



**Facultad de Ciencias Veterinarias
-UNCPBA-**

**Detección de bacterias patógenas productoras de
Enfermedades Transmitidas por Alimentos en
carne aviar.**

Silva Julia; Recavarren Mariana; Williams Karen

Diciembre, 2015

Tandil

Detección de bacterias patógenas productoras de Enfermedades Transmitidas por Alimentos en carne aviar.

Tesis de la Licenciatura en Tecnología de los Alimentos presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado de la estudiante: Silva Julia

Directora: **Médica Veterinaria, Williams Karen**

Co-directora: **Médica Veterinaria, Recavarren Mariana**

Evaluadora: **Doctora, Krüger Alejandra**

Agradecimientos

Un agradecimiento muy especial a toda mi familia y amigos que me acompañaron en el transcurso de mi carrera.

A mi directora Karen Williams por su dedicación y apoyo durante todo el proceso de realización de esta Tesis.

A mi co-directora Mariana Recavarren y al Instituto de Análisis Fares Taie por brindar su tiempo y espacio, y darme la oportunidad para realizar esta investigación.

A Sandra Médici, Paula Casado y Silvina Quintana por haber compartido sus conocimientos y coordinado el trabajo en el laboratorio.

A la Doctora Mariana Rivero por sus tareas de tutoría, colaboración y por sus aportes en los análisis estadísticos.

A la Doctora Alejandra Krüger por haber evaluado y aprobado esta Tesis.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias, y en particular a los docentes de la Licenciatura en Tecnología de los Alimentos.

Resumen de Tesis

En Argentina, el sector avícola ha incrementado la producción de carne gracias a las transformaciones tecnológicas y a la mejora en la eficiencia productiva. La apertura de los mercados influyó en la reducción de los costos de producción, lo que disminuyó el precio provocando un aumento en el consumo. Este crecimiento en el mercado, generó interés en comercios de diferentes rubros a comercializar pollo entero y sus subproductos, sin el correcto cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) en muchos de los casos. La falta de control a lo largo de toda la cadena alimentaria de un producto, puede acarrear consecuencias a nivel poblacional a través de las Enfermedades Transmisibles por Alimentos (ETA). La correcta aplicación de las BPM no solo garantiza la seguridad sanitaria de los alimentos, sino que además, permite resguardar su calidad nutricional, asegurando a la población una alimentación de calidad inocua y nutritiva. Para realizar este estudio se tomaron muestras provenientes de establecimientos expendedores exclusivos de carne aviar, y de establecimientos mixtos (carnicerías). Se analizó y detectó la presencia de *Salmonella spp.*; *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo y *Escherichia coli* a través de técnicas de cultivo *in vitro*, y por PCR *real time* se realizó la detección de *Escherichia coli* O157, y la presencia del gen que codifica la producción de la toxina Stx2. La información obtenida a partir de este trabajo final, demuestra la urgencia de divulgar y capacitar a la comunidad en general y a los manipuladores en particular, aportando estrategias de prevención y control con el fin de evitar el desarrollo de las ETA.

Palabras clave: Carne aviar; Contaminación cruzada, Enfermedades de Transmisión Alimentaria; Bacterias patógenas.

Índice

1. Introducción.....	1
Buenas Prácticas de Manufactura.....	2
Contaminación Cruzada.....	2
Enfermedades de Transmisión Alimentaria.....	2
Microorganismos en Carne Aviar.....	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	4
<i>Salmonella spp</i>	6
<i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga.....	8
Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real.....	9
2. Antecedentes.....	10
3. Objetivos generales.....	11
3.1 Objetivos específicos.....	11
4. Hipótesis.....	11
5. Marco Legal.....	12
5.1. Código Alimentario Argentino Capítulo VI - Art. 256.....	12
5.2. Código Alimentario Argentino Capítulo II – Art. 12.....	13
5.3. Norma UNE-EN ISO/IEC 17025:05.....	13
5.3.1. Norma ISO 17025:05 - Capítulo 5. Anexo 1. Apartado 5.4.2.....	13
5.3.2 Norma ISO 17025:05 - Capítulo 5.7. Apartado NT-43.....	14
6. Materiales y Métodos.....	15
6.1. Muestras.....	15
6.2. Detección de la presencia <i>Salmonella spp</i>	17
6.3. Detección de la presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positivo.....	18
6.4. Detección de <i>Escherichia coli</i> en un agar selectivo.....	20
6.5. Detección, aislamiento e identificación de <i>Escherichia coli</i> O157 productora de toxina Shiga.....	21

6.6. Análisis estadístico.....	24
7. Resultados.....	25
8. Discusión.....	28
9. Conclusiones.....	30
10. Bibliografía.....	31

Índice de Tablas

Tabla nº1: Secuencia de los <i>primers</i> utilizados.....	22
Tabla nº2: Mezcla de reacción (<i>Mix</i>).....	23
Tabla nº3: Resultados generales de cada ensayo para las muestras obtenidas en avícolas.....	25
Tabla nº4: Resultados generales de cada ensayo para las muestras obtenidas en carnicerías.....	26
Tabla nº5: Proporción de muestras positivas de cada ensayo para cada tipo de establecimiento.....	27

Índice de Figuras

Figura nº 1: Muestra cuarto trasero con hueso “pata-muslo”.....	15
Figura nº 2: Colonias típicas de <i>Salmonella spp.</i>	18
Figura nº 3: Colonias típicas de <i>Staphylococcus aureus</i>	19
Figura nº 4: Colonias color fucsia típicas de <i>Escherichia coli</i>	20
Figura nº 5: Electroforesis en Gel de Agarosa.....	24

1. Introducción

En Argentina, el sector avícola ha incrementado la producción de carne en los últimos años gracias a las transformaciones tecnológicas y a la mejora en la eficiencia productiva. Según el Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca la apertura de los mercados influyó en la reducción de los costos de producción, lo que disminuyó el precio provocando un aumento en el consumo. Esto también tiene su origen en los cambios de hábitos y estilos de vida de los consumidores originados por tendencias en el cuidado de la salud, preferencia por carnes blancas y conveniencia en precio; sumado a la gran variedad de productos y a las diferentes preparaciones que pueden realizarse, las cuales facilitan su elección por parte de los consumidores. Desde el año 2000 hasta la actualidad, el consumo de carne vacuna se ha mantenido, mientras que el de pollo se ha duplicado siendo este valor 38,3 kilos/habitante/año (Torelli, 2014).

Este crecimiento en el mercado, generó interés en comercios de diferentes rubros a comercializar pollo entero y sus subproductos, lo cual no viene acompañado necesariamente del cumplimiento correcto de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM). Es sabido que la falta de control a lo largo de toda la cadena alimentaria de un producto, puede acarrear consecuencias a nivel poblacional a través de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA), y la carne aviar no es ajena a esto; según lo afirma la Organización Mundial de la Salud junto con la *Food and Agriculture Organization* (OMS/FAO, 2014).

La producción de alimentos de calidad con garantías sanitarias debe ser un objetivo prioritario en todos los países, al tener los alimentos un papel protagonista en la transmisión de enfermedades y pudiendo constituir un riesgo potencial para la salud pública. Es por esto que el desarrollo de estrategias de prevención y control requiere un trabajo colaborativo entre el campo de la medicina humana y veterinaria, los organismos reguladores de la producción, la industria alimentaria, la vigilancia epidemiológica y el desarrollo de redes de laboratorios y de informática, y sobre todo la educación de la comunidad sobre seguridad alimentaria.

La correcta aplicación de estas medidas no solo garantiza la seguridad sanitaria de los alimentos, sino que además, permite resguardar su calidad nutricional, asegurando a la población una alimentación de calidad inocua y nutritiva.

Las **BPM** son una serie de prácticas y procedimientos que se encuentran incluidos en el Código Alimentario Argentino (CAA) desde el año 1997. Son obligatorias para los establecimientos que comercializan productos alimenticios en el país, y una herramienta clave para lograr la inocuidad de los alimentos que se manipulan. Los elaboradores de productos alimenticios son los principales responsables por la inocuidad de los alimentos que producen, pero también se debe considerar que la Autoridad Sanitaria debe proporcionar un marco legislativo claro y consistente que acompañe la implementación de las BPM en todos los establecimientos que elaboran, expenden y comercializan alimentos (ANMAT, 2012). El principal objetivo es proteger la salud del consumidor, y mejorar especialmente aquellas prácticas diarias claves para la mejora y fortalecimiento del sistema, para contribuir a que los alimentos mantengan su inocuidad y calidad nutritiva desde primer eslabón al último. Los beneficios de la implementación, mantenimiento y mejora de las BPM permiten lograr productos alimenticios inocuos y con la calidad deseada de manera regular y de esta manera, ganar y mantener la confianza de los consumidores, asegurando el fortalecimiento de la producción y comercialización de los alimentos, preservando así la salud de la población.

La **Contaminación Cruzada** es el proceso de transferencia de contaminantes que pueden ser de origen químico, físico o biológico hacia un alimento por medio de nexos que pueden ser: manos de las personas que los manipulan; utensilios mal lavados; superficies que entran en contacto con el alimento, contacto entre alimentos crudos, cocidos y aquellos que están listos para consumir. Los agentes contaminantes que se encuentran en un alimento pueden eliminarse a través de la cocción o la correcta higiene, pero es posible que al ponerse en contacto con otro alimento crudo o contaminado el mismo vuelva a recontaminarse (ANMAT, 2012).

Según la OMS (2014) las **ETA** se definen como un conjunto de síntomas y signos clásicos originados por el consumo de productos alimenticios e ingredientes,

especias, bebidas y agua, que contienen agentes patógenos o sustancias tóxicas en cantidades tales que afectan la salud de una persona o grupo de personas en forma aguda o crónica. En la actualidad se reconocen más de 250 ETA cuya causa puede ser infecciosa o tóxica. En el primer caso los agentes etiológicos pueden ser parásitos, bacterias o virus; y en el segundo se incluyen toxinas producidas por bacterias, hongos, plantas o animales, sustancias de naturaleza generalmente proteica que liberan los microorganismos durante su desarrollo, o compuestos químicos como plaguicidas, metales pesados, aditivos alimentarios, antibióticos, hormonas, que se incorporan a los alimentos en forma accidental o intencional, desde su producción hasta su consumo.

Las ETA constituyen uno de los problemas de salud más relevantes, tanto en los países desarrollados, como en vías de desarrollo. El último informe sobre Seguridad Alimentaria emitido por OMS (2014) expone la ocurrencia de cientos de casos de ETA en todo el mundo, siendo los más frecuentes los ocasionados por alimentos que sufrieron contaminación biológica.

Uno de los principales problemas que presenta el control de las ETA es la falta de registro. Está estimado que en los países industrializados sólo se informa el 10% de los casos, mientras que en los países en vías de desarrollo la relación entre los casos ocurridos y aquellos informados es de 100 a 1. Esta falta de registros puede atribuirse a varios factores, como la incapacidad para establecer la asociación entre un caso de diarrea y el consumo de alimentos contaminados; la falta de intervención de los servicios de salud para estudiar y notificar todos los brotes de ETA; la carencia de laboratorios clínicos y de análisis de alimentos y personal profesional capacitado para la investigación de las ETA, el desconocimiento de la naturaleza y los mecanismos de producción de las ETA. Las estadísticas elaboradas por el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Transmitidas por Alimentos indican que en Argentina el 40% de los brotes de ETA ocurren por una incorrecta manipulación de los alimentos (OPS/OMS, 2014).

La carne de aves en general, y la de pollo en particular, pueden ser un vehículo muy importante de flora patógena para los humanos. Entre los **microorganismos** patógenos frecuentemente presentes **en carne aviar**, se encuentran principalmente: *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* y *Bacillus cereus* (Abriata, 2006).

Las canales de pollo presentan unos índices de carga microbiana post sacrificio muy superiores al de otras especies no avícolas. Esto es así, dado que la piel sin ningún tipo de tratamiento agresivo, y por tanto con su flora microbiana, llega al producto final (SAGPyA, 2000).

Entre las bacterias patógenas productoras de ETA que se analizan en esta investigación se encuentran:

Staphylococcus aureus (*S. aureus*): el género *Staphylococcus* incluye al menos 40 especies. De éstos, nueve tienen dos subespecies y uno tiene tres subespecies. La mayoría son inofensivos y pueden residir normalmente en la piel y las membranas mucosas de los seres humanos y otros organismos. De estas especies, *Staphylococcus aureus* es el principal responsable de la intoxicación alimentaria estafilocócica. Es una bacteria anaerobia facultativa que se encuentra ampliamente distribuida por toda la biomasa. Puede producir una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas, hasta enfermedades de riesgo vital, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsias, endocarditis o neumonía. Además, puede afectar al aparato gastrointestinal por la ingestión de alimentos contaminados con la enterotoxina estafilocócica secretada por la bacteria. El hombre es el principal reservorio de *S. aureus*, se encuentra en la piel y en las vías respiratorias superiores (ANMAT, 2011). La contaminación de los alimentos puede ocurrir desde los operadores y por contaminación cruzada por el uso de utensilios contaminados o materias primas contaminadas. En el caso de contaminación directa desde el operador puede ocurrir por contacto directo con lesiones en la piel o por micro gotas salivales generadas en estornudos o tos de los

operarios. También es habitual la presencia de este microorganismo en cuero, plumas y piel de animales, por lo tanto la contaminación de las carcasas de los animales es corriente. Una gran variedad de alimentos pueden ser causa de intoxicación alimentaria estafilocócica, como la carne de mamíferos y aves cocidas, leche y derivados, productos de pastelería rellenos con crema, ensaladas, sándwiches, y demás tipos de alimentos que llevan manipulación por parte de un operador (González Ayala, 1997).

Esta bacteria produce una amplia variedad de sustancias asociadas con el grado de infección y con la enfermedad. Varían desde componentes de la pared celular, hasta una amplia gama de exoenzimas que incluyen las enterotoxinas estafilocócicas (SE), causantes de la intoxicación alimentaria. Estas toxinas son liberadas al propio alimento por ciertas cepas. Hasta hace unos años se reconocían 5 tipos de SE (SEA; SEB; SEC; SED y SEE), pero en la actualidad, gracias a técnicas de inmuno difusión se reconocen 20 tipos de SE (ANMAT, 2011).

Los *S. aureus* pueden multiplicarse exponencialmente a temperaturas entre 6.7°C y 45.5°C. La enterotoxina es producida por las células durante o inmediatamente después de la multiplicación. Se precisa la presencia de un número elevado (más de 10^6 ufc/g) de bacterias en un alimento para producir la cantidad suficiente de toxina que origine síntomas en el consumidor. Aun así, la cantidad de enterotoxina A necesaria para determinar síntomas de intoxicación en el hombre es sólo de 0,1 – 1 µg / Kg. Las enterotoxinas de *S. aureus* poseen una elevada estabilidad, ya que resisten la irradiación y la actividad de enzimas proteolíticas como la pepsina y la tripsina. (INEI, 2013). Las SE son termoestables, presentan elevada resistencia a los tratamientos térmicos habituales, pero se inactivan a temperatura de esterilización a 115°C. Los alimentos procesados o tratados en los que se ha destruido una elevada población de *S. aureus* por calentamiento pueden, no obstante, producir intoxicación alimentaria debido a la termorresistencia de las SE (ANMAT, 2011).

La intoxicación alimentaria estafilocócica es un síndrome caracterizado por náuseas, vómitos, diarrea, malestar y debilidad general. Los síntomas comienzan a

manifestarse entre 1 a 6 horas después de consumido el alimento. Aunque la enfermedad es raramente mortal, los casos graves pueden complicarse, presentándose a veces deshidratación y shock. El enfermo suele reponerse en unas 24 horas, aunque en algún caso la recuperación puede durar varios días. La intoxicación estafilocócica se puede evitar impidiendo el crecimiento de *S. aureus* enterotoxigénicos en los alimentos. Para ello es necesario respetar las BPM a lo largo de la cadena alimentaria, especialmente en el momento de preparación de los productos alimenticios. Se puede minimizar en gran magnitud la contaminación de los alimentos por *S. aureus* de origen humano, apartando de la manipulación y preparación de alimentos a personas infectadas o enfermas. La contaminación de los alimentos por *S. aureus* de origen animal se reduce controlando las mastitis. Además, es necesario evitar en el matadero las contaminaciones cruzadas entre piel y canales, así como en el hogar y establecimientos de elaboración de comidas entre alimentos crudos y cocidos (ANMAT, 2011). Los *Staphylococcus aureus* del ambiente (aparatos, superficies, utensilios de cocina) se eliminan con buenas prácticas de limpieza e higiene. Además de estas medidas preventivas es preciso destruir la bacteria con acción del calor antes que se multipliquen; frenar su multiplicación llevando rápidamente los alimentos a temperaturas inferior a 4°C para su conservación, y respetar la cadena de frío como punto clave para la prevención del crecimiento de *S. aureus* (ANMAT, 2011).

Salmonella spp: los miembros del género *Salmonella* están ampliamente distribuidos en la naturaleza; se los encuentra tanto como comensales o patógenos en el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves e insectos, causando un amplio espectro de enfermedades en el hombre y en los animales. Dichas enfermedades se denominan salmonelosis y presentan una variación en la morbilidad y mortalidad según la especie afectada y los huéspedes intervinientes. Según Caffer y Terragno (2001) la salmonelosis es una zoonosis de distribución mundial, de origen alimentario debido a que los alimentos contaminados constituyen el principal modo de transmisión.

El principal reservorio de *Salmonella* se encuentra en los animales y los microorganismos son transmitidos al hombre, ya sea directamente o a través de productos alimenticios contaminados de origen animal, tales como: huevos crudos o parcialmente cocidos y sus productos; carne roja y sus derivados; carne de aves de corral; leche cruda y productos lácteos (ANMAT, 2011).

Desde el punto de vista de los hospedadores a los que infecta, las cepas de *Salmonella* se pueden clasificar en tres grupos: las que no tienen preferencia por ningún hospedador en particular, por lo que infectan tanto al hombre como a distintas especies de animales (como los serotipos de *Salmonella* entérica causantes de zoonosis); las que sólo están adaptadas al hombre y nunca causan enfermedad en los animales, las cuales son *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A y *Salmonella paratyphi* C, que transmiten en forma directa o indirecta de una persona a otra, y en el último grupo, las que sólo están adaptadas a una determinada especie animal y rara vez causan enfermedad en el hombre: *Salmonella abortusovis*, en ovinos; *Salmonella abortusequi*, en equinos y *Salmonella gallinarum*, en aves. La mayoría de las serovariedades aisladas del hombre y de los animales de sangre caliente pertenecen a la subespecie entérica. El género *Salmonella* generalmente infecta al hombre por vía oral, una vez ingerido el microorganismo se multiplica en el intestino e invade las células del huésped. La principal manifestación clínica es una gastroenteritis aguda, acompañada de cefalalgia, dolores abdominales súbitos, diarrea, náuseas, fiebre y vómitos (ANMAT, 2011).

El incremento de los casos de salmonelosis registrado a escala mundial, se debe a los cambios integrales como el aumento de la población que determina cambios en las características demográficas y el comportamiento humano, migraciones internas y comercio inapropiado de alimentos. La adaptación de los microorganismos a nuevas condiciones ambientales con la emergencia de microorganismos o reemergencia de otros, nuevos métodos de producción de alimentos en gran escala, cambios en las dietas de los consumidores (comidas fuera del hogar, incremento en el uso de las comidas comerciales) y mayor facilidad de realizar viajes

internacionales; son factores que han contribuido también a aumentar su frecuencia. Surge de este modo la necesidad de implementar medidas de prevención y control adecuadas, con el fin de reglamentar acciones conjuntas de educación, control, supervisión, investigación y realización de una vigilancia integrada a fin de evitar en gran medida las infecciones causadas por *Salmonella* (Caffer y Pichel, 2006).

***Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC)** es un patógeno emergente asociado a ETA. Desde hace más de dos décadas, es considerado un patógeno emergente transmitido por alimentos asociado a casos esporádicos y brotes de diarrea, colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH). Fue descrito por primera vez por Knowalchuk en 1977, quien informó que cepas de *E. coli* de los serogrupos O18, O26, O111 y O128 aisladas de niños con diarrea y de cerdos con edema de pulmón producían una toxina a la que se denominó Verotoxina, debido al efecto citotóxico en células Vero. Pocos años después se aislaron cepas de *E. coli* que producían un efecto citotóxico en células HeLa, el cual podía ser neutralizado por un antisuero anti-toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* tipo 1 (O'Brien et al, 1982), por lo cual se las llamó "Shiga – like toxin". En 1982, en Michigan y Oregon se produjo un brote de CH causado por el consumo de hamburguesas, identificándose por primera vez el serotipo de *E. coli* O157 como patógeno humano. Las cepas STEC asociadas a enfermedades graves en el hombre pertenecen a la categoría de enterohemorrágicas (EHEC). Según afirma OMS (2014) dentro del grupo STEC, *E. coli* O157 es el serotipo aislado más frecuentemente y al que se le atribuye la ocurrencia de la mayoría de los grandes brotes de SUH.

En Argentina, el SUH es endémico y constituye la primera causa pediátrica de insuficiencia renal aguda y la segunda de insuficiencia renal crónica; además, es responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes. Además, nuestro país tiene la mayor incidencia a nivel mundial de casos reportados de SUH en niños de 5 años y de menor edad, siendo esta enfermedad la principal causa de fallo renal agudo, y la segunda causa de fallo renal crónico y trasplante renal infantil. Actualmente, el rango de mortalidad de niños con este síndrome es alrededor del 5% (Rivero et al., 2013).

Las cepas STEC de origen humano, animal o de alimentos pueden producir una o más potentes citotoxinas que forman parte de la familia de las toxinas Shiga (Stxs), las que poseen estructura de subunidades AB₅. Las Stxs se clasifican en dos tipos, Stx1 y Stx2. Esta clasificación se basa en la neutralización del efecto citotóxico sobre células Vero con anticuerpos específicos. Las cepas STEC pueden producir Stx1, Stx2 o variantes de Stx1 o Stx2, solas o en combinación de dos o más toxinas.

Los rumiantes en general y el ganado vacuno en particular, han sido señalados como los principales reservorios de STEC. La contaminación de la canal durante el sacrificio es la ruta primaria que últimamente lleva a la contaminación de la carne de vacuno. El escenario más frecuente que conduce a que se presente la enfermedad es una cocción insuficiente, la supervivencia del patógeno y la subsecuente infección. La principal vía de transmisión son los alimentos contaminados, productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, embutidos fermentados, leche y jugos no pasteurizados, vegetales que se consumen crudos, entre otros. Otras formas de transmisión incluyen la contaminación cruzada durante la preparación de alimentos, el contacto directo del hombre con los animales, bañarse en aguas recreacionales contaminadas y de persona a persona por la ruta fecal-oral (FAO, 2011).

Para la detección de *Escherichia coli* O157 productora de toxina Shiga se utilizó la técnica **Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real** (PCR *real time*). Las siglas corresponden a las iniciales en inglés de "*Polymerase Chain Reaction*", es un método altamente sensible desarrollado en la década de los '80 que requiere muestras con muy poco material biológico permitiendo la obtención de información cualitativa y cuantitativa de manera específica. Se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de sintetizar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN, y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que se quiere copiar para que sirva como cebadora (*primer*) (Pollard, *et al.*, 1990). Para llevar a cabo esta detección existen varios métodos basados en la utilización de otro fragmento de ADN complementario

(sonda) a una parte intermedia del ADN a amplificar. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia (*quencher*), de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del *quencher* y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. La gran ventaja del PCR real time es su rapidez, pudiéndose completar el proceso de amplificación y detección en 30-40 minutos. Permite además, un mayor flujo de muestras y ensayos, y al funcionar como un sistema cerrado, se disminuye el riesgo de contaminación.

2. Antecedentes

Es sabido que durante la manipulación, almacenaje y expendio de la carne aviar, se generan cambios en la carga microbiológica provenientes del ambiente y de los manipuladores.

Existen estudios previos sobre indicadores de contaminación cruzada donde predomina la presencia de STEC en aquellos comercios donde se ponen en contacto la carne aviar con la de origen bovino, indicando la necesidad de reforzar las medidas de control e higiene en los establecimientos expendedores de productos avícolas (Alonso, 2012).

3. Objetivos generales

Realizar una evaluación microbiológica sobre patógenos causantes de ETA en muestras de carne aviar, obtenidas de diferentes tipos de establecimientos expendedores.

3.1. Objetivos específicos

- Detectar la presencia de *Salmonella* spp.
- Comprobar la presencia de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo.
- Detectar y confirmar la presencia de *Escherichia coli* O157 productora de Toxina Shiga.

4. Hipótesis

En los establecimientos expendedores de diferentes tipos de carnes se encontrará una mayor proporción de microorganismos patógenos que en los establecimientos exclusivos de carne aviar.

5. Marco Legal

El Código Alimentario Argentino (CAA) establece las siguientes especificaciones para Alimentos Cárneos y Afines:

5.1. CAA Capítulo VI - (Res 314, 5.3.85)

Artículo 256

"Las aves para consumo podrán venderse vivas o muertas, desplumadas y evisceradas.

Se considerará Ave eviscerada, a aquella que se le ha extraído cabeza, tráquea, esófago, estómagos glandular y muscular, intestinos, pulmón, sacos aéreos, corazón, bazo e hígado con la vesícula biliar, ovarios y testículos.

Las patas deberán ser eliminadas por desarticulación o sección a la altura de la articulación tibiometatarsica.

Asimismo, se determina que las aves deberán ser sacrificadas en locales tales como mataderos y peladeros que serán habilitados por la autoridad veterinaria, la que ejercerá una inspección permanente durante la faena.

Las aves faenadas deberán llegar hasta el lugar de venta en contenedores cerrados y aprobados para tal uso de hasta 30 unidades, debiendo constar en ellos el establecimiento oficial, tipo de ave, lugar de origen y temperatura de conservación. La misma deberá estar comprendida entre -2°C y 2°C para las aves enfriadas y no deberá ser mayor de -15°C para las aves congeladas.

Las aves podrán ser comercializadas fraccionadas en trozos. La operación de trozado deberá realizarse en establecimientos habilitados.

El envase del trozado deberá ofrecer garantías de seguridad en su cierre y cada unidad de venta será identificada adecuadamente.

Las aves vivas serán sometidas a la respectiva inspección veterinaria y mantenidas en lugares y condiciones higiénicas adecuadas para garantizar su perfecto estado hasta ser expendidas al público".

En cuanto a los establecimientos donde se expenden alimentos, el Código Alimentario Argentino establece lo siguiente:

5.2. CAA Capítulo II – Condiciones Generales de las Fábricas y Comercios de Alimentos

Artículo 12

“Con el nombre de Comercio de Alimentos, se entiende la casa de negocios con local y/o depósito propio o rentado a terceros, para almacenaje exclusivo de productos alimenticios, que reserva, fracciona, expende, importa o exporta los mismos con destino al consumo.”

Los procedimientos de toma de muestra y análisis realizados en esta investigación están regidos bajo la Norma ISO 17025:05

5.3. Criterios generales para la acreditación de laboratorios de ensayo y calibración según norma UNE-EN ISO/IEC 17025:05

5.3.1 Capítulo 5. Anexo 1. Apartado 5.4.2

“El laboratorio debe utilizar métodos de ensayo y calibración que satisfagan las necesidades del cliente y sean apropiados para el uso previsto. Se deben utilizar preferentemente los métodos publicados como normas internacionales, regionales o nacionales Además, la norma establece que el laboratorio debe seleccionar los métodos apropiados que hayan sido publicados en normas internacionales, regionales o nacionales, por organizaciones técnicas reconocidas o en libros o revistas científicas especializados o especificados por el fabricante del equipo. Se pueden utilizar métodos totalmente desarrollados por el laboratorio o adaptados por

éste basados en métodos normalizados, siempre y cuando sean apropiados para el uso previsto y hayan sido validados.”

5.3.2 Capítulo 5.7. Apartado NT-43: “Laboratorios de ensayo: toma de muestra”.

“La toma de Muestras es el proceso de obtención de la muestra a ensayar con el objetivo de asegurar la validez del resultado evitando errores (por ejemplo causados por contaminación o degradación) de las muestras a ensayar. La Toma de Muestras por sí misma no permite extrapolar los resultados de la muestra al ítem muestreado. El muestreo es el proceso de obtención de la muestra a ensayar que permite garantizar su representatividad con respecto al ítem muestreado. La actividad de muestreo requiere de un Plan de muestreo en el que se identifican el tipo, número y localización de las muestras a tomar, una Toma de Muestras y, generalmente, de unos criterios de inferencia que permitan asignar valores al ítem muestreado a partir de los resultados de las muestras.”

“Dentro de un proceso de Muestreo, la definición de un determinado Plan de Muestreo (número y naturaleza de las muestras a tomar) establece de manera automática un determinado nivel de confianza en la extrapolación entre el resultado obtenido en la(s) muestra(s) y el existente realmente en el ítem muestreado. Por otra parte las reglas de inferencia seguidas para asignar el valor al ítem muestreado en función del resultado obtenido en las muestras también predefinen un nivel de confianza en cuanto a que el valor finalmente asignado al ítem sea más o menos próximo al valor real. Por ello el establecimiento de un Plan de Muestreo y de unas reglas de inferencia, además de la necesaria competencia técnica, requieren la realización de un análisis de riesgos que debe tener en cuenta factores legales, técnicos y económicos que determinan el “nivel de confianza” que se quiere conseguir.”

6. Materiales y métodos

6.1. Muestras:

Para efectuar este estudio, se realizó el muestreo en el mes de febrero de 2015 en la ciudad de Tandil, simulando un proceso de compra llevada a cabo por un consumidor.

En la toma de muestra se procedió a elegir 6 establecimientos divididos en 2 grupos: 3 avícolas donde se expendía exclusivamente carne aviar; y 3 carnicerías donde además de pollo se vendían otro tipo de carnes.

En todos los casos la muestra tomada fue el cuarto trasero del pollo (pata-muslo), buscándose una matriz con alto contenido de proteínas y lípidos, y asegurando un tamaño adecuado para su posterior análisis.

En el mismo día, 5 muestras de cada comercio fueron seleccionadas al azar, procediendo inmediatamente a la colocación de cada pieza en una bolsa estéril de cierre hermético, llevándose inmediatamente las 30 muestras a *freezer* para poder ser transportadas en condiciones de congelación.

La codificación se realizó asignando una letra por establecimiento (“A” de avícola, y “C” de carnicería) y un número correspondiente a la muestra.



Figura nº 1: Muestra cuarto trasero con hueso “pata-muslo”.

El análisis de las muestras fue realizado en Fares Taie Instituto de Análisis, de la ciudad de Mar del Plata, en el área de Alimentos y Medio Ambiente en conjunto con el área de Biología Molecular.

Los métodos de detección de bacterias patógenas realizados fueron basados en el Manual de Calidad del Laboratorio de Microbiología de SENASA y en normas del International Standard ISO, las cuales rigen en el mencionado establecimiento.

Para facilitar la organización en la ejecución de los respectivos ensayos, se procedió a realizarlos en 2 tandas: primero las 15 muestras provenientes de carnicerías y luego las 15 muestras provenientes de avícolas.

Cada tubo de ensayo y placa de Petri utilizados fueron rotulados indicando código de muestra, dilución, medio y fecha del análisis.

Antes de comenzar con los ensayos se corroboró el número de todos los elementos a utilizar, como así también los reactivos y medios de cultivo, a fin de proceder a preparar aquellos que estuvieran faltantes o en cantidades insuficientes, según las instrucciones del fabricante.

El registro de todos los análisis y sus resultados fueron realizándose simultáneamente con cada ensayo.

6.2. Detección de la presencia de *Salmonella spp.*

En el comienzo se realizó un pre enriquecimiento no selectivo. Para esto se tomaron 25 g de muestra y se colocaron en bolsa estéril contenida en recipiente de 1000 mL con 225 mL de agua peptonada. Se homogeneizó en Stomacher. La muestra sembrada se dejó 60 minutos a temperatura ambiente, se colocaron unas gotas de Tergitol a fin de disminuir la carga de interferentes, y se procedió a mezclar.

Para la etapa de enriquecimiento selectivo se tomaron 0.1 mL de la mezcla anterior con pipeta automática y se colocaron en un tubo con 10 mL de caldo Rappaport Vasiladis, incubándose 24 \pm 2 horas a 45.1 \pm 1°C. De la misma mezcla se tomaron 1 mL que se lleva a 10 mL con caldo Tetracionato con Novobiocina. Se incubó 24 \pm 2 horas a 37 \pm 1°C.

Pasado el tiempo indicado se procedió a realizar el aislamiento diferencial en placa. Para esto se pasaron los tubos por Vórtex y se aplicó la técnica de siembra por estriado con la ayuda de un ansa de aro para obtener colonias aisladas en placa con medio de crecimiento selectivo de agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) y agar Salmonella-Shigella (SS). Este paso se realizó por duplicado para cada muestra. Se incubaron las placas 24 \pm 3 horas a 37°C. Pasado este lapso se examinaron las placas y se marcaron las colonias típicas, observándose en ambos medios colonias pequeñas, opacas, de color negro.

Para el aislamiento y purificación se tomaron 5 colonias típicas con ansa de aro y se inocularon en un agar nutritivo Tripto Soya (ATS) a 37 \pm 1°C durante 24 \pm 3 horas. Se completó el ensayo realizando la confirmación por medio de pruebas bioquímicas, en este caso se inocularon las colonias en tubo pico de flauta con los medios Triple Azúcar Hierro (TSI), Urea y Lisina Hierro (LIA) por medio de punción y estriado en superficie con ansa de punta. Para la reacción de Indol se colocó una ansada del cultivo en caldo Triptofano y se agitó. Se incubaron todas las pruebas a 37 \pm 1°C durante 24 \pm 3 horas. Pasado dicho tiempo, se realizó la Prueba de Indol, colocando 3 gotas del reactivo en el tubo con el caldo y se aguardó la correspondiente reacción.

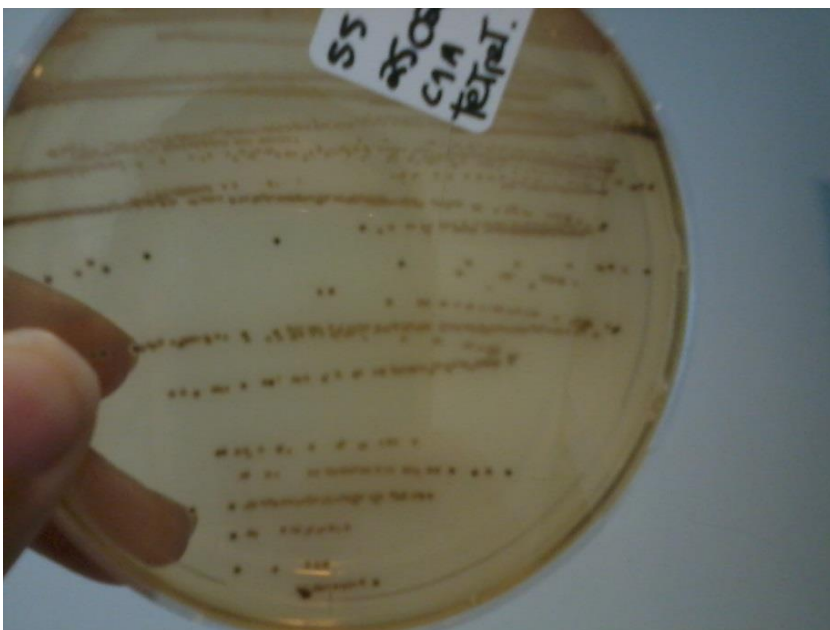


Figura nº 2: Colonias típicas de *Salmonella spp.*

6.3. Detección de la presencia de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo

Se pesaron 10 g de muestra y se colocaron en bolsa estéril contenida en recipiente de 1000 mL con 90 mL de agua peptonada. Se homogeneizó en Stomacher, de aquí se tomó con pipeta 0.1 mL y se transfirió en placa conteniendo el agar Baird Parker solidificado. Se sembró la dilución en cada placa con la ayuda de una espátula de Drygalski estéril. Este paso se realizó por duplicado.

Se incubaron todas las placas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por un intervalo de 24 horas. Pasado este tiempo se examinaron bajo la luz y se seleccionaron aquellas que contenían colonias típicas, las cuales son de color negro-grisáceo, rodeadas por un halo de clarificación. Estas se tomaron con ansa de aro y se transfirieron a un agar DNasa, inoculándolas con un simple movimiento circular. Se colocaron unas gotas de Solución Reveladora y se dejaron reposar unos minutos, hasta que se observó la presencia de un halo que abarca un diámetro casi igual al de la placa de Petri, el cual indicó que el test es positivo.

Una característica del microorganismo, utilizada analíticamente para su confirmación, es la producción de la enzima coagulasa, la cual estimula la conversión del fibrinógeno en fibrina, por lo que comprueba la facultad para coagular el plasma por la acción de la enzima. La confirmación se realizó por medio del Test de Coagulasa. Para ello se inocularon las colonias típicas a un caldo Cerebro Corazón y se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas. Cumplido este tiempo se transfirieron 0.1 mL del cultivo en un tubo de hemólisis junto con 0.5 mL de plasma de conejo. Se Incubó a 37°C y se examinó cada 6 horas para ver si hay o no formación de coágulo.



Figura nº 3: Colonias típicas de *Staphylococcus aureus*.

6.4. Determinación de *Escherichia coli* en un agar selectivo.

Se pesaron 10 g de la muestra y se colocaron en bolsa de Stomacher contenida en recipiente de 1000 mL, con 90 mL de caldo Eme Caso (EC), lográndose así una dilución de 10^{-1} . Se tomaron 2 placas por muestra y se colocó 1 mL de dilución en cada una. A éstas se les colocaron 15 mL de agar Chromocult fundido y enfriado a una temperatura de $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$ efectuando así una siembra en profundidad. Se mezcló el medio con el inóculo en la placa con suaves movimientos circulares y se dejó solidificar 15 minutos. Una vez solidificado el agar se invirtieron las placas y se incubaron 24 horas a $44 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Pasado este tiempo se examinaron las placas bajo la luz y se seleccionaron aquellas que presentaron colonias típicas color fucsia con centro bien marcado y bordes difusos como se muestra en la figura nº 4.

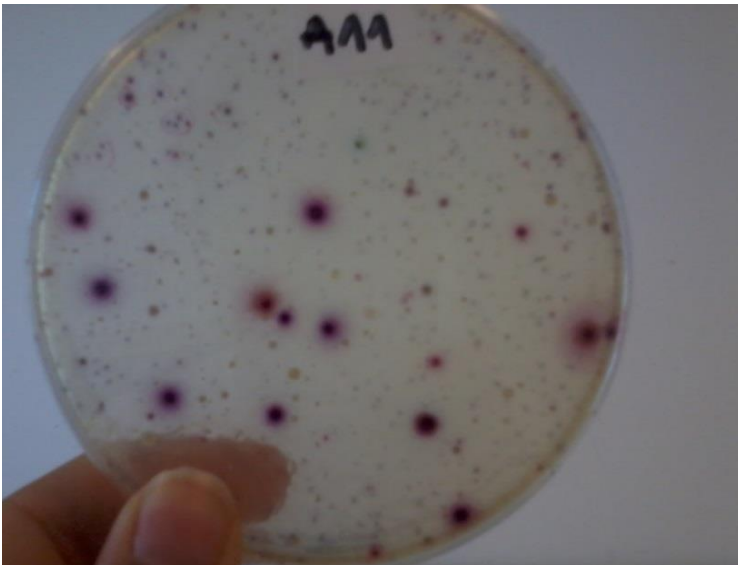


Figura nº 4: Colonias color fucsia típicas de *Escherichia coli*.

La confirmación de presencia de *E. coli* O157 se realizó por el método PCR *real time* cuya técnica y materiales necesarios se detallan a continuación.

6.5. Detección, aislamiento e identificación de *Escherichia coli* O157 productora de toxina Shiga.

Como primer paso se realizó la extracción de ADN. Se tomaron 10 g de aquellas muestras que presentan colonias típicas de *E. coli*, las cuales se colocaron cada una en un frasco contenedor estéril. Se completó un volumen de 200mL con caldo EC, y se llevaron a baño termostático con agua destilada por un lapso de 30 minutos. De esta forma se consiguieron las condiciones adecuadas para continuar con el análisis.

La extracción de ADN se realizó a partir de 1mL de cultivos puros de las correspondientes muestras mediante el Kit de extracción de ADN High Pure PCR Template preparation Kit (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego el ADN fue eluido en 150 µl de agua de calidad PCR.

El ADN obtenido fue conservado a -20 °C hasta el momento de su utilización.

Para verificar el éxito de la extracción de ADN de las muestras de cultivos y la falta de inhibición de las reacciones de PCR se llevaron a cabo amplificaciones con los cebadores (*primers*) genéricos bacterianos p201 / p1370 que amplifican ADN ribosomal 16s (Yang et al., 2009). La detección de ADN bacteriano se realizó utilizando un par de primers consenso que amplifican una región del ADN ribosomal 16s (ADNr 16s). ARNr 16S es una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales, por lo cual constituye una diana universal para su identificación.

Tabla nº1: Secuencia de los *primers* utilizados

Nombre <i>primer</i>	Secuencia del <i>primer</i> (5'-3')	Tamaño amplicón (Pares de bases (pb)).
P201	GAGGAAGGIGIGGAIGACGT	216 pb
P1370	AGICCCGIGAACGTATTCAC	
<i>stx1a</i>	GAAGAGTCCGTGGGATTACG	130 pb
<i>stx1b</i>	AGCGATGCAGCTATTAATAA	
<i>stx2a</i>	TTAACCACACCCCACCGGGCAGT	346 pb
<i>stx2b</i>	GCTCTGGATGCATCTCTGGT	
O157 F	CGGACATCCATGTGATATGG	259 pb
O157 R	TTGCCTATGTACAGCTAATCC	

Referencias: Pollard et al., (1990) – Paton y Paton, (1998).

La amplificación con los primers genéricos del ADNr 16s se realizó para 12 muestras con un programa de ciclado que comenzó con una desnaturalización inicial de 45 ciclos 2' a 95°C; 15'' a 95°C, 20'' a 57°C y 30'' a 72°C. Después de la amplificación, se realizó un análisis de curva de fusión para corroborar la amplificación específica del producto de PCR, presentado el producto una temperatura de disociación (*melting*) de 87°C.

Una vez corroborada la correcta extracción de ADN mediante la amplificación del ADN 16S, se procedió a la detección específica de *E. coli* O157.

Las reacciones se realizaron en un termociclador de PCR en Tiempo Real Rotor Gene Q, en un volumen final de 20 µL utilizando una premezcla de Real time PCR (*Mix*) compuesto por: mezcla de EVAGREEN como intercalante fluorescente; *primer* ECOLI O157 fw 20 µm; *primer* ECOLI O157 rv 20 µm; Cloruro de Magnesio; Templado (ADN bacteriano extraído de cultivos puros), y agua de calidad PCR. Para la amplificación de O157 el programa de ciclado consistió en 45 ciclos de 2' a

95°C; 15'' a 95°C, 20'' a 57°C y 30'' a 95°C, con una temperatura de *melting* de 78.3°C.

Tabla n°2: Mezcla de reacción (*Mix*)

Reactivo	Mix 1X
Mezcla de EVAGREEN 2X	10 µL
Cloruro de Magnesio	2 µL
Primer fv 20µm	0.8 µL
Primer rv 20µm	0.8 µL
Templado	1 µL
Agua	5,4 µL

Para la amplificación de los genes codificantes *stx1* y *stx2* se utilizó el siguiente programa de ciclado: 45 ciclos de 2' a 95°C; 15'' a 95°C, 20'' a 60°C y 30'' a 72°C. La temperatura de *melting* para el par de primers *stx1* fue 81°C, y 78.5°C para el par de primers *stx2*.

Los productos de las PCR en Tiempo Real obtenidos con cada par de *primers* fueron corridos en geles de agarosa para corroborar el peso molecular de los productos amplificados.

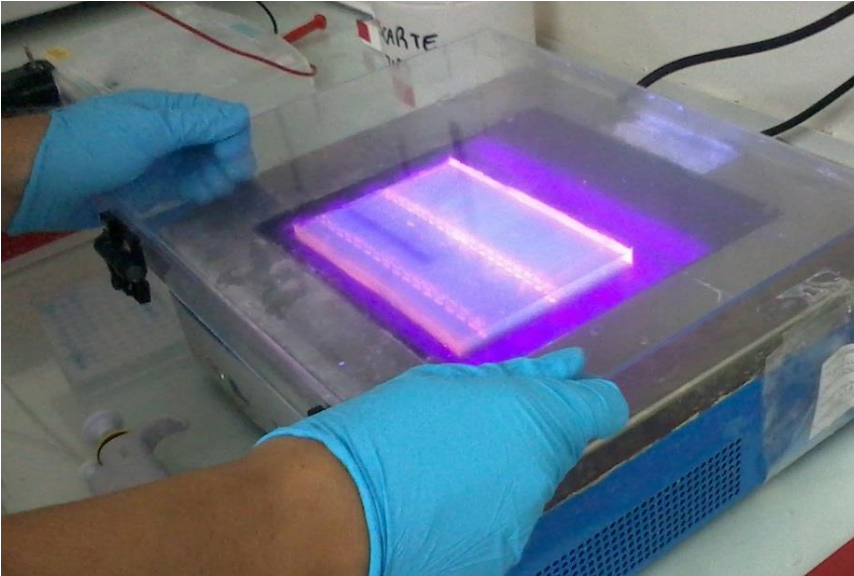


Imagen nº 5: Electroforesis en Gel de Agarosa.

6.6. Análisis estadístico:

Para la comparación de las proporciones de cada uno de los agentes patógenos de acuerdo al tipo de establecimiento se realizó el test de Chi cuadrado o el test exacto de Fisher cuando fue necesario. Se consideraron como significativos a los valores de $p < 0,05$. También se determinó la razón de prevalencia (RP) con un intervalo de confianza (IC) del 95%.

7. Resultados

Los ensayos realizados en las 30 muestras para la detección de las bacterias mencionadas a través de cultivos, más la técnica de PCR para detectar la presencia de *E. coli* O157 productora de toxina Shiga, permitieron conocer la proporción de muestras positivas para cada establecimiento. En las tablas nº 3 y nº4 se resumen los resultados de cada estudio para cada muestra.

Tabla nº3: Resultados generales de cada ensayo para las muestras obtenidas en avícolas agrupados según establecimiento. Se asigna la letra P cuando refiere a presencia del objetivo buscado, y A representa la ausencia del mismo

Determinación	Establecimiento														
	Avícolas (n=15)														
	Avícola 1					Avícola 2					Avícola 3				
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15
<i>Salmonella spp.</i>	P	A	A	A	A	A	A	A	P	P	A	A	A	A	A
<i>Staphylococcus aureus</i>	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A	P	A	A	A	A
<i>Staphylococcus aureus coagulasa positivo</i>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>Escherichia coli</i>	A	A	A	A	P	A	A	A	A	P	P	A	A	A	A
<i>Escherichia coli</i> O157	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>stx1</i>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>stx2</i>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

En el grupo de las avícolas, se pudo evidenciar que solo 2 de ellas presentaron muestras positivas a la presencia de *Salmonella spp.*; ninguna muestra de cada grupo resultó positiva a *Staphylococcus aureus coagulasa positivo*; en una muestra de cada grupo se detectó *Escherichia coli*, y ninguna de las 15 muestras evidenciaron la presencia de *E. coli* O157 productora de toxina Shiga.

Tabla nº4: Resultados generales de cada ensayo para las muestras obtenidas en carnicerías agrupados según establecimiento. Se asigna la letra P cuando refiere a presencia del objetivo buscado, y A representa la ausencia del mismo

Determinación	Establecimiento														
	Carnicerías (n=15)														
	Carnicería 1					Carnicería 2					Carnicería 3				
	C1a	C1b	C1c	C1d	C1e	C2f	C2g	C2h	C2i	C2j	C3k	C3l	C3m	C3n	C3ñ
<i>Salmonella spp.</i>	P	P	A	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	P
<i>Staphylococcus aureus</i>	A	A	A	A	P	A	A	P	A	A	P	P	P	P	A
<i>Staphylococcus aureus coagulasa positivo</i>	A	A	A	A	A	A	A	P	A	A	A	A	A	P	A
<i>Escherichia coli</i>	P	P	P	A	P	P	P	A	A	P	A	P	P	A	A
<i>Escherichia coli O157</i>	P	P	P	A	P	P	P	A	A	A	A	P	P	A	A
<i>stx1</i>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>stx2</i>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	P	A	A

En el grupo de las carnicerías, se pudo observar una mayor cantidad de muestras con presencia de *Salmonella spp.* en la Carnicería 1, mientras que en la Carnicería 2 ninguna muestra resultó positiva; para el caso de *Staphylococcus aureus* la Carnicería 3 mostró mayor cantidad de resultados positivos aunque no mantiene esta alta proporción para *S. aureus* coagulasa positivo.

Al analizar la presencia de *Escherichia coli* y posteriormente *Escherichia coli* O157, se evidenció que en todas las carnicerías alguna muestra resultó positiva a este patógeno. La reacción de amplificación para *stx1* y *stx2* por PCR *real time* aplicado a las 8 muestras positivas a *E. coli* O157 arrojó un resultado positivo en la muestra C3m el gen que codifica la producción de la toxina Stx2.

Se realizó el análisis de la muestra positiva por electroforesis corroborando el peso molecular esperado del amplicón (346 pb).

A continuación se detallan los resultados obtenidos a través del análisis estadístico de los ensayos efectuados, en relación a las diferencias en las proporciones de muestras positivas para cada tipo de establecimiento.

Según lo resume la Tabla nº 5 puede observarse que no existieron diferencias estadísticamente significativas respecto a la presencia de *Salmonella spp.* en cada establecimiento.

Contrastando ambos locales, se exponen diferencias proporcionales en lo que refiere a la contaminación de las muestras *Escherichia coli* y *Escherichia coli* O157 encontrándose una mayor proporción en las carnicerías. Las diferencias en cuanto a presencia de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo en cada tipo de establecimiento, no fueron estadísticamente significativas.

Tabla nº5: Proporción de muestras positivas de cada ensayo para cada tipo de establecimiento indicando el Chi cuadrado p valor (X^2 p valor) y la razón de prevalencia en un intervalo de confianza.

	Avícolas (n=15)	Carnicerías (n=15)	X² p valor	RP (IC 95%)
<i>Salmonella spp.</i>	3 (20%)	4 (26,67%)	p=0,27	1,3 (0,35-4,9)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 (13,33%)	6 (40%)	p=0,09	3 (0,71-12,55)
<i>S. a. coagulasa positivo</i>	0 (0%)	2 (13,33%)	p= 0,48	2,15 (1,44-3,2)*
<i>E. coli</i>	2 (13,33%)	9 (60%)	p=0,008	4,5 (1,61-17,44)*
<i>E. coli</i> O157	0 (0%)	8 (53,33%)	p=0,001	3,14 (1,7-5,8)

* Se calculó la prevalencia de exposición

8. Discusión

Como se ha mencionado anteriormente en este trabajo, la inocuidad de los alimentos es una característica esencial de calidad. Las normas existentes en el ámbito nacional junto con las exigencias de los consumidores hacen necesario que se cumpla el aseguramiento de las características adecuadas en términos de nutrición y salud.

Es sabido además, que una incorrecta manipulación de los alimentos puede contribuir a la contaminación y transmisión de enfermedades por alimentos.

En esta investigación, el estudio de las muestras de carne aviar obtenidas de establecimientos con diferentes características permitió realizar un análisis microbiológico que reflejó posibles fallas en la manipulación de los alimentos.

Al observar los resultados obtenidos, se puede apreciar que en aquellos establecimientos donde coexisten diferentes tipos de carne hubo una mayor proporción de bacterias patógenas en general. Particularmente en la presencia de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo, y en el caso de *Escherichia coli* O157 y en la detección del gen *stx2* donde los resultados fueron estadísticamente significativos.

La presencia de *Salmonella spp.* si bien es común a las piezas de carne aviar en general, es de esperarse una mayor proporción en aquellas muestras provenientes de establecimientos exclusivos de carne aviar, ya que al momento de ser transportado hacia otros establecimientos, se les realiza un proceso de disminución de la carga microbiana (Tunes y Vigo, 2010). A pesar de lo esperado, en este trabajo no se encontraron diferencias significativas respecto a este parámetro.

Los datos obtenidos en referencia a *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo, demuestran coherencia con las referencias bibliográficas en las cuales se alega una relación directa entre este patógeno y los alimentos incorrectamente manipulados. Esto sucedió en las muestras provenientes de establecimientos mixtos, donde podría presumirse una escasa aplicación de las BPM.

Con la presencia de contaminación con STEC en la muestra obtenida de carnicería, se podría inferir que fue producto de contaminación cruzada, lo que supone un mayor riesgo potencial para la salud de la población por sobre las avícolas donde no se detectó el patógeno. Aun así, actualmente no existe demasiada información sobre la presencia de *Escherichia coli* Shigatoxigénica en muestras de carne aviar (Alonso, 2012), y sería necesario realizar una investigación con un mayor número de muestras.

Si bien este trabajo centró la investigación de *Escherichia coli* O157 productora de toxina Shiga, es preciso aclarar que pueden estar presentes otros serotipos productores de la misma toxina (Rivero, 2013), los cuales no se evaluaron en esta tesis.

Es importante considerar que la presente investigación no afirma que, en base a los resultados, las carnicerías no están cumpliendo con las BPM, fundamentado en que el tamaño muestral no es suficiente para tal inferencia, sin embargo la presencia de microorganismos patógenos en mayor proporción, sugieren revisar la correcta aplicación de dichas prácticas.

Existen actualmente a nivel nacional programas de concientización dirigidas a la población, tales como la guía “Carnicerías Saludables”, promovida por el Instituto de Promoción de la Carne Vacuna (IPCVA), y las fichas técnicas “Nutrición y Educación Alimentaria: Contaminación Cruzada” del Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca, que apuntan a ser utilizadas como instrumento para mejorar la calidad higiénico-sanitaria de los locales de expendio y del producto comercializado, con el fin de reducir el impacto de las enfermedades transmitidas por alimentos en los consumidores. Teniendo presente que estas enfermedades constituyen uno de los problemas de salud más relevantes, como agentes impartidores de conocimiento en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, debe procurarse la concientización de todos los sectores de la cadena alimentaria, y enfatizar en la comunidad a fin de que los consumidores gocen del derecho a una alimentación saludable y de calidad.

9. Conclusiones

Al finalizar este trabajo pudo corroborarse la presencia de tres grupos patógenos de interés en las muestras de carne aviar: *Salmonella spp.*; *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo, y *Escherichia coli* O157 productora de toxina Shiga, y sugiere la existencia de contaminación cruzada.

Los resultados demuestran la necesidad de aplicar correctamente las BPM durante la manipulación y expendio de carne aviar en los diferentes tipos de establecimientos, a fin de proveer a los consumidores productos de calidad inocua y nutritiva.

10. Bibliografía

- Abriata, G., Poyard, E., Roques, L., Hamse, E., Codebó, M. (2006). Boletín Epidemiológico Periódico. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación. Buenos Aires, Argentina.
- Alonso, M., Lucchesi, P., Rodriguez, E., Padola, N. (2012). Enteropathogenic (EPEC) and Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) in broiler chickens and derived products at different retail stores. Food Control. Nº 23. 351 – 355p.
- ANMAT (2011). Análisis Microbiológico de los Alimentos. Metodología analítica oficial. Microorganismos patógenos. Volumen 1 y 2.
- ANMAT (2012). Portfolio educativo en temas clave en Control de las Inocuidad de los Alimentos. Buenas Prácticas aplicadas a los Alimentos. Capítulo 4.
- Caffer, M., Terragno, R. (2001). Manual de Procedimientos para la Caracterización de *Salmonella spp.* Ministerio de Salud. INEI-ANLIS.
- Caffer, M., Pichel, M. (2006). Evolución de la salmonelosis y brotes hospitalarios por *Salmonella spp.* en los últimos 15 años. Temas de zoonosis III. 209-215p.
- González Ayala, S., Cecchini, D. (1997). Intoxicación alimentaria estafilocócica. Diagnóstico e investigación epidemiológica de las Enfermedades transmitidas por Alimentos. Módulo 2: 10-15p.
- Código Alimentario Argentino. Capítulo II (2010). [46 pantallas]. Disponible en el URL:
http://www.msal.gob.ar/argentina-saludable/pdf/CAPITULO_II.pdf
Fecha de consulta: 22/05/2015
- Código Alimentario Argentino. Capítulo VI (2014). [114 pantallas]. Disponible en el URL:
http://www.msal.gob.ar/argentina-saludable/pdf/CAPITULO_IV.pdf
Fecha de consulta: 22/05/2015

- Food and Agriculture Organization (FAO) (2011). Evaluación del riesgo de *Escherichia coli* entero hemorrágica (ECEH) en los productos de carne fresca y carne de res. Microbiological Risk Assessments Series. 60-124p.
- Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI). (2013). Detección, recuento y caracterización fenotípica y genotípica de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico a partir de alimentos.
- International Standard ISO 17025. (2005). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.
- Leotta, G., Chinen, I., Epzteyn, S., Miliwebsky, E., Melamed, C., Motter M., Ferrer, M., Marey, E., Rivas, M. (2005). Validación de una técnica de PCR para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. Revista Argentina de Microbiología 37: 1-10p.
- Organización Mundial de la Salud (OMS): Estadísticas Sanitarias Mundiales. (2014). [12 pantallas]. Disponible en el URL:
<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/world-health-statistics-2014/es/>
- Fecha de consulta: 23/05/2015
- Organización Panamericana de Salud (OPS): Sistemas de Vigilancia Epidemiológica. (2014). [1 pantalla]. Disponible en el URL:
http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5807&Itemid=41178&lang=es
- Fecha de consulta: 28/09/2015
- Paton, A., Paton, J. (1998). Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for stx1, stx2, eaeA, Enterohemorrhagic E. coli hlyA, rbO111 and rbfO157. Journal of Medical Microbiology. 598-602p.
- Pollard, D., Johnson, W., Lior, H., Tyler, D., Rozee, K. (1990). Rapid and Specific Detection of Verotoxin Genes in *Escherichia coli* by the Polymerase Chain Reaction. Journal of Clinical Microbiology. 540-545p.

- Rivas, M., Leotta, G., Chinen, I. (2008). Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos. Manual de Procedimientos. WHO-INEI-ANLIS.
- Rivero, M., Pasucci, J., Rodríguez, E., Parma, E. (2010). Roll and clinical course of verotoxigenic *Escherichia coli* infections in childhood acute diarrhoea in Argentina. *Journal of Medical Microbiology*. 345-352p.
- Rivero, M. y otros. (2013). Epidemiología del Síndrome Urémico Hemolítico en dos regiones de la Provincia de Buenos Aires. *Medicina* 73: 127-135p.
- Rivero, M., Ballesteros, M., Passucci, J. (2014). Evidencias sobre el uso del freezer como riesgo potencial para la infección con *Escherichia coli* verotoxigénico. *Revista Argentina de Zoonosis y Enfermedades Infecciosas Emergentes*. Publicación Científica de la Asociación Argentina de Zoonosis. Volumen IX nº2. 16-18p.
- Romero, R. (2007). *Microbiología y Parasitología Humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. Editorial Médica Panamericana. 3ra Edición.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. (2000). *Guía de Aplicación de Buenas Prácticas de Manufactura. Faena y Procesamiento de Pollos Parrilleros*. 80p.
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. (2008). *Manual de Control de Calidad del Laboratorio de Microbiología*. Buenos Aires, Argentina. 35 p.
- Torelli, J. (2014). *Cadena de ganados y carne. Perspectivas y visión desde la industria*. IPCVA.
- Tunes, M., Vigo, G. (2010). *Microbiología Veterinaria. Salmonella*. Editorial Intermedia. Capítulo 26. 210-214p.