or case for complacency? *Clinical Microbiology and Infection* 16(1):11-5.
- 86. Kobayashi N., Wu H., Kojima K., Taniguchi K., Urasawa S., Uehara N., Omizu Y., Kishi Y., Yagihashi A., Kurokawa I. 1994.** Detection of *mecA*, *femA*, and *femB* genes in clinical strains of staphylococci using polymerase chain reaction. *Epidemiology and Infection*. 113: 259-266.
- 87. Koneman E. 1999.** Diagnóstico Microbiológico. Editorial Panamericana. Quinta edición. Buenos Aires Argentina.
- 88. Kwon N.H., Park K.T., Jung W.K., Youn H.Y., Lee Y., Kim S.H., Bae W., Lim J.Y., Kim J.Y., Kim J.M., Hong S.K., Park Y.H. 2006.** Characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat and hospitalized dogs in Korea and their epidemiological relatedness. *Veterinary Microbiology*. 117(2-4):304-12.
- 89. Lamprell H., Villard L., Chamba J.F., Beuvier E., Borges E., Marurin F., Mazerolles G., Noel Y., Kodjo A. 2004.** Identification and biotyping of coagulase positive staphylococci (CPS) in ripened French raw milk cheeses and their in vitro ability to produce enterotoxins. *Revue De Medecine Veterinaire*. 155 (2): 92-96.
- 90. Lasa I., Del Pzo J.L., Penadés J.R., Leiva J. 2005.** Biofilms bacterianos e infección. *Anales Sis San Navarra Vol.28 No.2 Pamplona, España*

- 91. Lebas F., Coudert P., Rouvier R., Rochambeau H. 1986.** El Conejo, cría y patología. FAO. Roma, Italia.
- 92. Lee J. H. 2003.** Methicillin (Oxacillin)-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Major Food Animals and Their Potential Transmission to Humans. American Society for Microbiology. 69(11):6489-6494.
- 93. Leonard F.C. and Markey B.K. 2008.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: A review. The Veterinary Journal. 175: 27-36.
- 94. Lewis H.C., Molbak K., Reese C., Aarestrup F.M., Selchau M., Sorum M., Skov R.L. 2008.** Pigs as Source of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC398 Infections in Humans, Denmark. Emerging Infectious Diseases Journal. 14(9):1383-1389.
- 95. Lilenbaum W., Nunes E.L., Azeredo M.A. 1998.** Prevalence and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from the skin surface of clinically normal cats. Letters in Applied Microbiology. 27:224-228.
- 96. Lim S.K., Nam H.M., Jang G.C., Lee H.S., Jung S.C., Kim T.S. 2013.** Transmission and Persistence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Milk, Environment, and Workers in Dairy Cattle Farms. Foodborne Pathogens and Disease. 10:731-736.
- 97. Llarrull L.I., Fisher J.F., Mobashery S. 2009.** Molecular Basis and Phenotype of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* and Insights into New  $\beta$ -Lactams. That Meet the Challenge. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 53(10):4051-4063.
- 98. Loh J.V., Percival S.L., Woods E.J., Williams N.J., Cochrane A. (2009).** Silver resistance in MRSA isolated from wound and nasal sources in humans and animals. International Wound Journal; 6 (1):32-38.
- 99. Lowe S., Browne M., Boudjelas S., De Poorter M. 2000.** 100 de las Especies Exóticas Invasoras más dañinas del mundo. Una selección del

Global Invasive Species Database. Grupo Especialista de Especies Invasoras (GEEI). Comisión de Supervivencia de Especies (CSE). Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), 12pp. Primera edición, en inglés, sacada junto con el número 12 de la revista Aliens, diciembre de 2000. Versión traducida y actualizada: Noviembre de 2004.

100. **Lowy FD. 1998.** *Staphylococcus aureus* infections. New England Journal of Medicine. 339: 520–532.
101. **Lozano C., López M., Gómez S.E., Ruiz L.F, Torres C., Zarazaga M. 2009.** Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in food samples of animal origin in Spain. Journal Antimicrob Chemother. 64(6):1325-6.
102. **Lukefahr S. D. 1999.** Small – Scale Rabbit Meat Production in the western hemisfere: Back to Basis? Journal of the World Rabbit Science Association, 7 (2):87- 94.
103. **Ma X.X., Galiana A., Pedreira W., Mowszowicz M., Christophersen I., Machiavello S., Lope L., Benaderet S., Buela F., Vincentino W., Albini M., Bertaux O., Constenla I., Bagnulo H., Llosa L., Ito T., Hiramatsu K. 2005.** Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Uruguay. Emerging Infectious Diseases Journal. 11:973-976.
104. **Maggi E. 2008.** Carne de conejos. Análisis de Cadena Alimentaria. Consulta en página Web. <http://www.minagri.gob.ar/site/ganaderia/conejos/index.php>. Consultado el día 15 de junio del 2014.
105. **Mah TF and O’Toole G.A. 2001.** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiology. 9: 34-39.
106. **Manjarrez L.A.M., Díaz Z.S., Salazar G.F., Valladares C.B., Gutiérrez C. A., Barbabosa P.A., Talavera R.M., Alonso F.M.U. Velázquez O.V. 2012.** Identificación de biotipos de *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras de producción familiar con mastitis subclínica en la región centro-este del Estado de México. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, vol. 3, núm. 2, pp. 265-274.

- 107. Manzur A., Dominguez A.M., Pujol M., Gonzalez M.P., Limon E., Hornero A. 2008.** Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: an emerging threat in Spain *Clinical Microbiology and Infection*. 14:377-80.
- 108. MAP-SOIC. 2004.** Manual de Procedimientos para Muestreo Microbiológico en Establecimientos Certificados. Departamento de Productos Cárnicos y Mataderos. Sistema Oficial de Inspección de Carnes. Dirección de Inocuidad de los Alimentos. Gobierno de Guatemala.
- 109. Malouin F., Brouillette E., Martinez A., Boyll B.J. 2005.** Identification of antimicrobial compounds active against intracellular *Staphylococcus aureus*. *Immunology and Medical Microbiology*. 45 245-252.
- 110. Marzocca, M. A., Marucci, P. L., Sica, M. G., Álvarez E. E. 2006.** Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en carne picada fresca y hamburguesas congeladas. *Revista Argentina de Microbiología*. 38:38-40.
- 111. Massey R.C., Horsburgh M.J., Lina G., Hook M., Recker M. 2006.** The evolution and maintenance of virulence in *Staphylococcus aureus*: a role for host-to-host transmission?, *Nature Reviews Microbiology*. 4, 953-958.
- 112. Mejía C., Zurita J., Guzmán B.M. 2010.** Epidemiology and surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 14:S79-86.
- 113. Mendoza B. J. 2001.** Situación de la cunicultura en México. Ciclo internacional de conferencias en cunicultura empresarial. UACH. México.
- 114. Mendoza B. J. Guadarrama V. M. Jasso. G. C. 2001.** Diagnóstico estático de la cunicultura en Jocotitlán, Estado de México. Memoria del XV congreso internacional de administración agropecuaria. Sonora, México.

- 115. Meyer W. 1967.** A proposal for subdividing the species *Staphylococcus aureus*. International Journal of Systematic Bacteriology. 17(4): 387-389.
- 116. Millar B.C., Loughrey A., Elborn J.S., More J.E. 2007.** Proposed definitions of community associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). Journal of Hospital Infection. 67:109-113.
- 117. Missohou A., Mbodj M., Zanga D., Niang S., Sylla K.S.B., Seydi M., Cissé O. Seck S.W. 2011.** Analysis of microbiological and chemical quality of poultry meat in the vicinity of the Mbeubeuss landfill in Malika (Senegal). Tropical Animal Health Production. 43:983–988.
- 118. NOM-008-ZOO-1994.** Norma Oficial Mexicana. Especificaciones zoosanitarias para la construcción y equipamiento de establecimientos para el sacrificio de animales y los destinados a la industrialización de productos cárnicos. Diario Oficial de la Federación: 16 de Noviembre de 1994.
- 119. Norma Oficial Mexicana NOM109-SSA1-1994.** Diario Oficial de la Federación. Bienes y Servicios. Procedimientos para la toma, Manejo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico. México.
- 120. Norma Oficial Mexicana NOM110-SSA1-1994.** Diario Oficial de la Federación. Bienes y Servicios. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico. México.
- 121. Norma Oficial Mexicana NOM115-SSA1-1994.** Diario Oficial de la Federación. Bienes y Servicios. Método para la Determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos, México.
- 122. Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014.** Norma Oficial Mexicana. Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres. Diario Oficial de la Federación: 26 de Agosto de 2015.
- 123. NOM-194-SSA1-2004.** Norma Oficial Mexicana. Productos y Servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento,

transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos. Diario Oficial de la Federación: 18 de Septiembre de 2004.

- 124. NMX-FF-105-SCFI-2005.** Norma Mexicana. Productos Pecuarios. Carne de Conejo en Canal. Calidad de la Carne. Clasificación. Diario Oficial de la Federación: 10 de Octubre de 2005.
- 125. Normanno G., Corrente M., La Salandra G., Dambrosio A., Quaglia N.C., Parisi A., Greco G., Bellacicco A.L., Virgilio S., Celano G.V. 2007.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. International Journal of Food Microbiology. 117:219-222.
- 126. OEIDRUSBC. 2009.** Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable, Baja California. Estudio sobre cunicultura en el Estado de Baja California, México, con datos estimados de la FAO y SENASA.
- 127. OMS. 2007.** Estudio de la Organización de las Naciones Unidas, Alimentación y Nutrición 87. Análisis de riesgos relativos a la inocuidad de los alimentos. Guía para las autoridades nacionales de inocuidad de los alimentos. Organización Mundial de la Salud (OMS). Roma, Italia.
- 128. Ortega B. E. 2007.** Diagnóstico Estático de la Cunicultura en el Estado de México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México.
- 129. Ortega C., Simón M.C., Alonso J.L., Mateo A. 2009.** Caracterización y riesgos para la salud pública de la antibiorresistencia de *Staphylococcus aureus* en la cunicultura intensiva. Revue scientifique et technique. International Office of Epizootics. 28(3), 1119-1128.
- 130. Peace, A. R., Bolton, J. D., Sheridan, J. J., McDowell, A. D., Blair, I. S., Harrington, D. 2004.** Studies to determine the critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point systems. I. J. Food Microbiol. 90:331-339
- 131. Peterson L.R., Petzel R.A., Clabots C.R., Fasching C.E. Gerding D.N. 1993.** Medical technologist using molecular epidemiology as part of the infection control team. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 16:303-11.

- 132. Piera S. G. 2003.** Estudio de biofilms: Formación y consecuencia. Disponible en: <http://www.uab.cat/e-prevencio-i-seguretat-integral/noucat/recerca/linies/biorisc/alimentaria/biofilm.pdf> Consultado: 01/09/2015.
- 133. Pinto F.J., Anderson K.L., Correa M.T., Lyman R., Ruffin F., Reller L.B., Fowler V.G. 2011.** Transmission of MRSA between Companion Animals and Infected Human Patients Presenting to Outpatient Medical Care Facilities. PLoS ONE 6(11): e26978.
- 134. Rachel J.G. and Franklin D. 2008.** Lowy Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. Clinical Infectious Diseases. 5: S350–S359.
- 135. Reyes, R.N.E. 2010.** Prevalencia de Escherichia coli O157:H7 y factores de riesgo en canales de bovinos del centro-norte del Estado de México. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México.
- 136. Rodríguez C.J.M. 2006.** Calidad microbiológica de la carne de conejo y estimación de la eficacia de algunos tratamientos tecnológicos de conservación. Tesis Doctoral. Universidad de León. Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos España.
- 137. SAGARPA. 2003.** Programa estratégico para el desarrollo de la cunicultura en México: producción, transformación y comercialización del conejo. Alianza para el campo. Programa estratégico de investigación, transferencia y adopción de tecnología agroalimentaria. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México.
- 138. SAGARPA. 2004.** Volumen de producción de carne de conejo en canal. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México D.F.
- 139. Sakwinska O., Giddey M., Moreillon M., Morisset D., Waldvogel A., Moreillon P. 2011.** *Staphylococcus aureus* host range and human-bovine host shift. Applied and Environmental Microbiology. 77(17): 5908-5915.
- 140. SENASICA 2010a.** Manual de buenas prácticas pecuarias en el sistema de producción de ganado productor de carne en confinamiento.

Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México.

141. **SENASICA. 2010b.** Diario Oficial de la Federación. Programa de Reducción de Patógenos. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México.
142. **Shopsin B. and Kreiswirth B.N. 2001.** Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Emerging Infectious Diseases journal. 7:323-6
143. **Shimizu A., Kawano J., Kimura S. 1986.** Biotyping of Coagulase-Positive *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius* Strains Isolated from Various Animals in Japan. Journal of Veterinary Science. 48(6):1227-1235.
144. **Sibbald M.J.J.B., Ziebandt A.K., Engelmann S., Hecker M., Jong A., Harmsen H.J.M., Raangs G.C., Stokroos I., Arends J.P., Dubois J.Y.F., Van Dijk J.M. 2006.** Mapping the Pathways to Staphylococcal Pathogenesis by Comparative Secretomics. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 70 (3): 755-788.
145. **Signorini M. P., Civit G. S., Bonilla P. S., Cervantes E. M., Mayen E. 2005.** Guía para la realización del diagnóstico sanitario y detección de necesidades operativas de rastros y mataderos municipales. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. México.
146. **SSA. 2010.** Reporte de las Intoxicaciones Causadas por la Ingesta de los Alimentos Contaminados. Instituto de Salud del Estado de México. Secretaria de Salud, México.
147. **Stapleton P.D. and Taylor P.W. 2002.** Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. Progress in Surface Science. 85(1): 57-72.
148. **Stefani S., Chung D.R., Lindsay J.A., Friedrich A.W., Kearns A.M., Westh H., MacKenzie F.M. 2012.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation



of typing methods. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 39:273-282.

149. **Stewart P.S. and, Costerton J.W. 2001.** Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*. 358: 135-138.
150. **Strommenger B., Kehrenberg C., Kettlitz C., Cuny C., Verspohl J., Witte W., Schwarz S. 2006.** Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from pet animals and their relationship to human isolates. *Journal Antimicrob Chemother*. 57:461-465.
151. **Tamay D.L., Ibarra C., Velasquillo C. 2013.** Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*. Vol. 2, Núm. 2, México. P.p. 70-78.
152. **Turutoglu H., Hasoksuz M., Ozturk D., Yildirim M., Sagnak S. 2009.** Methicillin and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis and sequence analysis of their *mecA* genes. *Veterinary Research Communications*. 33, 945–956.
153. **United States Department of Agriculture (USDA). 1996.** Pathogen Reduction; Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems; Final Rule. Food Safety Inspection Service (FSIS), 61, 38926-38938.
154. **Vadillo S., Piriz S., Mateos E. 2002.** Manual de Microbiología Veterinaria. Mc Graw Hill Interamericana.
155. **Van den Broek I.V., Van Cleef B.A., Haenen A., Broens E.M., Van der Wolf P.J., Van den Broek M.J., Huijsdens X.W., Kluytmans J.A., VAN DE Giessen A.W., Tiemersma E.W. 2009.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in people living and working in pig farms. *Epidemiology and Infection*. 137(5):700-8.
156. **Van den Eede A., Martens A., Lipinska U., Struelens M., Deplano A., Dennis O., Haesebrouck F., Gasthuys F., Hermans K. 2009.** High occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in equine nasal samples. *Veterinary Microbiology*. 133:138-144.

- 157. Vandenesch F., Naimi T., Enright M.C., Lina G., Nimmo G.R., Heffernan H., 2003.** Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerging Infectious Diseases journal*. 9:978-84.
- 158. Vandendriessche S., Vanderhaeghen W., Valente S. F., Hallin M., Catry B., Hermans K., Butaye P., Haesebrouck F., Struelens M. J., Denis O. 2013.** Prevalence, risk factors and genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carried by humans and animals across livestock production sectors. *Journal Antimicrob Chemother* 1-7.
- 159. Vásquez M.A., García R.G., Lobo O.M. 2008.** Asociación de los genes implicados en la codificación de proteína de unión a la penicilina 2a (PBP2a) con la expresión fenotípica de resistencia a la meticilina en cepas de *Staphylococcus spp.* *Revista Cuadernos*. 53(1):31-37.
- 160. Velázquez M.M.E. 2005.** Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. *Salud Pública México*. 47:381-7.
- 161. Velázquez M.M.E., Ayala G.J., Carnalla B.M.N., Soto N.A., Guajardo L.C.E., Echaniz A.G. 2011.** Letters to the Editor First Report of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (USA300) in México. *Journal of Clinical Microbiology*. 49(8):3099-3100.
- 162. Velázquez O.V., Alonso F.M.U., Lagunas B.S., Díaz Z.S., Gutiérrez C.A., Monroy S.H., Mendoza B.J. 2008.** Microbial contamination levels in rabbit carcasses obtained from popular markets in Toluca valley, Mexico. *Meat Quality and Safety. 9th World Rabbit Congress Verona – Italy*. Fp. 1455-1460.
- 163. Voss A., Loeffen F., Barkker J., Klaassen C., Wulf M. 2005.** Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerging Infectious Diseases Journal*. 11:1965-1966.

- 164. Walther B., Wieler L.H., Friedrich A.W., Hanssen A.M., Kohn B., Brunberg L., Lübke-Becker A. 2008.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from small and exotic animals at a university hospital during routine microbiological examinations. *Veterinary Microbiology*. 127:171-178.
- 165. Weese J.S., Rousseau J., Traub D.J.L., Willey B.M., McGeer A.J., Low D.E. 2005.** Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and humans who work with horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 226:580-583.
- 166. Weese J.S., Avery B.P., Reid-Smith R.J. 2010.** Detection and quantification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones in retail meat products. *Letters in Applied Microbiology*. 51(3):338-42.
- 167. Wertheim H.F., Verveer J., Boelens H.A., Van Belkum A., Verbrugh H.A., Vos M.C. 2005.** Effect of mupirocin treatment on nasal, pharyngeal, and perineal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy adults. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49:1465-7.
- 168. Wichelhaus T.A., Kern S., Schäfer V., Brade V., Hunfeld K.P. 1999.** Evaluation of modern agglutination tests for identification of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology*. 18, 756-8.
- 169. Wulf M.W., Sorum M., Van Nes A., Skov R., Melcher W.J.G., Klaassen C.H.W. 2008.** Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among veterinarians: an international study. *Clinical Microbiology and Infection*. 14(1):29-34.
- 170. Yasser H., Al-Tarazi, Albetar M.A., Alaboudi A.R. 2009.** Biotyping and enterotoxigenicity of Staphylococci isolated from fresh and frozen meat marketed in Jordan. *Food Research International*. (42):374-379.
- 171. Zadoks R. 2002.** Molecular and Mathematical Epidemiology of *S. aureus* and *S. uberis* Mastitis in Dairy Herds.

- 172. Zhang K., McClure J.A., Elsayed S., Tan J., Conly J.M. 2008.**  
Coexistence of Panton-Valentine *Staphylococcus aureus* USA400 sibling strains in a large Canadian health-care region. International Journal of Infectious Diseases. 197:195e204.
- 173. Zhou Y., Zhao R., Ma B., Gao H., Xue X., Qu Di., Li M., Meng J., Luo X., Hou Z. 2015.** Oligomerization of RNAlII-Inhibiting Peptide Inhibits Adherence and Biofilm Formation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* In Vitro and In Vivo. Microbial Drug Resistance. 7: 1-8.

## 12. PRODUCTOS DE GRADO

### 12.1. Envió de artículo a revista científica Tropical Animal Health and Production

**Tropical Animal Health and Production**  
**Staphylococcus aureus biotypes associated to rabbit carcass contamination in slaughterhouses from Central Mexico**  
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Staphylococcus aureus biotypes associated to rabbit carcass contamination in slaughterhouses from Central Mexico
Article Type:	Regular Articles
Keywords:	Staphylococcus aureus; biotypes; carcass; rabbits; abattoir
Corresponding Author:	María Uxúa Alonso-Fresán, Dr. UAEM Toluca, Mexico MEXICO
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	UAEM
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Víctor Manuel Garduño-Guadarrama, MVZ
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Víctor Manuel Garduño-Guadarrama, MVZ Valente Velázquez-Ordoñez, Dr. María Uxúa Alonso-Fresán, Dr. Benjamín Valladares-Carranza, M en C Martín Talavera-Rojas, Dr. Salvador Lagunas-Bernabé, MVZ Jesús Vázquez-Navarrete, Dr. José Esteban Aparicio Burgos, Dr
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	Universidad Autónoma del Estado de México (3848/2013 CHT) Mr. Valente Velázquez-Ordoñez
Suggested Reviewers:	Hugo Castañeda Vázquez, Dr Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias hcastane59@yahoo.com.mx S aureus expertise
Opposed Reviewers:	

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

[Click here to view linked References](#)

1 ***Staphylococcus aureus* biotypes associated to rabbit carcass contamination in slaughterhouses from**  
2 **Central Mexico**

3

4 Garduño-Guadarrama VM<sup>1</sup>, Velázquez-Ordóñez V<sup>2</sup>, Alonso-Fresán MU<sup>2\*</sup>, Valladares-Carranza B<sup>2</sup>,  
5 Talavera-Rojas MF, Lagunas-Bernabé S<sup>2</sup>, Aparicio-Burgos J.E. <sup>4</sup>, Vázquez-Navarrete J.<sup>4</sup>

6

7 1. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. Universidad  
8 Autónoma del Estado de México (PCARN-UAEM). Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología  
9 (CONACyT). 2. Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), Facultad de  
10 Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM).  
11 Cuerpo Académico en Salud Animal. 3. Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal  
12 (CIESA), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Autónoma del Estado de  
13 México (UAEM). 4. Universidad Autónoma del Estado de México. 5. Centro Nacional de Investigación  
14 Disciplinaria en Microbiología Animal (CENID-Microbiología). Instituto Nacional de Investigaciones  
15 Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

16

17 \*Corresponding author: [muaf@uaemex.mx](mailto:muaf@uaemex.mx) (tel. +52) 7222965555

18

19 **Acknowledgement:**

20 To Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for granting the scholarship number 360812  
21 entitled to Victor Manuel Garduño Guadarrama for his Masters Degree Course in Programa de Ciencias  
22 Agropecuarias y Recursos Naturales. To Universidad Autónoma del Estado de México for the funding of  
23 the project entitled "Variación genética del aislamiento de *Staphylococcus aureus* MRSA obtenidos de  
24 vacas lecheras en unidades de producción familiar, Clave: 3848/2013 CHT". To Delegación Estatal  
25 SAGARPA for the permits conceded, as well as to the legal representatives of the commercial abattoirs  
26 who kindly consented the sampling of the carcasses.

27

28

29

30

31 **Abstract**

32 *Staphylococcus aureus* as food contaminant may pose a public health issue, that could raise an  
33 epidemiological alarm because of the possibility of provoking food transmitted diseases, important not  
34 only for global commerce but for developing countries as well. The objective of this research was to  
35 identify *S. aureus* biotypes associated to surface contamination in 217 rabbit carcasses from three  
36 commercial slaughterhouses located in Central Mexico. Samples were obtained by swabbing four areas in  
37 the carcass (25 cm<sup>2</sup> each), using 2% peptone water at 4°C during transportation for microbiological  
38 analysis. Baird Parker agar plates were cultured with the samples at 37°C for 48 h and tellurite and  
39 lecithinase positive colony forming units (CFU) cultured in Mannitol Salt agar at 37°C for 24 h. Mannitol  
40 positive CFU were Gram stained, and catalase, coagulase, oxidase and Voges Proskauer tests run.  
41 Biotype was identified using violet cristal agar plates, blood agar with sheep and rabbit erythrocytes and  
42 coagulase test tube using bovine and human plasma. Results were evaluated through one-way variance  
43 analysis and Tukey test (P<0.05) using CFU/plate 1X10<sup>-2</sup> dilution. From the total number of samples  
44 57.76% were positive to *S. aureus*, in which the identified biotypes were A (human) 77.68%; C  
45 (bovine/ovine) 9.09% and E (canine/equine), 1.62%. 11.7% of the biotypes were classified as non  
46 specific. Average results for CFU/cm<sup>2</sup> were 147,632.38, 38,544.34 in the slaughterhouses. It is  
47 concluded that *S. aureus* biotypes found in association with high contamination levels may pose a risk to  
48 human health.

49 **Key words:** *Staphylococcus aureus*, biotype, carcass, rabbits, abattoir.

50  
51 **Introduction**

52 Rabbit meat is acknowledged as easy to digest and assimilate when compared to others and is highly  
53 recommended in obesity and cardiovascular problems which frequently affect industrialized countries  
54 (OEIDRUSBC, 2009). Its characteristics such as low cholesterol, saturated lipids, sodium and high  
55 digestible protein, poses it as an ideal candidate for diets directed to people with health problems  
56 (Pastrana, 2002). Not only is there growing interest for the improvement of health in human population  
57 but also the development of specific actions for complications derived from malnutrition (OMS, 1999).  
58 There is a possibility that the change in eating habits worldwide might have increased the demand for the  
59 consumption of rabbit meat, due to its culinary characteristics, which makes it easy to adopt in human

60 diets (Farshad, *et al.*, 2011). In terms of production, Mexico produces 4.2 million tons of rabbit meat,  
61 occupying the fourteenth place among producer countries (OEIDRUSBC, 2009).

62 During slaughter, rabbit carcasses may become contaminated by bacteria, which could affect its quality as  
63 well as its safety, highly regarded for consumers and producers of meat by-products. Quality and food  
64 safety is therefore guaranteed by reducing sanitary risks (SENASICA, 2010), through the maintainance of  
65 good production practices and during the industrialization process, to decrease the possibility of  
66 microbiological contamination and the presence of chemicals (FAO, 2003). Contamination of the carcass  
67 may come from the sacrifice line, equipment, materials, handling during the process or its preservation  
68 (USDA, 1996), as well as from the environment (Missobou *et al.*, 2011). In the Toluca Valley, Mexico,  
69 contamination of rabbit meat by *S. aureus* and other important food safety pathogens has been identified  
70 in popular markets and in supermarkets (Velázquez *et al.*, 2008).

71 Legislation rules the reduction of sanitary risks due to *Staphylococcus aureus* and other pathogens to  
72 guarantee meat microbiological quality (SENASICA, 2010). *S. aureus*, may be able to produce a wide  
73 range of diseases, superficial and deep infections in humans (Farrar *et al.*, 2002; Velázquez *et al.*,  
74 2013). It is considered as an important pathogen when involved in food transmissible diseases due to the  
75 high number of outbreaks it may produce when compared to others (OMS and FAO, 2009), and one of  
76 the most risky regarding health due to the constant resistance and multiresistance to antibiotics used in  
77 human and animal medicine (Leonard and Markey, 2008).

78 On the other hand, *S. aureus* biotypes were introduced by testing staphylokinase production, B-  
79 haemolysin production, coagulation of bovine plasma and cristal violet test, which vary amongst the  
80 species, deriving in host-specific or non-host specific ecovars, which are biotypes clearly associated  
81 with a single animal host or related hosts (Devriese, 1984). This is an unvaluable information regarding  
82 the probable source of contamination of the carcasses.

83 In this respect, some highly virulent *S. aureus* biotypes produce a thermostable enterotoxin, and possess  
84 genetic information that makes them resistant to environmental conditions, which favours its  
85 dissemination and food contamination during processing (Leonard and Markey, 2008). Therefore, the  
86 objective of this study was to identify *S. aureus* biotypes associated to rabbit carcass contamination in  
87 commercial abattoirs in Central Mexico.

88

89



90 **Material and Methods**

91 The study took place in three commercial rabbit abattoirs in Central Mexico, located in three regions of  
92 the State of Mexico: Huiquiquilucan (A) (latitude 19°18'07" and 19°26'27" N; 99°14'10" and 99°24'15"  
93 longitude W), San Felipe del Progreso (B) (latitude 19°43' N, longitude 99°57' W) and Tecamac (C)  
94 (latitude 19°43' N, longitude 99°57' W), chosen according to its annual sacrifice volume, distribution and  
95 commercialization. 217 surface samples were taken by stratified sampling (Jaramillo and Martínez, 2010)  
96 in the sacrifice line to obtain *S. aureus* isolations.

97

98 **Surface contamination sampling procedure**

99 To obtain the sample, the non destructive method used for big species in abattoirs to detect  
100 microbiological contamination (USDA, 1996; Commission Decision, 2001), was adapted to rabbit  
101 carcasses by sampling four regions in 25 cm<sup>2</sup> (shoulder, neck, loin and leg) (Garduño *et al.*, 2015).  
102 Surface detection of *S. aureus* was performed according to NOM-110-SSA1-1994, using a swab  
103 moistened in 2% peptone water and swabbing the four regions, reserving the sample at 4° C in  
104 accordance to NOM-109-SSA1-1994. Serial dilutions were performed in the laboratory as stated in  
105 NOM-115-SSA1-1994. Carcass contamination was determined on surface (cm<sup>2</sup>) according to CFU counts  
106 (CFU/cm<sup>2</sup>) in plates using the dilution 1X10<sup>-2</sup>, by calculation through the estimator  $N_s = (N \cdot F/A) \cdot D$ ,  
107 where N= CFU number in 1 mL of dilution media, F= diluent milliliters in the tube; A= sampled surface  
108 in cm<sup>2</sup> and D= the reciprocal of the dilution (USDA, 2004).

109

110 ***Staphylococcus aureus* identification**

111 *S. aureus* identification was performed using Baird Parker agar (BD Bioxon, Mexico), by homogeneous  
112 culture of 0.1 mL (dilution 1X10<sup>-2</sup>) in plates, and incubating at 37° C for 48 h. CFU positive strains to  
113 tellurite and lecithinase were then cultured in Mannitol Salt agar (BD Bioxon, México) at 37° C for 24 h.  
114 Gram stain, catalase, coagulase tube test and oxidase tests (NOM-115-SSA1-1994), as well as Voges  
115 Proskauer, nitrate in broth (Boerlin *et al.*, 2003), mannitol in anaerobiosis and maltose in aerobiosis were  
116 run for bacteriological confirmation (Cohen, 1977). *S. aureus* ATCC 25923 and *S. epidermidis* ATCC  
117 12228 strains were used as controls for bacteriological analysis.

118

119

120 **Biotype identification**

121 Phenotypical characterization was performed according to Devriese *et al.*, (1981) methodology to identify  
122 the presumptive origin of *S. aureus* isolations from the carcass surface of rabbits. Briefly, violet cristal  
123 agar (tripticase soy agar with cristal violet 1:100,000 added), were incubated at 37° C for 24 h. Biotypes  
124 were identified according to their growth characteristics and CFU positive reaction to cristal violet (CV),  
125 coagulase tube test using bovine and human plasma (12 mm test tubes with 0,3 ml of plasma diluted 1:3),  
126 staphylokynase production and type of haemolysin production in blood agar prepared with sheep and  
127 rabbit erythrocytes (Devriese, 1984). CFU isolations were classified into biotypes according to the tests'  
128 results as follows: biotype A (human) was positive to coagulase using human plasma and showed a  
129 positive reaction to CV (violet CFUs and light yellow halo in the plate, positive to staphylokinase and  $\alpha$ -  
130 haemolysis (Hájek and Marsalek, 1971; Cottral, 1978); biotype C (bovine/ovine), positive to coagulase  
131 using human and bovine plasma, negative reaction to CV, with cream colour CFUs and light yellow halo  
132 in plates, negative to staphylokinase and  $\beta$ -hemolysis (Devriese, 1984; Danjusz *et al.*, 2012); biotype E  
133 (canine/equine), positive to coagulase using bovine plasma, negative reaction to CV, white CFUs and  
134 light yellow halo in plates, negative to staphylokinase and to  $\beta$ -hemolysis (Hájek and Marsalek, 1971;  
135 Shimizu *et al.*, 1986). Non specific biotype (NS) showed differences in human and/or bovine plasma  
136 coagulation, as well as for  $\beta$ -hemolysis (Devriese and Hommez, 1975; Devriese *et al.*, 1981).

137

138 **Results evaluation**

139 The results from surface contamination of rabbit carcasses CFU number per square centimeter were  
140 evaluated using a completely randomized design (Jaramillo and Martínez, 2010) through one factor  
141 variance analysis and Tukey test ( $P < 0.05$ ), in which isolation frequencies and biotypes were evaluated  
142 using IBM-SPSS Version 20 statistical programme.

143

144 **Results**

145 From the overall analysed samples, 57.76% were identified as *S. aureus* (Table 1). Abattoir A with the  
146 least number of sacrificed animals showed the highest isolation frequency (62.22%), when compared to  
147 abattoir C, which had the highest sacrifice volume and the least isolation frequency (52.04%).

148 The average surface contamination level in rabbits' surface caused by *S. aureus* was calculated as  
149  $147,643.32 \pm 38,544.34$  UFC/cm<sup>2</sup> (Table 2). Abattoir B had the highest contamination with  $165,678.38 \pm$   
150  $25129.382$  UFC/cm<sup>2</sup> when compared to the others ( $P < 0.05$ ).

151 *S. aureus* identified biotypes were: biotype A (Human) 77.68 %, C (Bovine/Ovine) 9.09 %, E  
152 (Canine/Equine) 1.62 % and E (NE) 11.57 % which were classified as coming from non specific hosts  
153 (Table 3).

154

## 155 Discussion

156 The biotypes identified in *Staphylococcus aureus* isolations are varied and related to the ecovars present  
157 in the commercial abattoirs (Devriese, 1990), which may reflect the type of production farms that provide  
158 them, minding that the pathogen might as well be present in the skin not only in healthy animals, but in  
159 those with superficial and deep infections as well (Ortega *et al.*, 2009).

160 The importance of the identification of presumptive biotypes in rabbit carcasses, is that these might be  
161 associated to production processes and farm management, taking into consideration that *S. aureus* is  
162 naturally present in skin and mucose of humans and animals as part of its microflora, and should be kept  
163 in mind that it may also come directly or indirectly from other sources such as facilities, bed material or  
164 equipment (Devriese, 1984). According to MASICA (2010), *S. aureus* might be considered as an  
165 indicator of surface contamination of the carcass, due to inadequate manipulation and possible  
166 environmental contamination in abattoirs.

167 Some *S. aureus* biotypes have been associated to virulence factors that pose a risk to public health such as  
168 those identified in certain clones isolated from rabbits (Devriese, 1981).

169 The highest frequency of isolations in the carcasses in this study was classified as biotype A (human  
170 ecovar), suggesting that it became contaminated during the sacrifice process, which may increase the risk  
171 in public health due to the possibility of occurrence of food diseases and human – animal cross infections  
172 (Devriese, 1990), during its manipulation, or because of inadequate hygiene practices during the process  
173 (Garduño *et al.*, 2015), usually associated to biotypes (A) human, (B) pig, (C) ovine/bovine, (D) rabbit,  
174 (F) poultry, (G) rats/mice and (E) canine/equine ecovars (Hájek and Marsalek, 1971; Menes *et al.*, 1984).

175 *S. aureus* biotype C (Ovine/Bovine) is important because it may indicate that the source of the strains  
176 might be associated to the microbiological environment of the farm (Devriese *et al.*, 1981). This biotype  
177 has been identified in meat contaminated with *S. aureus* in other countries (Isigidi *et al.*, 1992). Other

178 studies mention that *S. aureus* strains from animal ecovars have shown a low proportion of  
179 enterotoxigenic toxins when compared to the ones from human ecovar (Yasser *et al.*, 2009), which may  
180 produce a considerable quantity of protein A as well as alfa toxin, increasing the risk for human  
181 population due to epidemic *S. aureus* strains (Isigidi *et al.*, 1990 y Velázquez *et al.*, 2004).

182 Even though in our study there was a low proportion of NE *S. aureus* biotypes, it might as well represent  
183 an epidemiological alarm, because they can probably be related to the rabbit ecovar. Some of these are  
184 capable of producing  $\beta$ -hemolysis, do not coagulate bovine plasma and differ in regards to their  
185 staphylokinase activity (Devriese *et al.*, 1981). It has also been proposed that this biotype might be  
186 associated to human biotype ecovar (Devriese, 1984).

187 It has also been demonstrated that when NE biotypes are characterized using phage viruses they may come  
188 from several ecovars, some related to other production animals (Adegoke *et al.*, 1983). Differences  
189 between ecovars in the predominant biotypes from these animals are highly related to a specific host,  
190 nevertheless, the human biotype might predominate in animal farms (Devriese *et al.*, 1981).

191 There is likelihood that *S. aureus* biotypes carry virulence genes in association with the production of  
192 enterotoxins, biofilms and plasmids that codify antibiotic resistance (Leonard y Markey, 2008).

193 The classification of *S. aureus* biotypes according to the regulation of human and bovine plasma define the  
194 phenotypes related to the ecovars. Furthermore, when the coagulase gene is genotypically analysed, it  
195 might considerably differ, even within certain geographical regions, as well as its genotypic  
196 predominance in relation to virulence in both animal and human populations (Omega *et al.*, 1999 y Bar-  
197 Gal *et al.*, 2015).

198 Our results regarding the contamination evaluation due to *S. aureus* in rabbit carcass surface correlate to  
199 previous studies performed to establish the surface and sampling method (Garduño *et al.*, 2015;  
200 Rodríguez *et al.*, 2015), where the surface that should be sampled in domestic animals is 5 cm<sup>2</sup> and 10  
201 cm<sup>2</sup> according to the animal size. Regarding rabbit carcasses, regulations do not specify an equivalent  
202 surface for sampling (USDA, 1996; Commission Decision, 2001).

203 *S. aureus* contamination in rabbit carcass surface might represent a risk for public health when related to  
204 food intoxications (OMS and FAO, 2009). In addition, the emergency of transmission of *S. aureus*  
205 methicillin resistant strains from animals to humans represent a worldwide risk Ortega, *et al.*, 2009).

206 Even though the biotype methodology is not new, it may provide an approximation to the contamination  
207 source of the carcass, which could indirectly reflect the environmental conditions of the farm from which

208 the rabbits proceed. Therefore, the *Staphylococcus aureus* biotypes identified were A, C, E and NE in  
209 association to high surface contamination of rabbit carcasses from commercial abattoirs, which may  
210 presumably be associated to ecovars related with humans and production animals.

211

212

#### 213 References

- 214 1. Adegoke, G.O., Devriese, L.A., Godard, C., Fleurette, J., Brun, Y. and Ojo M.O., 1983.  
215 Biotypes, serotypes and phage types of caprine strains of *Staphylococcus aureus*. Zentralblatt für  
216 Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene A, 255, 234-8.
- 217 2. Bar-Gal, G.K., Blum, S.E., Hadas, L., Ehrlich, R., Monecke, S. and Leitner, G., 2015. Host-  
218 specificity of *Staphylococcus aureus* causing intramammary infections in dairy animals assessed  
219 by genotyping and virulence genes. Veterinary Microbiology, 176, 143-54.
- 220 3. Boerlin, P., Kuhnert, P., Hüsey, D. and Schaeffli, M., 2003. Methods for identification of  
221 *Staphylococcus aureus* isolates in cases of bovine mastitis. Journal of Clinical Microbiology, 41,  
222 767-771.
- 223 4. Cohen G., 1977. Microorganismos y Biología molecular. Omega, 2nd ed.,  
224 España).
- 225 5. Commission Decision of June 8, 2001. 2001/414/EC. Official Journal of the European  
226 Communities, L 165, 48-53.
- 227 6. Cottral, G. E., 1978. Manual of standardized methods for veterinary microbiology. (Cornell  
228 University Press, USA).
- 229 7. Devriese, L.A. and Fleurette, J., 1975. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus*  
230 *aureus* in dairy herds. Research in Veterinary Science, 19, 23-27.
- 231 8. Devriese, L.A., Godard, C., Okerman, L. and Renault, L., 1981. Characteristics of  
232 *Staphylococcus aureus* strains from rabbits. Annales de Recherches Vétérinaires, 12, 327-332.
- 233 9. Devriese, L.A., 1984. A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated  
234 from different animal species. Journal of Applied Bacteriology, 56, 215-220.
- 235 10. Devriese, L.A., 1990. *Staphylococci* in healthy and diseased animals. Journal of Applied  
236 Bacteriology, 71S-80S.

- 237 11. FAO, 2003. El sistema codex: FAO y la OMS. Sistema codex alimentarius.  
238 <http://www.fao.org/docrep/w9114s04.htm> (August 20, 2015).
- 239 12. Farshad, F.M.D., Finucane, M.M., Goodarz, M., Pamela, M., Pelizzari, ScB., Melanie, J.C.,  
240 Paciorek, J.C., Gitanjali, M.S., Lin, J.K. and Stevens, G.A., 2011. On behalf of the Global  
241 Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Cholesterol).  
242 National, regional, and global trends in serum total cholesterol since 1980: systematic analysis of  
243 health examination surveys and epidemiological studies with 321 country-years and 3.0 million  
244 participants. *The Lancet*, 377, 578-586.
- 245 13. Frañdez, Z.G., Navarrete, W.P., Caro, C.M. and Troncoso, M., 2002. Portación de  
246 *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicos en manipuladores de alimentos. *Revista Médica de*  
247 *Chile*, 130, 859-894.
- 248 14. Garduño-Guadarrama, V.M., Velázquez-Ordoñez V., Alonso-Fresán, M.U., Zamora-Espinosa,  
249 J.L., Talavera-Rojas M., Domínguez-Vara, I.A. and Mendoza-Pérez J., 2015. Non destructive  
250 standardised method to determine bacterial contamination of *Staphylococcus aureus* in rabbit  
251 carcasses. *World Rabbit Science*, 23, 76.
- 252 15. Hájek, V. and Marsalek, E., 1971. The differentiation of pathogenic staphylococci and a  
253 suggestion for their taxonomic classification. *Zentralblatt, für Bakteriologie, Parasitenkunde,*  
254 *Infektion skrankheiten und Hygiene*, 171, 177-182.
- 255 16. Isigidi, B.K., Devriese, L.A., Godard, C., Van Hoof, J., 1990. Characteristics of *Staphylococcus*  
256 *aureus* associated with meat products and meat workers. *Letters in Applied Microbiology* 1, 145-  
257 147.
- 258 17. Isigidi, B.K., Devriese, L.A., Godard, C., Van Hoof, J., 1992. Enterotoxin  
259 production in different *Staphylococcus aureus* biotypes isolated from food and meat plants.  
260 *Journal of Applied Bacteriology*, 72, 16-20.
- 261 18. Jaramillo, A.C.J., Martínez, M.J.J., 2010. *Epidemiología Veterinaria. (Manual Moderno, 5ta ed.*  
262 *México)*
- 263 19. Leonard, F.C., Markey, B.K., 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: A  
264 review. *The Veterinary Journal*, 175, 27-36.
- 265 20. Manjarrez, L.A.M., Díaz, Z.S., Salazar, G.F., Valladares, C.B., Gutiérrez, C.A., Barbabosa, P.A.,  
266 Talavera, R.M., Alonso, F.M.U., Velázquez O.V., 2012. Identificación de biotipos de

- 267            *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras de producción familiar con mastitis subclínica en la  
268            región centro-este del Estado de México. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, 3, 265-274.
- 269        21. MAP-SOIC., 2004. Manual de Procedimientos para Muestreo Microbiológico en  
270            Establecimientos Certificados. Departamento de Productos Cárnicos y Mataderos. Sistema  
271            Oficial de Inspección de Carnes. Dirección de Inocuidad de los Alimentos. Gobierno de  
272            Guatemala.
- 273        22. Menes, I., Garcia, M.L., Moreno, B., Gutierrez, L., Polledo., 1984 Staphylococci isolated from  
274            abscesses in slaughtered animals: characterization and epidemiological studies. Zentralblatt für  
275            Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene B, 178, 551-61.
- 276        23. Missouhou, A., Mbodj, M., Zanga, D., Niang, S., Sylla, K.S.B., Seydi, M., Cissé, O. Seck, S.W.,  
277            2011. Analysis of microbiological and chemical quality of poultry meat in the vicinity of the  
278            Mbeubeuss landfill in Mali (Senegal). Tropical Animal Health and Production, 43, 983-988.
- 279        24. Norma Oficial Mexicana NOMI09-SSA1-1994. Diario Oficial de la Federación. Bienes y  
280            Servicios. Procedimientos para la toma, Manejo y Transporte de Muestras de Alimentos para su  
281            Análisis Microbiológico. México.
- 282        25. Norma Oficial Mexicana NOMI10-SSA1-1994. Diario Oficial de la Federación. Bienes y  
283            Servicios. Preparación y Distribución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.  
284            México.
- 285        26. Norma Oficial Mexicana NOMI15-SSA1-1994. Diario Oficial de la Federación. Bienes y  
286            Servicios. Métodos para la Determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos, México.
- 287        27. OEIDRUSBC., 2009. Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable, Baja  
288            California. Estudio sobre cunicultura en el Estado de Baja California, México, con datos  
289            estimados de la FAO y SENASA.
- 290        28. Omega, R., Deighton, M., Capstick, J., Gerraty N., 1999. Molecular typing of *Staphylococcus*  
291            *aureus* of bovine origin by polymorphisms of the coagulase gene. Veterinary Microbiology, 66,  
292            275-84.
- 293        29. OMS., 1999. Organización Mundial de la salud. Salud para todos en el siglo XXI. Madrid:  
294            Ministerio de Salud y Consumo.
- 295

- 296 30. OMS and FAO., 2009. Organización Mundial de la Salud. Organización de las Naciones Unidas  
297 para la Agricultura y la Alimentación. Codex Alimentarius. Producción de alimentos de origen  
298 animal. Segunda edición, Roma.
- 299 31. Ortega, C., Simón, M.C., Alonso, J.L. and Mateo A., 2009. Caracterización y riesgos para la  
300 salud pública de la antibiorresistencia de *Staphylococcus aureus* en la cunicultura intensiva.  
301 Revue scientifique et technique. International Office of Epizootics. 28, 1119-1128.
- 302 32. Pastrana, H.I. 2002. El Sacrificio y Procesamiento del Conejo Para el Autoconsumo.  
303 Universidad de Puerto Rico. Recinto Universitario de Mayagüez. Colegio de Ciencias Agrícolas.  
304 Departamento de Industrias Pecuarias. Servicio de Extensión Agrícola.
- 305 33. Rodríguez-Correa, J.L., Velázquez-Ordoñez,V., Valladares-Carranza, B., Talavera-Rojas, M.,  
306 Zamora-Espinosa, J.L., Alonso-Fresán M.U., Díaz González-Borja, A.E., García-Gama, A.M.,  
307 2015. *Staphylococcus aureus* contamination evaluation of rabbit carcasses (*Oryctolagus*  
308 *cuniculus*) through whashing and superficial sampling. World Rabbit Science, 23, 76-77.
- 309 34. SENASICA., 2010. Diario Oficial de la Federación. Programa de Reducción de Patógenos.  
310 Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Secretaria de Agricultura,  
311 Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México.
- 312 35. Shimizu, A., Kawano, J. And Kimura, T. 2007. Biotyping of Coagulase-Positive *Staphylococcus*  
313 *aureus* and *Staphylococcus intermedius* strains Isolated from Various Animals in Japan. Journal  
314 of Veterinary Science, 88, 207-215.
- 315 36. United States Department of Agriculture (USDA). 1996. Pathogen Reduction; Hazard Analysis  
316 and Critical Control Point (HACCP) Systems; Final Rule. Food Safety Inspection Service  
317 (FSIS), 61, 38926-38938.
- 318 37. Velázquez, O.V., Saltijeral, J.O., Alonso, F.M.U., Lagunas, B.S., Enriquez, E., 2004.  
319 Phenotypical expression of *Staphylococcus aureus* virulence factors isolated from dairy cows  
320 with subclinical mastitis. International Society for Animal Hygiene. Saint-Malo, France, 1, 397-  
321 398.
- 322 38. Velázquez, O.V., Alonso, F.M.U., Lagunas, B.S., Díaz, Z.S., Gutiérrez, C.A., Monroy, S.H.,  
323 Mendoza, B.J., 2008. Microbial contamination levels in rabbit carcasses obtained from popular  
324 markets in Toluca valley, Mexico. Meat Quality and Safety. 9th World Rabbit Congress Verona  
325 – Italy. Pp. 1455-1460.



- 326 39. Velázquez, MME., Margarita, H.S.M., Contreras, C.J.F., Pérez, C.P. and Villarreal, T.L., 2013.  
327 Surveillance of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Causing Nosocomial Infections in  
328 Five Medical Centers of Monterrey, Nuevo León, México from 2005–2009. Archives of Medical  
329 Research, 44, 570-574.
- 330 40. Yasser, H., Al-Tarazi, Albetar, M.A and Alaboudi, A.R., 2009. Biotyping and enterotoxigenicity  
331 of Staphylococci isolated from fresh and frozen meat marketed in Jordan. Food Research  
332 International, 42, 374-379.

EXAMPLE

**Table 1.** Sample size, proportion and number of *S. aureus* isolations per abattoir.

Abattoir	Annual Sacrifice	No and % of sample		<i>S. aureus</i> Isolations	
				No.	%
A	19,200	45	21%	28	62.22%
B	31,200	74	34%	42	56.75%
C	42,000	98	45%	51	52.04%
Total	92,400	217	100%	121	57.76%

**Table 2.** *Staphylococcus aureus* contamination levels in rabbit carcass surface sampled in commercial abattoirs.

Abattoir	N	Total count in surface / No. CFU/cm <sup>2</sup>	
		Average	± Standard deviation
A	28	148168.89 <sup>a</sup>	± 43188.171
B	42	165678.38 <sup>b</sup>	± 25129.382
C	51	133783.67 <sup>a</sup>	± 39301.790
Total	121	147643.32	± 38544.344

*Different letters per column show significant statistical differences (P<0.05).*

**Table 3.** *Staphylococcus aureus* biotype distribution in carcasses sampled in rabbit abattoirs.

Biotype	Presumptive Origin	Number of <i>S. aureus</i> isolations	Abattoir			% of Isolations	<i>S. aureus</i> Isolation average
			A	r B	r C		
A	Human	94	21	36	37	77.68	31.33 <sup>a</sup>
C	Bovine/Ovine	11	3	4	4	9.09	3.66 <sup>b</sup>
E	Canine/Equine	2	2	0	0	1.65	0.66 <sup>b</sup>
NE	Non specific	14	2	2	10	11.57	4.66 <sup>b</sup>
Total		121	28	42	51	100	

*Different letters per column show significant statistical differences (P<0.05).*

EXAMPLE

ABSTRACTS OF THE 5<sup>TH</sup> AMERICAN RABBIT CONGRESS

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO, SEPTEMBER 8-11, 2014

**NON DESTRUCTIVE STANDARDISED METHOD TO DETERMINE BACTERIAL CONTAMINATION BY *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN RABBIT CARCASSES**

GARDUÑO-GUADARRAMA V.<sup>\*</sup>, VELAZQUEZ-ORDÓÑEZ V.<sup>†</sup>, ALONSO-FRESAN M.U.<sup>‡</sup>, ZAMORA-ESPINOSA J.L.<sup>‡</sup>, TALAVERA-ROJAS M.<sup>‡</sup>, DOMÍNGUEZ-VARA I.A.<sup>§</sup>, MENDOZA-BECERRIL J.<sup>§</sup>

<sup>\*</sup>Programa de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales – UAEM. Área salud animal. Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal. Km 15.5, carretera Toluca-Atzacmulco, Estado de México. <sup>†</sup>CIESA. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma del Estado de México. Cuerpo Académico en Salud Animal (UAEM-CA-3 Salud Animal). <sup>‡</sup>CIESA. FMVZ. UAEM. <sup>§</sup>FMVZ. UAEM. El Cerrillo, Piedras Blancas, México.

muaf@uaemex.mx

Rabbit meat is increasingly consumed worldwide, regardless of its microbial counts. There is no specific method to determine the microbial count in rabbit carcasses. This is the main reason for developing a non destructive surface sampling, taking into consideration the sampling method for large species to determine microbial counts for *Staphylococcus aureus*. Fifteen rabbit carcasses were sampled, taking a different surface sample per group (5 rabbits/group). Wet swabs with peptone water were scrubbed in different regions: R1 in the thigh, R2 in the back, R3 in the ribs and R4 in the shoulder (1 rabbit per region). The 4 regions were sampled in 1 rabbit from each group. The surface sampled for Group 1 was 2.5×2,5 cm; Group 2, 5×5 cm and Group 3, 10×10 cm. Serial decimal dilutions were made and cultured in Baird Parker Agar for *Staphylococcus aureus* growth. The best surface for sampling was the smallest. *S. aureus* CFU/cm<sup>2</sup> in the samples exceeding the national and international maximum limits, representing a hygiene alert due to possible *S. aureus* strain dissemination.

12.3. Participación en la obra Investigación en la Cunicultura de las Américas. Rabbitry Research in the Americas. Publicada por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Campus “El cerrillo”, UAEM y La Rama Americana de la Asociación Mundial de Cunicultura, AB- WRSA, American Branch of the World Rabbit Science Association. 1ª. Edición, 2015



V CONGRESO AMERICANO DE CUNICULTURA, MÉXICO 2014  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Asociación Científica Mundial de Cunicultura – Rama Americana  
Secretaría de Desarrollo Agropecuario del Gobierno del Estado de México, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología

**NON DESTRUCTIVE STANDARIZED METHOD TO DETERMINE  
BACTERIAL CONTAMINATION BY *Staphylococcus aureus*  
IN RABBIT CARCASSES**

GARDUÑO-GUADARRAMA V.<sup>1</sup>, VELÁZQUEZ-ORDOÑEZ V.<sup>2</sup>,  
ALONSO-FRESÁN M.U.<sup>2\*</sup>, ZAMORA-ESPINOSA J.L.<sup>2</sup>, TALAVERA-ROJAS M.<sup>3</sup>,  
DOMÍNGUEZ-VARA I.A.<sup>4</sup>, MENDOZA-BECERRIL J.<sup>4</sup>.

1.-Programa de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales – UAEM. Área salud animal. Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal. Km 15.5 carretera Toluca-Atlaconulco, Estado de México.

2.-CIESA. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma del Estado de México. Cuerpo Académico en Salud Animal (UAEM-CA-3 Salud Animal).

3.-CIESA. FMVZ. UAEM. <sup>4</sup> FMVZ. UAEM. El Cerrillo Piedras Blancas, México.

\*Corresponding author: [muaf@uaemex.mx](mailto:muaf@uaemex.mx)

**ABSTRACT**

Rabbit's meat is increasingly consumed worldwide, regardless of its microbial counts. There is not an specific method to determine the microbial count in rabbit carcasses. This is the main reason for developing a non destructive surface sampling, taking into consideration the sampling method for big species to determine microbial counts for *Staphylococcus aureus*. Fifteen rabbit carcasses were sampled, taking a different surface sample per group (five rabbits per group). Wet swabs with peptone water were scrubbed in different regions: R1 in the thigh, R2 in the back, R3 in the ribs and R4 in the shoulder (one rabbit per region). The four regions were sampled in one rabbit from each group. The surface sampled for Group 1 was 2.5 X 2,5 cm; Group 2, 5 X 5cm and Group 3, 10 X 10cm. Serial decimal dilutions were made and cultured in Baird Parker Agar for *Staphylococcus aureus* growth. The best surface for sampling was the smallest. *S. aureus* CFU/cm<sup>2</sup> in the samples exceed the national and international maximum limits, representing a hygiene alert due to possible *S. aureus* strain dissemination.

**Key words:** surface sampling, non destructive method, *Staphylococcus aureus*, rabbit carcass, CFU/cm<sup>2</sup>.

332



### Introduction

Over the years, it has been undoubtable the people's interest on achieving and maintaining a healthy life according to today's needs and demands, through the implementation of optimal diet strategies directed towards disease prevention. Therefore, it has been necessary to look for new food sources, as well as screening their microbiological quality. Meat is one of the main foods providing nutrients such as proteins, lipids and vitamins amongst others. Nevertheless, there are controversies nowadays regarding its nutritional role, due to the fact that consumers consider that high ingestion is correlated with health problems, including obesity and cardiovascular diseases, therefore reducing its consumption (Schönfeldt and Gibson, 2008). This is the reason why people tend to modify their lifestyle by exploring new healthy diet habits, in which rabbit meat (*Oryctolagus cuniculus*), stands out as a nutritious and healthy election (Hu and Willett, 2002; Hernández, 2008; Hernández and Dalle, 2010; Simonová *et al.*, 2010). Nevertheless, there has not been developed specific sampling methods to determine its bacterial load without affecting the carcass presentation quality. Several pathogens which could be present in raw meat might as well contaminate the workers' hands during processing and handling of the meat, with posterior transmission to other food, equipment and other workers as well (Rodríguez, 2002). To guarantee the microbiological quality of rabbit's meat, a screening program should be followed, in compliance with microbiological criteria which could demonstrate that the implemented measures for quality assurance in meat maintains an adequate control of microorganisms.

333

### Material and Methods

Fifteen rabbit carcasses were randomly selected in a slaughterhouse in Toluca Valley to carry out surface sampling using different area templates. Baird Parker medium was prepared as established in NOM-115-SSA1-1994, (DOF, 1995a). In the same way, peptone water was prepared, which was used as moisturizing solution for the swabs used when sampling (10 mL per sample), from which different dilutions were prepared according to NOM-110-SSA1-1994, (DOF, 1995b).







**UAEM** Universidad Autónoma  
del Estado de México

**V CONGRESO AMERICANO DE CUNICULTURA, MÉXICO 2014**

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Asociación Científica Mundial de Cunicultura – Rama Americana  
Secretaría de Desarrollo Agropecuario del Gobierno del Estado de México, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural,  
Pesca y Alimentación, Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología

Samples were taken from different carcass regions: thigh, back, ribs and shoulder (one rabbit per region) according to the European Union approved method (European Directive 2001/471/EC) (U.E., 2001). This sampling technique was performed in three groups with 5 rabbits each, limiting the sampling surface area per group. In the first one, a surface area of 2.5 X 2.5 cm was sampled, rubbing this area in a different region per rabbit: R1 in the thigh, R2 in the back, R3 in the ribs and R4 in the shoulder. In the fifth rabbit the sample was taken by rubbing the same area in the four regions. This same procedure was followed for the other two groups with the difference of sampling surface in group 2 (5 X 5 cm) and group three (10 X 10 cm). Serial decimal dilutions were performed in accordance to NOM-115-SSA1-1994, (DOF, 1995a), from which 0.1mL of each dilution was cultured in Baird Parker agar, which was distributed using a 90° sterile glass rod. Plates were incubated at 35°C for 48 hours to determine CFU counts in the carcasses. Results were analyzed using variance analysis ( $P<0.05$ ) in a random block experimental design using Megastat for Microsoft office Excel 2007.

334



### Results and Discussion

In Table 1 the microbial contamination is shown at the last dilution where CFU could be counted. Calculation for CFU/cm<sup>2</sup>, was obtained according to the formula:  $N_s = (N * F / A) * D$  established by (MAP-SOIC, 2004).

Sampled Surface	Region	Rabbit	CFU (1 X 10 <sup>-4</sup> )	CFU/cm <sup>2</sup>
2.5 X 2.5 cm	1	1	20000	320000
	2	2	40000	640000
	3	3	30000	480000
	4	4	60000	780000
	1+2+3+4	5	130000	520000
5 X 5 cm	1	6	20000	80000
	2	7	10000	40000
	3	8	40000	160000
	4	9	30000	120000
	1+2+3+4	10	90000	90000
10 X 10 cm	1	11	20000	20000
	2	12	30000	3000
	3	13	70000	70000
	4	14	70000	70000
	1+2+3+4	15	160000	40000

335

The microbial contamination found in all regions and sampled surfaces were different ( $P < 0.05$ ), with the highest numbers probably representing the zones with more exposure to the environment or handling. Nevertheless, regarding the sampling template, the most suitable one was 2.5 X 2.5 cm, because of the rabbit's size. There were some handling problems when sampling with the 5 X 5 cm template, and the 10 X 10 cm template was simply too big for the rabbit carcass. There may have been more sampling errors when using the mid-size or biggest one, and less when using the smallest. A previous study in which microbial load in popular markets was performed, only 1 cm<sup>2</sup> was sampled from the right dorsal region of the carcass, finding 36% of the carcasses contaminated with *S. aureus* (Velázquez *et al.*, 2008). Based on our results, there is a high prevalence of *Staphylococcus aureus* on the rabbit's carcass surface. Mexican legislation



establishes a minimal detection count of 100 CFU/g for solid foods or 10 CFU/mL for liquid ones. Nevertheless, the maximum limits per cm<sup>2</sup> have not been established, but when comparing our results with the limits stated in different international legislations they are above 10<sup>6</sup> CFU/g in food according to Mexican legislation (DOF, 1995a), 10<sup>3</sup> UFC/g according to Venezuelan legislation (MSAS, 1996) and 10<sup>5</sup> CFU/g according to Northamerican legislation (Jablonkin y Bohach, 2001). Heinz and Hautzinger (2007) recommendations for microbiological criteria in fresh meat (total plate counts/cm<sup>2</sup>) are: good with less than 10000, critical between 10000 and 100000 and not acceptable with more than 100000. The microbiological counts found in this study might have resulted from rabbit carcass mishandling, representing a potential public health risk if the strains are capable of producing toxins. *S. aureus* can be present in the slaughterhouse's environment or may reach the carcass via cross contamination (USDA, 2005).

336

### Conclusions

Based on these results, it can be inferred that the surface method used for the analysis of big species carcasses can be used for small ones, such as the rabbit carcass, with slight modifications according to surface sampling, concluding that the most suitable one for rabbit carcasses is 2.5 X 2.5 cm. The other two are discarded due to the small surface area of the whole rabbit.

These results do not imply health risk regarding rabbit meat consumption, due to the microorganisms' elimination when cooked, but it rises a sanitary alert because of the possible *S. aureus* strain dissemination regarding the carcasses handling in different distribution points.

### References

- DOF. 1995a: Diario Oficial de la Federación. Publicación de la Norma Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la Determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos, México.





V CONGRESO AMERICANO DE CUNICULTURA, MÉXICO 2014

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Asociación Científica Mundial de Cunicultura – Rama Americana
Secretaría de Desarrollo Agropecuario del Gobierno del Estado de México, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología

- DOF. 1995b: Diario Oficial de la Federación. Publicación de la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico. México.
• Heinz, G. and Hautzinger, P. 2007. Meat processing technology for small-to medium-scale producers. FAO. Bangkok.
• Hernández, P. 2008. Enhancement of nutritional quality and safety in rabbit meat. In: Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy. p. 1287-1299.
• Hernández, P. and A. Dalle Z. 2010. Influence of diet on rabbit meat quality. In: C. De Blas and J. Wiseman (Eds). Nutrition of the rabbit. 2nd edition. CPI Antony Rowe Ltd. p. 163-178.
• Hu, F. B. and Willett W. C. 2002. Optimal diets for prevention of coronary heart disease. J. American Med. Assoc., 288 (3), 2569-2578.
• Jablonskin L.M. and Bohach G.A. 2001: "Staphylococcus aureus" In: Doyle M. Beuchat. L.R. & Montville T.J. (Eds.) Food Microbiology Fundamentals & Frontiers. ASM. USA: 411-434.
• MAP-SOIC. 2004: Manual de Procedimientos para Muestreo Microbiológico en Establecimientos Certificados. Departamento de Productos Cárnicos y Mataderos. Sistema Oficial de Inspección de Carnes. Dirección de Inocuidad de los Alimentos. Gobierno de Guatemala.
• MSAS. 1996: Ministerio de Sanidad y Asistencia Social. Buenas prácticas de fabricación, almacenamiento y transporte de alimentos para consumo humano. Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, Gaceta Oficial de la República de Venezuela N° 36.081. Caracas, Venezuela.
• Schönfeldt, H. and Gibson N. 2008: Changes in thenutrient quality of meat in an obesity context. Meat Sci, 80 (1), 20-27.
• Simonová, M., Chrastinová L., Mojto J., Lauková A., Szabóová R. and Rafay J. 2010: Quality of rabbit meat and phyto-additives. Czech J. Food Sci, 28 (3), 161-167.



Congreso Americano de Cunicultura



**V CONGRESO AMERICANO DE CUNICULTURA, MÉXICO 2014**

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Asociación Científica Mundial de Cunicultura – Rama Americana  
Secretaría de Desarrollo Agropecuario del Gobierno del Estado de México, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural,  
Pesca y Alimentación, Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología

- Rodríguez P. H. 2002: El Sacrificio y Procesamiento del Conejo Para el Autoconsumo. Departamento de Industrias Pecuarias. Recinto Universitario de Mayagüez. Servicio de Extensión Agrícola. Universidad de Puerto Rico.
- U.E., 2001: Unión European Directive 2001/471/EC. Reglamentos del Consejo y Parlamento de la Unión Europea 178/2002, 882/2004, 852/2004, 853/2004, 854/2004, 2073/2005 y Directivas 2002/99 y 2004/41; por los que se establecen la nueva normativa relativa en materia de higiene de los alimentos de origen animal denominada “Paquete de Higiene”.
- USDA.2005. Meat and poultry hazards and controls guide. Food Safety and Inspection Service. USA.
- Velázquez OV, Alonso FMU, Lagunas BS, Díaz ZS, Gutiérrez CA, Monroy SH, Mendoza BJ. 2008. Microbial contamination levels in rabbit carcasses obtained from popular markets in Toluca Valley. PROCEEDINGS OF THE 9th WORLD RABBIT CONGRESS. ITALY.

338



## 12.4. Participación en XVII Congreso internacional Inocuidad de Alimentos y XXXII Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos México 2015



### UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías  
División de Ciencias Básicas / Departamento de Farmacobiología  
XVII Congreso Internacional sobre Inocuidad de Alimentos  
XXXII Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos

OF/CUCEI/DV.CS.BS./FARM/LMSI/080/2015

**Estimado(a) s:** Garduño Guadarrama, V.M., Velázquez Ordoñez, V., Valladares Carranza, B., Alonso Fresán, M.U., Talavera Rojas, M. y Rodríguez Correa, J.L.

Por este conducto comunicamos a Ustedes que su trabajo “**Estimación de la contaminación por *Staphylococcus aureus* en superficie de canales de conejos en un rastro comercial.**” ha sido aceptado para presentarse en la modalidad de **ORAL** dentro del programa de actividades del XVII Congreso Internacional Inocuidad de Alimentos y de la XXXII Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos, a celebrarse los días 5, 6 y 7 de Noviembre de 2015 en Nuevo Vallarta, Nayarit, México.

La fecha y hora de su presentación serán enviadas al autor y publicadas en el programa, que estará disponible a partir del 20 de Octubre de 2015 en la página <http://inocuidad.cucei.udg.mx/>

En caso de que el autor designado para presentar el trabajo no pueda asistir al evento, deberán notificar al Comité Científico Editorial al menos tres semanas antes; si los autores no asisten a su presentación, el Comité Científico Editorial se reservará el derecho de aceptar sus resúmenes en el evento del próximo año.

Sin otro particular y agradeciendo su participación en este evento, les reiteramos que la dirección electrónica [inocuidad.resumenes@yahoo.com.mx](mailto:inocuidad.resumenes@yahoo.com.mx) se encuentra a sus órdenes para cualquier información adicional.

**A T E N T A M E N T E**  
Guadalajara, Jal., 18 de agosto de 2015

Mtra. Laura O. Orozco Hernández  
Coordinadora del Comité Científico Editorial  
XVII Congreso Internacional Inocuidad de Alimentos  
XXXII Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos

C.c.p.- archivo

Blvd. Marcelino García Barragán N° 1421, esq. Calzada Olímpica, C.P. 44430, Guadalajara, Jal., México  
Tel. y fax: (33) 1378 5900 ext. 7526  
[www.cucei.udg.mx](http://www.cucei.udg.mx)

## 12.5. Participación en LI Reunión Nacional de Investigación Pecuaria México 2015

### Confirmación de envío de resumen a la Reunión Nacional Pecuaria 2015

---

Se ha recibido el archivo de resumen y ha sido registrado, en nuestra base de datos con la siguiente información:

**Folio:**

3295

**Archivo:**

RESUMEN PARA REUNIÓN NACIONAL PECUARIA 2015.docx

**Título:**

IDENTIFICACIÓN DE BIOTIPOS Y NIVEL DE CONTAMINACIÓN POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN CANALES DE CONEJOS PARA ABASTO EN RASTROS COMERCIALES DEL ESTADO DE MÉXICO

**Sistema Producto:**

Otros

**Sección:**

Inocuidad de alimentos

**Tipo presentación:**

Cartel

**Autores:**

VICTOR MANUEL GARDUÑO GUADARRAMA » UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

VALENTE VELAZQUEZ ORDOÑES » UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

MARIA UXUA ALONSO FRESAN » UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

MARTÍN TALAVERA ROJAS » UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

BENJAMÍN VALLADARES CARRANZA » UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

SALVADOR LAGUNAS BERNABE » UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

JESÚS VÁZQUEZ NAVARRETE » CENID MICROBIOLOGIA INIFAP

JORGE ANTONIO VARELA GUERRERO » UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

**Estado:**

ESTADO DE MEXICO

**Institución:**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

**Correo:**

mvzoficial@live.com

Nota: Se adjunta archivo registrado, mismo que será validado por el comité organizador

## 13. ANEXOS TÉCNICOS

### ANEXO A. Método de McFarland 0.5

1. Agregar .5mL de 0.048 mol/L de  $\text{BaCl}_2$  (1.175% w/v  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) a 99.5 mL de 0.18 mol/L de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1% v/v), en constante agitación hasta obtener una suspensión.
2. Verificar la correcta densidad de la turbidez mediante la medición de la absorbancia en un espectrofotómetro. La absorbancia a 625nm debería de ser 0.08 a 0.13 para el estándar de McFarland.
3. Transferir la suspensión de sulfato de bario en alícuotas de 4 a 6 mL.
4. Guardar los tubos en un lugar oscuro a temperatura ambiente.
5. Antes de cada uso mezcla vigorosamente la solución.
6. Verificar cada mes la densidad.
7. Duración máxima recomendable seis meses.

**ANEXO B. Extracción de ADN para PCR tiempo real con el kit Insta Gene™ Matrix (Bio-Rad). Catálogo 732-6030.**

1. Añadir en un microbial 50 µl de Insta Gene.
2. Seleccionar algunas bacterias bien identificadas de crecimiento fresco y colocar en el microbial con los 50 µl de Insta Gene.
3. Colocar en vortex por un periodo de 5 segundos el microbial en mención.
4. Calentar el microbial en baño María a una temperatura de 56° C. por un tiempo de 15 a 30 minutos.
5. Colocar nuevamente en vortex el microbial por 10 segundos.
6. Calentar nuevamente el microbial en baño María a una temperatura de 100° C. por un tiempo de 8 minutos.
7. Colocar nuevamente en vortex el microbial por 5 segundos.
8. Realizar un centrifugado a 12,000 revoluciones por minuto, por un tiempo de 5 minutos.
9. Finalmente se extrae el ADN, teniendo cuidado de no tocar el pellet que se queda en la parte inferior del microbial.

## **ANEXO C. Cuestionario para la evaluación de riesgos en rastros**

1. ¿Cuál es la ubicación del rastro?

Urbano (3) Suburbano (2) Rural (2)

2. ¿Las instalaciones del rastro están cercadas en la periferia?

Sí (1) No (3)

3. ¿Qué tipo de acceso hay al rastro?

Camino pavimentado (1) Camino de terracería (2) Otro (2)

4. ¿Cuenta con área de arribo de animales?

Sí (1) No (2)

5. ¿Cuenta con jaulas de descanso?

Sí (1) No (3)

6. ¿Cuenta con jaulas para animales en observación?

Sí (1) No (3)

7. ¿Realiza la inspección ante-mortem?

Sí (2) No (5)

8. ¿Quién realiza la inspección sanitaria?

MVRATIF (1) Inspector sanitario (3) No existe inspección sanitaria (5) Médico veterinario (2)

9. ¿El rastro cuenta con exámenes clínicos a personal?

Sí (1) No (3)

10. Método de sacrificio:

Insensibilizador eléctrico (1) Mecánico por concusión (2) Dislocación del cuello (4)



11. ¿Se cuenta con rieles para el manejo de las canales?

Sí (1) No (5)

12. ¿Se realiza el faenado aéreo?

Sí (1) No (5)

13. Destino de la sangre: Se destina a algún proceso:

Sí (1) No (3)

14. ¿Se produce harina de sangre?

Sí (1) No (2)

15. ¿Cómo se separa la piel?

Mecánicamente (1) Manualmente (3)

16. ¿Existen esterilizadores de cuchillos?

Sí (1) No (3)

17. ¿Se capacita al personal para realizar su trabajo?

Sí (2) No (5)

18. ¿En qué se depositan las vísceras?

Carretillas, carretones, carritos para vísceras, carritos de acero inoxidable, carros riñón, carros transportadores, charolas, equipo adecuado, equipos automáticos, canaleja y recibidor, canastillas, cuarto para vísceras y cuarto frío (1)

Botes de plástico, botes y perchas, cajas de plástico, cestas de plástico, cubetas, depósitos de plástico, dispositivos, recipientes plásticos, utensilios plásticos, contenedores (2)

Lavaderos, bancos de concreto, mesas, pilas, piletas, plancha, tambos, tanques, tarimas, tarjas, tinas, tolvas, anaqueles, bidones, taras, bolsas, botes y javas (3)

Ganchos o perchas (4)

Piso, suelo, basura o no hay depósitos (5)

19. ¿Existen salas separadas para el manejo de vísceras?

Sí (1) No (4)

20. ¿Se identifican las vísceras de cada canal?

Sí (1) No (4)

21. ¿Existe registros de los decomisos?

Sí (1) No (2)

22. ¿Cuenta con análisis bacteriológicos y fisicoquímicos del agua?

Sí (1) No (3)

23. ¿El personal cuenta con vestimenta de trabajo?

Sí (1) No (4)

24. ¿Se cuenta con incineradores?

Sí (1) No (4)

25. ¿Cuenta con planta de rendimiento?

Sí (1) No (3)

26. ¿Existe fosa de sedimentación?

Sí (1) No (4)

27. ¿Cuál es el destino de las vísceras y canales decomisadas?

Se incineran o planta de rendimiento Sí (1) No (4)

28. ¿Se lavan las canales después de remover la piel?

Sí (1) No (5)

29. ¿El agua que se utiliza es potable?

Sí (1) No (5)

Procede de: Red pública (1) Pozo (2) Otra (2)

30. ¿Las aguas residuales se vierten en?

Drenaje público (4) Tanque de tratamiento de aguas (1) Canales o arroyos (5)

Otros (4)

31. ¿Existe cámara de refrigeración de canales?

Sí (1) No (5)

32. ¿Cuenta con programa de trazabilidad de productos?

Sí (1) No (5)

Como resultado general de la metodología de evaluación semicuantitativa de riesgos, se obtiene que la mayor calificación (mayor riesgo sanitario) que podría obtener un rastro sea de 123 puntos, mientras que el menor (menor riesgo sanitario) sería de 36.

Por lo tanto, el riesgo sanitario de los rastros queda de la siguiente forma:

Entre 36 y 57 puntos Riesgo Sanitario Bajo.

Entre 58 y 80 puntos de Riesgo Sanitario Medio.

Entre 81 y 103 puntos de Riesgo Sanitario Alto.

Entre 104 y 123 puntos de riesgo Sanitario muy Alto.