



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



Maestría en Tecnología
e Higiene de Alimentos

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de:

MAGÍSTER EN TECNOLOGÍA E HIGIENE DE LOS ALIMENTOS

TITULO DEL TRABAJO:

**“Desarrollo y validación intra-laboratorio de una metodología
para la detección *Salmonella* spp. en carne bovina molida.
Desarrollo de estrategias de prevención y control.”**

AUTOR: Méd. Vet. Virginia Aliverti

DIRECTOR: Dr. Gerardo Aníbal Leotta

CO-DIRECTOR: MSc. Julio Alberto Copes

LUGAR DE REALIZACIÓN

Laboratorio de Microbiología de Alimentos (LaMA, FCV-UNLP)

Instituto de Genética Veterinaria “Ing. Fernando Noel Dulout”

(IGEDET, FCV-UNLP-CONICET)

AÑO 2012

DEDICATORIA

De manera muy especial y a quienes le dedico esta tesis: a mis padres por ser el mejor ejemplo de fortaleza, dedicación y superación. Por ser mi guía y mi mayor apoyo siempre!

AGRADECIMIENTOS

A Julio Copes por darme la posibilidad de crecer profesionalmente y de formar parte del grupo excelente de trabajo desde el año 2005.

De manera especial a Gerardo Leotta por haberme dado su confianza, su enseñanza y la oportunidad de iniciar mi formación en la investigación.

A mis amigos y compañeros de trabajo del LaMA, con quienes comparto gran parte de las horas del día, quienes me ayudaron en todo momento siempre que los necesite y con quienes da gusto trabajar!

A las autoridades de la Facultad de Ciencias Veterinarias por darme la posibilidad de realizar la Maestría.

A todas aquellas personas con quienes he compartido buenos momentos durante el tiempo de estudio y trabajo.

A mis hermanas Carolina y Florencia estar siempre en las buenas y en las malas!

A todos muchas gracias!

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	2
1. INTRODUCCION	7
1.1.- Enfermedades transmitidas por alimentos.....	7
1.2.- Taxonomía del género <i>Salmonella</i>	9
1.3.- Marcadores de virulencia del género <i>Salmonella</i>	10
1.4.- Fisiopatogenia y manifestaciones clínicas de la Salmonelosis	12
1.5.- Ecología y reservorios de <i>Salmonella</i>	17
1.6- <i>Salmonella</i> en Alimentos	19
1.7.- Transmisión de <i>Salmonella</i>	20
1.8.- Epidemiología de la Salmonelosis	22
1.9.- ETA y Salmonelosis en el mundo	23
1.10.- Situación en Argentina.....	27
1.11.- Detección de <i>Salmonella</i> spp. a partir de alimentos	29
1.12.- Reacción en cadena de la polimerasa.....	30
1.13.- Validación de métodos analíticos	38
1.14.- Prevención y control	40
2. OBJETIVOS	42
2.1.- Objetivo General.....	42
2.2.- Objetivos Específicos	42
2.2.1.- Objetivo A	42
2.2.2.- Objetivo B	42
3. MATERIALES Y MÉTODOS	44
3.1.- Desarrollo de una técnica de RT-PCR para la detección del gen <i>invA</i> a partir del pre-enriquecimiento	44
3.1.1.-Diseño de cebadores	44
3.1.2.- Cepas.....	44
3.1.3.- Extracción de ADN.....	44
3.1.4.- Mezcla de reacción de PCR.....	45
3.1.5.- Controles.....	45
3.1.6.- Condiciones de la RT-PCR.....	45
3.1.7.- Estandarización.....	46
3.2.- Validación intra-laboratorio de la RT-PCR desarrollada	47
3.2.1.- Cepas.....	47
3.2.2.- Procedimiento	47
3.2.3.- Parámetros a evaluar y análisis estadístico	49
3.3.- Obtención de las muestras	49
3.4.- Análisis bacteriológico	49
Detección de <i>Salmonella</i> spp. a partir de muestras de carne molida obtenidas a nivel boca de expendio	50
a) PCR de punto final	50
b) RT-PCR desarrollada y validada en una etapa intra-laboratorio.....	50
c) RT-PCR comercial: Foodproof® <i>Salmonella</i> Detección Kit – 5´ nuclease (Merck)	50
c.1) Extracción de ADN	51
c.2) Preparación de la mezcla de reacción	51
c.3) Condiciones de la PCR	51
3.5.- Procedimiento microbiológico para el aislamiento de <i>Salmonella</i> spp.....	51
Caracterización fenotípica	52
a) Pruebas Bioquímicas	52

b) Pruebas serológicas.....	53
3.6.- Análisis estadístico	54
3.7.- Capacitación a los expendedores de carne de la ciudad de Berisso	54
4. RESULTADOS	56
4.1.- Desarrollo de una técnica de RT-PCR para la detección del gen <i>invA</i> a partir del pre-enriquecimiento.	56
4.1.1.-Diseño de cebadores	56
4.1.2.- Estandarización.....	56
4.2.- Validación intra-laboratorio de la técnica de RT-PCR desarrollada	57
4.2.1.- Selectividad.....	57
4.2.2.- Análisis estadístico de los resultados.....	58
4.3.- Análisis de muestras de carne molida obtenidas a nivel de boca de expendio	58
4.3.1.- Detección de <i>Salmonella</i> spp. a partir de muestras de carne molida obtenidas a nivel de boca de expendio.....	58
4.3.2.-Procedimiento microbiológico para el aislamiento de <i>Salmonella</i> spp.....	59
4.4.- Análisis estadístico	59
a) PCR de punto final.....	60
b) RT-PCR desarrollada y validada en una etapa intra-laboratorio.....	60
c) RT-PCR comercial: Foodproof® <i>Salmonella</i> Detección Kit – 5´ nuclease (Merck)	60
4.5.- Capacitación a los manipuladores de carne de los comercios analizados para prevenir la presencia de <i>Salmonella</i> spp.	60
5. DISCUSIÓN	62
5.1.- RT-PCR desarrollada y validada en una etapa intra-laboratorio	63
5.2.- Desafío de las técnicas de PCR contra la metodología de aislamiento (<i>gold standard</i>).....	64
5.3.- Capacitación a manipuladores de carne molida para prevenir la presencia de <i>Salmonella</i> spp.	68
6. CONCLUSIONES.....	72
7. REFERENCIAS	73
8. FIGURAS	84
9. TABLAS.....	93
10. ANEXOS	103

RESUMEN

La salmonelosis es una de las enfermedades transmitidas por alimentos más frecuente en el mundo. El Código Alimentario Argentino establece para carne molida la ausencia de *Salmonella* spp. y para su análisis recomienda la norma BAM. Esta metodología requiere tiempo hasta obtener el resultado final. La PCR se utiliza como método rápido para la detección de patógenos. El objetivo de este trabajo fue prevenir la presencia de *Salmonella* spp. en la carne molida destinada a consumo minorista. Se desarrolló una técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR) con agentes intercalantes para la detección de *Salmonella* spp. y se realizó una validación intra-laboratorio. El límite de detección fue 10^4 UFC/20 μ l de mezcla de reacción. En esta etapa la técnica presentó 100% de inclusividad y exclusividad. Se comparó el desempeño de esta técnica contra una PCR de punto final y una RT-PCR comercial mediante el análisis de 92 muestras de carne molida obtenidas de carnicerías de la ciudad de Berisso. Durante el muestreo se realizó una encuesta al responsable del comercio. Se obtuvieron 13 (14%) muestras positivas por aislamiento y por RT-PCR comercial y ocho (8,7%) muestras positivas al utilizar PCR de punto final y la técnica desarrollada. Se aislaron 5 serotipos de *Salmonella*. El desempeño de la RT-PCR desarrollada se puede mejorar mediante el rediseño de los oligonucleótidos cebadores en base a los clones circulantes aislados en la carne molida. En las encuestas se identificaron problemas como: falta de trazabilidad de la carne, falta de procedimientos de sanitización estandarizado y carencias edilicias. El Programa “Carnicerías Saludables” permitió detectar los puntos críticos en las etapas de triturado y envasado de la carne molida y de esta forma implementar estrategias de prevención y control de salmonelosis por medio de la capacitación de 167 manipuladores.

Palabras clave: *Salmonella*, carne molida, tamizaje, PCR.

1. INTRODUCCION

1.1.- Enfermedades transmitidas por alimentos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a las Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) como: “El conjunto de síntomas originados por la ingestión de agua o productos alimenticios que contengan agentes biológicos o sustancias tóxicas en cantidades tales que afectan la salud del consumidor en forma aguda o crónica, a nivel individual o de un grupo de personas” (WHO, 1997). Los síntomas de las ETA varían de acuerdo al tipo de contaminación, así como a la cantidad de alimento consumido. Los signos más comunes son diarreas y vómitos, pero también pueden presentar dolores abdominales, dolor de cabeza, fiebre, síntomas neurológicos, visión doble, ojos hinchados, dificultades renales, etc.

Las ETA constituyen uno de los problemas de salud más relevantes, tanto en los países desarrollados, como en los países en vías de desarrollo. El desarrollo de nuevos productos alimenticios y nuevas tecnologías de procesamiento, el uso cada vez más difundido de sistemas centralizados de distribución rápida y el aumento del comercio internacional, representan un desafío tanto para la industria como para los organismos de control. Los cambios de hábitos y tendencias de consumo, la existencia de poblaciones especialmente susceptibles debido al envejecimiento, la desnutrición, personas inmunosuprimidas, niños, mujeres embarazadas y los cambios en las poblaciones microbianas también representan un riesgo desde el punto de vista de las ETA (Salm-Surv, 2005; Alvarez Martínez, 2007).

Cada año, la OMS recibe informes sobre la ocurrencia de cientos de casos de ETA en todo el mundo, y la causa más frecuente son alimentos que sufrieron contaminación biológica, entre las bacterias asociadas se incluyen *Staphylococcus aureus*, *Escherichia*

coli, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter* spp., *Cronobacter sakazakii*, y *Shigella* spp. (OPS, 1996).

Sin embargo, en los últimos años se presentaron brotes ocasionados por patógenos emergentes y re-emergentes que pusieron de manifiesto la fragilidad de los programas de protección de alimentos para prevenir y controlar las ETA.

Entre los patógenos bacterianos emergentes se destacan: *Salmonella* Enteritidis en huevos, *Salmonella* Typhimurium DT104 en alimentos de origen animal (Poppe, 1998), *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) en carnes y vegetales (Masana, 2010), *Listeria monocytogenes* en carne y quesos (Copes *et al.*, 2000), *Campylobacter jejuni* y *Yersinia enterocolitica* en carne de cerdos y aves (de Boer y Nouws, 1991; López, 2000), *Shigella dysenteriae* en agua (Faruque *et al.*, 2003) y *Cronobacter sakazakii* en productos lácteos deshidratados (Gurtler *et al.*, 2005). Entre los reemergentes se encuentra *Vibrio cholerae* O1, cuya principal fuente de infección es el agua y los alimentos de origen marino (Gonzales Fraga, 2010).

Las ETA no solo afectan de manera significativa la salud y el bienestar de las poblaciones, sino que también imponen una carga sustancial en los sistemas de salud y reducen notablemente la productividad económica del país. Los costos originados por estas enfermedades humanas son elevados.

El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de EE.UU., estima que 76 millones de personas por año sufren ETA en ese país, 325.000 personas son hospitalizadas y 5.000 mueren. Por lo tanto, las ETA tienen un importante impacto económico y expertos en salud estiman que sólo en EE.UU. el costo anual de todas las ETA es de 5 a 6 billones de dólares (CDC).

Uno de los principales problemas que presenta el control de las ETA es la falta de registro. Se considera 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.

En Argentina, los datos disponibles son los aquellos publicados en los Boletines Epidemiológicos del Ministerio de Salud de la Nación. El 55,3% de los brotes corresponden a *E. coli* y *Salmonella* spp. y los alimentos involucrados más comúnmente son agua y carnes (Boletines Epidemiológicos del Ministerio de Salud de la Nación).

1.2.- Taxonomía del género *Salmonella*

El género *Salmonella* pertenece a la Familia *Enterobacteriaceae*, Orden *Enterobacteriales*, Clase *Gamma-Proteobacteria* (Garrity et al., 2004). En la actualidad, y luego de numerosos estudios de ADN, se considera que el género *Salmonella* consta de dos especies, *S. enterica* y *S. bongori*. La primera está dividida a su vez en seis subespecies: *S. entérica* subespecie *enterica*, *S. enterica* subespecie *salamae*, *S. enterica* subespecie *arizonae*, *S. entérica* subespecie *diarizonae*, *S. enterica* subespecie *houtanae* y *S. enterica* subespecie *indica* (Popoff y Le Minor, 1992).

Los miembros de éste género son bacilos gram negativos de 2-3 µm x 0,4-0,6 µm de tamaño, no esporulados, móviles por flagelos peritricos a excepción de *S. Gallinarum* (biotipos *Gallinarum* y *Pullorum*). Crecen en medios de cultivo simples de peptona o extracto de carne y en medios selectivos como el agar MacConkey. Son aerobios o anaerobios facultativos, utilizan la glucosa con producción de ácido o ácido y gas mediante los procesos de oxidación y fermentación, son catalasa y oxidasa negativos, reducen el nitrato a nitrito y tienen un contenido de G+C del 39-59% (Bergey's, 2005).

La especie tipo es *Salmonella enterica*, ya que el 99,8% de las cepas de *Salmonella* aisladas del hombre y de los animales de sangre caliente pertenecen a *S. enterica* subespecie *enterica* y tienen propiedades bioquímicas características.

Las cepas de *Salmonella* se clasifican en serotipos en la base de la amplia diversidad de lipopolisacárido (LPS) de antígenos (O) y antígenos flagelares proteínas (H), de conformidad con el esquema de Kauffmann-White, en la actualidad aproximadamente 2500 serotipos son reconocidos (Bergey's, 2005)

1.3.-Marcadores de virulencia del género *Salmonella*

La estrategia patogénica de *S. enterica* incluye la adherencia a los enterocitos, la penetración de la barrera intestinal y la interacción con células del sistema inmune. Muchos de los genes que codifican los factores de virulencia son regulados por sistemas presentes en especies patógenas y no patógenas (Figura 1).

La expresión se inicia cuando *Salmonella* entra en contacto con el medio ambiente hostil que representa el tracto gastrointestinal del hospedero, donde encuentra una gran variedad de condiciones como: la osmolaridad, la tensión de oxígeno y el pH; que actúan como señales para que inicie la transcripción de genes que codifican factores de virulencia, los cuales favorecen la interacción con la célula blanco durante la patogénesis (Hueck, 1998).

En consecuencia, los mecanismos de virulencia de *S. enterica* son complejos y se estima que para producir una infección letal en ratones la cepa tipo de *S. Typhimurium* LT2 necesita la expresión de 200 genes (4% del genoma) (Bowe *et al.*, 1998; Marcus *et al.*, 2000; Mc Clelland *et al.*, 2001).

Los factores de virulencia de *Salmonella* se pueden clasificar en dos grupos:

1) estructuras superficiales y 2) genes de virulencia.

El primer grupo incluye estructuras diana del sistema inmune del hospedador

a) LPS, b) flagelos, c) cápsula y d) fimbrias.

El segundo grupo incluye genes de virulencia localizados en el cromosoma o en plásmidos, que codifican factores solubles que modifican la fisiología celular del hospedador o que protegen a la bacteria de sistemas antimicrobianos del mismo. Estos genes pueden estar en: e) islas de patogenicidad (sistemas de secreción), f) Islotes de patogenicidad y genes sueltos, g) plásmidos de virulencia y h) genes de resistencia a los antimicrobianos.

Las islas de patogenicidad de *Salmonella* (IPS) se definen como largas agrupaciones de genes dentro del cromosoma bacteriano, que codifican para determinantes responsables de establecer las interacciones específicas con el hospedador y que son necesarios para la expresión de virulencia bacteriana en un modelo animal. *Salmonella* es la única especie conocida que tiene dos sistemas de secreción tipo III, codificados por dos islas de patogenicidad distintas IPS-1 e IPS-2. En las IPS se encuentran codificados los sistemas de secreción tipo III, un grupo de estructuras especializadas de las bacterias gram negativas, cuya finalidad es introducir proteínas efectoras al citosol de células eucariotas con el fin de desequilibrar su función (Hueck, 1998) (Figura 2).

Los genes *inv*, *spa*, *prg* y *org* se encargan de formar las proteínas constituyentes del sistema de secreción, mientras que los genes *spt*, que codifica para una tirosinofosfatasa junto con SipA y SipE, encargados del re-arreglo de los filamentos de actina (Salyers, 2002; Alvarez Martínez, 2007).

El gen *invA* es un factor de virulencia relacionado con el proceso de invasión al epitelio intestinal y utilizado por otros enteropatógenos como *Shigella* spp. durante el proceso de infección.

El gen *invA* es común en todas las variedades invasoras, lo que significa que se puede asociar con posibles cuadros virulentos (Zhang *et al.*, 2003; Malorny *et al.*, 2003).

Además, el gen *invA* fue utilizado en estudios para la detección de *Salmonella* spp. en muestras de alimentos, debido a la estabilidad genética que presenta (Daum *et al.*, 2004).

Los genes que contiene IPS-2, están envueltos en la fase sistémica de la enfermedad. IPS-3 produce un transportador de alta afinidad de Mg^{++} , cuya función es muy importante para la supervivencia bacteriana dentro del fagosoma. Además existen seis IPS más IPS-4, IPS-5, IPS-6, IPS-7, IPS-8, IPS-9 e IPS-10 (Salyers, 2002; Alvarez Martínez, 2007).

Los serotipos de *Salmonella* que contienen plásmidos son los mayores patógenos de los animales domésticos (Gulig *et al.*, 1993; Guiney *et al.*, 1995).

1.4.- Fisiopatogenia y manifestaciones clínicas de la Salmonelosis

Bajo el término Salmonelosis se incluye a las Fiebres Tifoidea, Paratifoidea y no-Tifoidea, enfermedades infecciosas, y en algunos casos zoonóticas, transmitidas por alimentos.

La Fiebre Tifoidea está producida por *S. Typhi*, cuyo reservorio es el hombre, así como Paratyphi A, B y C, que causan Fiebre Paratifoidea y cuyos reservorios son el hombre y con menor frecuencia los animales domésticos. En ambos casos se trata de enfermedades sistémicas severas que se relacionan con la capacidad de las bacterias de sobrevivir y multiplicarse dentro de los mononucleares. El período de incubación varía según la dosis infectiva y oscila entre 1 y 3 semanas en el caso de la Fiebre Tifoidea. En el caso de la Fiebre Paratifoidea el período de incubación es más corto (1 a 10 días) y revisten menor gravedad (Everest *et al.*, 2001).

El mecanismo de patogenia mejor estudiado es el correspondiente a *S. Typhi*. Las bacterias ingeridas llegan al intestino delgado y vía células M de las placas de Peyer migran a los linfonodos mesentéricos donde se multiplican.

Desde el sistema linfático son liberadas al torrente sanguíneo, lo que permite su rápida dispersión (bacteriemia primaria transitoria).

Las bacterias son eliminadas de la sangre por los macrófagos que recubren los sinusoides del hígado, bazo y médula ósea, donde se multiplican activamente. De ahí regresan a sangre (bacteriemia secundaria) hecho que marca el inicio de las manifestaciones clínicas. Estas comienzan con incrementos diarios y graduales de la temperatura, acompañados de síntomas pseudo-gripales (malestar general, anorexia, cefaleas) e incluso problemas neurológicos. Las bacterias vuelven a ser retiradas de la sangre por los macrófagos y vía hígado pueden alcanzar la vesícula biliar. Esto permite la reinfección del tracto intestinal, estableciéndose las bacterias en las placas de Peyer del íleon distal. Tres semanas después del inicio de la infección pueden producirse hemorragias en la zona ulcerada, e incluso perforación intestinal con peritonitis y septicemia subsiguiente. Esta última es la causa más frecuente de muerte por Fiebre Tifoidea.

La manifestación clínica más común de la Fiebre no-Tifoidea causada por serotipos no tifoideos de *S. enterica* es la inflamación intestinal aguda, que puede afectar al intestino delgado y/o al grueso (enteritis o enterocolitis). Generalmente, la bacteria penetra en el hospedador vía digestiva a través de alimentos o agua contaminados. Para la mayoría de los serotipos la dosis infectiva mínima se sitúa alrededor de 10^5 - 10^6 bacterias. Una vez ingeridas, las bacterias alcanzan el estómago donde se enfrentan al jugo gástrico y a un pH muy ácido, lo que reduce el número de microorganismos viables. Aquellos capaces de sobrevivir pasan al intestino donde deberán resistir los ácidos grasos bactericidas producidos por la microbiota normal del hospedador, la secreción de mucina, la continua eliminación de células epiteliales y el peristaltismo intestinal que evitan la colonización. Además, la monocapa celular del epitelio intestinal supone una barrera física

a la entrada de microorganismos e invasión de tejidos más profundos (Pestka *et al.*, 1985) (Figura 3).

Las bacterias que escapan a la primera línea de defensas intestinales, colonizan el ileon y/o el colon e invaden el epitelio. El mecanismo de invasión implica la unión inicial a receptores específicos de la superficie de la célula hospedadora, seguida por la internalización forzada por la propia bacteria (Wallis y Galyov, 2000). La invasión depende de la actuación de un sistema de secreción tipo III (SST3), codificado por la isla de patogenicidad IPS-1. Una vez invadido el epitelio intestinal, las bacterias se traslocan rápidamente alcanzando la lámina propia. Aquí, su reconocimiento por receptores localizados tanto en la superficie de macrófagos como en la cara interna de las células intestinales, origina la producción de más citoquinas (CXC) por ambos tipos de células. Esto provoca la afluencia masiva de polimorfonucleares, señal de identidad de la diarrea inflamatoria causada por los serotipos no tifoideos de *S. enterica*. Además, las células inflamatorias intentan fagocitar y destruir a las bacterias. *Salmonella enterica* posee la capacidad de sobrevivir en el interior de los macrófagos, gracias a la actuación de un segundo SST3, codificado por la isla de patogenicidad IPS-2 y de otros factores de virulencia. Los polimorfonucleares liberan prostaglandinas que tienen acción sobre el metabolismo de la enzima adenilatociclasa que incrementa los niveles de AMPc. El aumento de AMPc interrumpe la absorción de Na⁺ y aumenta la eliminación de Cl⁻, lo que lleva a una pérdida de agua por parte de la célula y provoca los evidentes signos de una diarrea (Salyers y Whitt, 2002). Los macrófagos que reconocieron y fagocitaron bacterias también liberan IL-12, responsable del inicio de la respuesta inmune específica. Esta interleucina actúa sobre los linfocitos T de tipo Th1, que a su vez liberan sustancias como el interferón gama, que activan a macrófagos adquiriendo estos la capacidad de destruir a las bacterias que sobreviven en su interior (Raffatellu *et al.*, 2006).

El período de incubación tras la ingestión de alimentos o agua contaminados con *Salmonella* oscila entre 8 y 72 h y el cuadro clínico se inicia con náuseas y vómitos seguidos de dolor abdominal y deposiciones diarreicas, normalmente de moderado volumen y que suelen contener polimorfonucleares (Mims *et al.*, 1995). Más de la mitad de los casos se asocian con fiebre con temperatura corporal de hasta 38 y 39°C. Es frecuente la aparición de cólicos abdominales. Con menos frecuencia se describieron síntomas como cefaleas, mialgias y otros síntomas de tipo sistémico (Miller y Pegues, 2000). Normalmente se trata de una enfermedad autolimitada, los síntomas desaparecen en un período de 2 a 5 días. En el caso de la enteritis, la enfermedad remite en 2 a 3 semanas. La remisión de los síntomas coincide con la puesta en marcha de la respuesta inmune específica del hospedador, que consigue controlar la infección, gracias a la activación de los macrófagos.

En pacientes aparentemente sanos las infecciones intestinales por *Salmonella* pueden evolucionar hacia infecciones extraintestinales.

Esto se relaciona con la incapacidad de los macrófagos de destruir a las bacterias ingeridas. Probablemente transportada por fagocitos, *S. enterica* se dispersa por el organismo inicialmente por vía linfática y después por vía sanguínea. Así se origina una bacteriemia que puede ser subclínica o sintomática, a consecuencia de la multiplicación bacteriana con riesgo elevado de evolucionar a septicemia. La septicemia puede transcurrir como infección no localizada, que se manifiesta con fiebre, cuyos síntomas pueden persistir varias semanas e incluso degenerar en shock séptico, debido a la actuación de la endotoxina a nivel de sistema circulatorio. Además, al diseminarse por el organismo, *S. enterica* puede llegar a colonizar diversos órganos, provocando infecciones focales que afectan fundamentalmente al tracto urinario, vesícula biliar, hígado, huesos,

etc. Se registraron también meningitis, neumonías, endocarditis y otros cuadros clínicos graves (Rodríguez *et al.*, 1998, 2006d; Benenson *et al.*, 2001).

Según datos de la OMS anualmente se registran millones de Salmonelosis no tifoideas, de las cuales sólo algunos miles terminan en muerte del paciente.

Después de la infección por *Salmonella* (infección intestinal, fiebre entérica o infección urinaria) la eliminación de la bacteria por las heces o la orina persiste durante algunas 4 a 5 semanas. En estos casos se considera el estado de portador convaleciente. También existe el estado de portador crónico asintomático, que constituye una forma de infección más frecuente que la inflamación intestinal aguda y puede deberse al contacto con dosis infectivas bajas de *Salmonella*. Se consideran igualmente portadores crónicos a aquellos que continúan eliminando *Salmonella* en heces por períodos superiores a un año, hecho que ocurre entre el 1% y el 3% de los pacientes con Fiebre Tifoidea, que llegan a excretar cantidades del orden de 10^6 - 10^9 bacterias por gramo de heces. En otros serotipos no tifoideos el estado de portador crónico se da en el 1% de los pacientes mayores de quince años y en el 5,4% de los menores de dos años (Jones y Falkow, 1996; Millar y Pegues, 2000).

La prevalencia de la Salmonelosis aumenta considerablemente en verano, especialmente en ancianos, niños e inmunodeprimidos. También reviste mayor gravedad cuando coexiste con otras enfermedades con otros patógenos.

La Salmonelosis puede afectar a todas las especies de animales domésticos, particularmente a especies de cría intensiva como gallinas ponedoras, cerdos y bovinos (Le Minor y Popoff, 1987). Los síntomas clínicos en los animales son mal estado general, fiebre, diarrea persistente, afectación de las vías aéreas, artritis, tenosinovitis, meningitis, orquitis, metritis y abortos. Los factores estresantes (hacinamiento, transporte, calor, etc.) y la edad (animales jóvenes) actúan como desencadenantes de la enfermedad. Las

variables que pueden asociarse con la presentación de Salmonelosis en los animales son la dosis infectiva, el serotipo la portación y expresión de factores de virulencia. Para el desarrollo de la enfermedad sintomática se requiere un inóculo de 10^6 - 10^8 bacterias de *Salmonella* (Mead, 1999). Sin embargo, los costos económicos suelen ser más altos cuando esta enfermedad cursa en forma asintomática, particularmente debido a la pérdida de ganancia de peso o a la baja en la postura de huevos. Asimismo, existe un costo oculto asociado con la contaminación de los productos finales (carne y huevo) que pueden ser decomisados.

1.5.- Ecología y reservorios de *Salmonella*

Los miembros del género *Salmonella* spp. están ampliamente distribuidos en la naturaleza, se los encuentra como comensales y como patógenos en el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves e insectos.

Según el grado de adaptación a un hospedador específico se puede clasificar a los serotipos en:

a) Serovariedades adaptados al hombre. Provocan infecciones en humanos y rara vez afectan a animales (*S. Typhi*, *S. Paratyphi* A, B y C, y *S. Sedai*). La infección se produce por heces de personas enfermas o de portadores asintomáticos y los vectores de transmisión son el agua, los alimentos y los insectos.

b) Serovariedades adaptados a especies animales. En este grupo se incluyen serotipos específicos de especie como *S. Gallinarum* que afecta a las aves, *S. Abortusovis* que afecta a los ovinos y *S. Abortusequi* que afecta a los equinos, entre otros.

c) Serovariedades no adaptados a hospedadores específicos. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y afectan tanto a los humanos como a los animales. Entre estas serovariedades podemos mencionar a *S. Enteritidis* y *S.*

Typhimurium, ya que son los principales agentes etiológicos de las Salmonelosis no-Tifoideas que se registran en el mundo. En este grupo también se pueden incluir *S. Choleraesuis* y *S. Dublin*, si bien son específicos de porcinos y bovinos, pueden causar infecciones en humanos.

La temperatura óptima de desarrollo de *Salmonella* es de 35 – 37 °C, con un rango de temperatura de 5 a 47 °C, desarrollan a pH entre 4 - 9, siendo su pH óptimo 6.5 - 7.5. Su crecimiento en medios líquidos se observó con un aW entre 0.945 y 0.999 (Koneman *et al.*, 1999).

Son incapaces de tolerar elevadas concentraciones de sal. *Salmonella* es destruida a las temperaturas de pasteurización de la leche (Linder, 1995). Estos microorganismos tienen requerimientos de crecimiento simples, aunque son muy sensibles a las altas temperaturas y a los desinfectantes comunes. Se demostró que al exponer carne molida de pollo contaminada con *S. Typhimurium* a 60°C durante 5 minutos fue posible eliminar 3×10^8 UFC/g. Sin embargo, *Salmonella* sobrevivió durante 13 meses a -20°C (Nagaraja *et al.*, 1995).

Los principales reservorios de *Salmonella* son los animales: aves y mamíferos domésticos y silvestres, reptiles, anfibios, peces e insectos. Como reservorios secundarios se encuentran aguas de pozo, suelo, camas utilizadas por aves y carcasas de animales. Estos microorganismos sobreviven en el ambiente durante períodos muy largos, aunque no se multiplican como en el sistema digestivo de sus hospedadores (Vadillo *et al.*, 2002; Acha y Szyfres, 2001).

La Salmonelosis asociada a animales exóticos también va en aumento, causando en algunos países entre un 3 y 5% de los casos. También está asociada sobre todo a animales de compañía como pájaros, roedores, perros y gatos. (Alvarez Martinez, 2007).

Rumiantes, aves y cerdos son importantes reservorios de *Salmonella enterica*. La cría intensiva de estos animales es una forma de perpetuar la presencia de este microorganismo en estas poblaciones. Este hecho intensifica el riesgo de contaminación de carnes, huevos y leche (Wray & Wray, 2000).

1.6- *Salmonella* en Alimentos

Cualquier alimento con riesgo de contaminarse con materia fecal humana o animal puede ser fuente de infección de Salmonelosis. La contaminación de los alimentos es en general paucimicrobiana y crea un riesgo potencial. Los errores cometidos en la cadena alimentaria y sobre todo en el momento de la preparación de las comidas, transforman el riesgo potencial en una verdadera multiplicación bacteriana (Linder, 1995).

Los alimentos perecederos y los que requieren manipulación, son los que con mayor frecuencia están involucrados en brotes alimentarios debido a este patógeno, y entre ellos los productos y subproductos cárnicos (Alcazár Montañez *et al.*, 2006), leche cruda, huevos, productos que contienen huevo y vegetales, entre otros (Gast *et al.*, 1998).

Sin embargo, debemos considerar que la dosis infectiva suele ser alta y que la presentación de la enfermedad depende de los factores de virulencia de la cepa. La dosis infectiva mínima de *Salmonella* spp. es $< 10^3$ UFC/g de alimento (Bergey's, 2005). Por lo tanto, para alcanzar la dosis infectiva, en la mayoría de los casos es necesario un período de multiplicación en el alimento antes de su consumo. Este hecho ocurre cuando se mantiene el alimento durante cierto tiempo a temperatura ambiente o en condiciones de escasa refrigeración (Elley, 1994).

1.7.- Transmisión de *Salmonella*

La puerta de entrada difiere según el serotipo y el hospedador, puede ser por vía oral, aérea o conjuntival. En determinadas especies animales la puerta de entrada puede ser intrauterina o transplacentaria (Pérez, 1974).

La principal fuente de infección para los seres humanos y los animales domésticos son mamíferos, aves, reptiles, peces e insectos (Figura 4).

Los animales domésticos destinados a la producción de alimentos para el hombre pueden enfermarse de Salmonelosis a partir del contacto directo o indirecto con animales portadores (convalecientes o crónicos). También pueden enfermarse debido al consumo de alimentos balanceados, por el consumo de agua contaminada o a partir de alimentos desechados por el hombre.

Los animales de producción de carne pueden ser fuente de contaminación en los frigoríficos, tanto de las carcasas como también del medio ambiente. A partir de los frigoríficos contaminados se pueden generar desechos contaminados, que luego de un procesamiento pueden ser utilizados como materia prima de alimentos balanceados destinados a los animales domésticos (harinas de carne, hueso, sangre, pescados, vegetales). Cabe mencionar que, en ocasiones, *Salmonella* sobrevive estos tratamientos y los alimentos balanceados se transforman en una peligrosa fuente de infección.

Las aves de corral y sus productos, sobre todo los huevos, son los vehículos de transmisión más importantes seguidos de carnes de vaca y cerdo y de productos lácteos. Las heces de las aves infectadas pueden ser la fuente de infección de huevos para consumo humano. *Salmonella* puede penetrar a los huevos a través de fracturas en la cáscara o por los micro poros, en particular cuando los huevos pierden frescura. Se demostró que hasta el 6% de *S. Enteritidis* puede colonizar el ovario y transmitirse por vía

trans-ovárica (transmisión vertical). Cabe mencionar que el estrés y el hacinamiento en los gallineros aumentan la diseminación de la Salmonelosis.

El agua para consumo humano y animal proveniente de napas profundas, puede contaminarse con materia fecal humana por filtración a partir de pozos ciegos. Las aguas superficiales sin tratamiento también pueden estar contaminadas por aguas negras.

El hombre adquiere la infección por *Salmonella* después de la ingestión de alimentos (vegetales, pescados, carnes, leche, huevos, alimentos manufacturados) o aguas contaminadas. Esta última vía de transmisión es característica de *S. Typhi* (Graeber *et al.*, 1995; Millar y Pegues, 2000). La infección puede también transmitirse de persona a persona o por vía fecal-oral. Otras fuentes de infección pueden ser los productos manufacturados a partir de leche sin pasteurizar, la misma leche sin tratamiento térmico, las frutas y hortalizas frescas mal lavadas o contaminadas a partir de la intervención humana. La superficie de estos vegetales puede estar contaminada con *Salmonella* debido a la utilización de agua contaminada para riego o a malas prácticas agrícolas, como por ejemplo la utilización de efluentes domiciliarios o heces animales como abono. La infección también puede deberse a la ingesta de medicamentos de origen animal no esterilizados, por vía intravenosa en transfusiones de sangre, incluso por instrumentos para estudios con fibra óptica mal esterilizados.

El conocimiento y la comprensión de las principales fuentes de infección de este patógeno son importantes para el diseño de las medidas de prevención y de control de las infecciones. La transmisión puede variar para cada serotipo y la importancia de las distintas fuentes de infección varía para cada uno de ellos (Velilla *et al.*, 2004).

1.8.- Epidemiología de la Salmonelosis

La identificación de los factores que intervienen en el desencadenamiento de alguna enfermedad de origen infeccioso se basa en el estudio de la interacción del agente, el hospedador y el medio ambiente; cambios tales como el aumento poblacional del hospedador, la introducción de un nuevo patógeno o un cambio en el medio ambiente pueden ocasionar el brote de una enfermedad (Wobeser, 1981).

En la actualidad, existen numerosos sistemas de vigilancia de brotes de ETA y en particular de aquellos causados por *Salmonella* (Sam-Surv, 2005; Pulse-Net) cuyo objetivo básico y común es conocer la distribución de casos y las variables conducentes a los numerosos brotes de ETA registrados en el mundo, para que las autoridades sanitarias puedan implementar medidas de intervención con fundamento epidemiológico.

Entre los sistemas de vigilancia se incluyen aquellos basados en el laboratorio. En estos sistemas el alerta clínico-epidemiológico y de laboratorio debe ser sistemático a fin de detectar aislamientos relacionados que indiquen sospecha de un brote y por ende el inicio de su investigación para encontrar la fuente de contaminación, reservorios y vías de transmisión para realizar acciones de control.

En este contexto, se pueden citar el Proyecto “*WHO Global Salm-Surv*” coordinado por la Organización Mundial de la Salud, la Red “*Pulse-Net International*” coordinada por el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), la Red Interamericana de Laboratorios de Análisis de Alimentos (RILAA) coordinada por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), y la Red Nacional de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos (RENALOA) coordinada por el Ministerio de Salud de la República Argentina.

El Proyecto “*WHO Global Salm-Surv*” fue creado en el año 2000 por la OMS para el estudio, detección de brotes y control de enfermedades alimentarias, integrando

Laboratorios de Referencia, Laboratorios Nacionales y Regionales de Salud Pública y Veterinaria de 142 países. Tiene como metas la capacitación de analistas de laboratorios utilizando protocolos estandarizados, la capacitación en epidemiología e investigación de brotes, la generación de Bases de Datos Regionales y la implementación de Programas de Calidad Externa.

Durante el año 2006, se conocieron los resultados obtenidos en el marco del mencionado Proyecto, entre los que se encuentra la frecuencia de serovariedades de *Salmonella* en los diferentes continentes en el período 2000-2004.

La Red “*Pulse-Net International*” tiene como meta fortalecer la vigilancia de las ETA con componentes de las áreas humana, veterinaria y de alimentos utilizando la técnica de subtipificación molecular electroforesis en campo pulsado (PFGE). En América Latina se organizó una Red Regional denominada “*Pulse-Net América Latina*”, como parte de la Red Internacional.

1.9.- ETA y Salmonelosis en el mundo

La vigilancia de este patógeno en todas las etapas de la cadena de procesamiento de alimentos, constituye un elemento importante en la investigación de la epidemiología de la salmonelosis. Hay que destacar que los alimentos involucrados en los brotes son muy variados, aunque siempre están presentes los productos cárnicos, huevos y ovoproductos, como así también agua y alimentos manufacturados.

Según el CDC, entre 2006 y 2007 se registraron en Estados Unidos más de 250 brotes de Salmonelosis que afectaron a unas 5000 personas. Como es de esperar, la mayoría de los brotes se registraron durante los meses cálidos y los serotipos identificados con mayor frecuencia fueron *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*.

Los alimentos involucrados fueron huevo, leche, queso, alimentos a base de cremas, vegetales, panes y pollos, entre otros (CDC). Las principales causas identificadas de la contaminación de los alimentos fueron: utilización de materia prima contaminada, procesamiento térmico ausente o insuficiente y tiempo prolongado entre preparación y consumo.

Según la OMS, en Canadá la Salmonelosis alcanza 7.000 casos anuales y su distribución según el lugar de consumo de los alimentos contaminados fue domiciliario (41,7%), restaurantes (31,5%) y comedores institucionales (25,8%) (OPS/OMS).

Durante el año 2007 se notificaron 151.995 casos de Salmonelosis en la Unión Europea (UE) los alimentos principalmente involucrados en los brotes fueron pollo, pavo, huevo, cerdo, bovino, leche y subproductos, frutas y vegetales, pescados y productos pesqueros, entre otros. Se observó un aumento estacional de los casos en verano y otoño. Como en años anteriores, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* fueron los serotipos más frecuentes. Entre los aislamientos de *S. Typhimurium* se identificaron 739 cepas DT104 (EFSA, 2009). Otros serotipos asociados con Salmonelosis humana en la UE fueron *S. Infantis*, *S. Dublin*, *S. Virchow*, *S. Newport*, *S. Stanley*, *S. Hadar*, *S. Derby*, *S. Kentucky*, *S. Agona*, *S. Rissen*, *S. 1,4,5,12:i:-*, y *S. London*, entre otros (EFSA, 2009).

En Inglaterra y en Gales, el sistema de vigilancia de las ETA reconoció a la carne de cerdo, a la carne picada y a los embutidos (ICMSF, 1996) como alimentos implicados en infecciones por *Salmonella* spp. La contaminación cruzada de las manos de los operarios y la de utensilios, puede diseminar las bacterias a los canales y en alimentos no contaminados. En ambos países en el año 2006, se dieron 119 casos de infecciones con *Salmonella* Ajiobo, esto debe compararse con los 7 casos reportados entre 1990-2005 (Gillespie *et al.*, 2006)

En Suecia se reportaron 15 casos entre diciembre de 2005 y agosto de 2006, que fueron atribuidos a la ingesta de almendras como agente causal (Ledel Muller *et al.*, 2007).

En Luxemburgo en 2006, se produjeron 2 brotes importantes de salmonelosis, que involucraron 133 casos, con un muerto, el agente causal fue la producción local de carne de cerdo (Mossong *et al.*, 2006).

Un brote de *S. Enteritidis* en Austria entre 2000-2003 pone de manifiesto la relevancia de la carne de pollo como vehículo de infecciones humanas con este serotipo, pero también se debería tener en cuenta que la causa de la infección también podría ser la contaminación cruzada (Berghold *et al.*, 2004).

En junio de 2006 un total de 54 casos fueron verificados por el Laboratorio Nacional de Referencia de Noruega. El producto del que fue aislada la *Salmonella* fue un paquete abierto de salame estilo danés, que fue la causa del brote. Luego se halló *Salmonella*, también en un paquete cerrado del producto, por lo que se ordenó el recall de la mercadería ese mismo día (Emberland *et al.*, 2006). En el mismo año, se diagnosticó *S. Typhimurium* en un cargamento de salchichas curadas de origen español que fue llevado en ferry desde Alemania (Nygard *et al.*, 2007).

Un brote de *S. Typhimurium* ocurrido en Italia, Roma durante la primavera del 2004, en el que la evidencia epidemiológica implica a un salame de cerdo en el brote (Luzzi *et al.*, 2007).

En el Reino Unido un brote afectó en junio de 2006 a 49 chicos entre 10 y 14 años en una fiesta de caridad y el agente causante fue *Salmonella* Enteritidis consumida en la mayonesa de huevo (Morgan *et al.*, 2007).

En América Latina, las ETA representan alrededor del 70% de los casos de enfermedad diarreica aguda. Según estimaciones de la OMS y de acuerdo con datos

reportados al SIRVETA durante el período 1993-2002 se registraron 6332 brotes de ETA en 22 países de la región que afectaron a 230.141 personas, de las cuales 317 murieron. El 26% de los brotes no tuvieron diagnóstico de laboratorio para identificar los agentes etiológicos. De los brotes con información de laboratorio el 45% fue por bacterias, el 21% por virus y 20% por toxinas marinas. El restante 14% se distribuye entre parásitos, contaminantes químicos y toxinas de productos vegetales.

Los tres alimentos que se asocian con mayor frecuencia a los brotes reportados son agua (23%), pescados (18%) y carnes rojas (12%) (SIRVETA). Cabe mencionar que existe un importante sub-registro, y según el país, se deben contemplar carencias en los métodos de diagnóstico o falta de diagnóstico en determinados grupos de agentes etiológicos.

La pobre notificación sanitaria, reconocida por los propios organismos encargados de llevar las estadísticas, hace que en América Latina no se tenga una idea acabada sobre el impacto de *Salmonella* sobre la salud y la contaminación de los alimentos.

Países como Brasil y Cuba, que reportaron datos durante todo el período (1993-2002), presentan una mayor cantidad de brotes. Lamentablemente, la mayoría (87,4%) de los aislamientos de *Salmonella* reportados en el SIRVETA no fueron serotipificados. Sin embargo, se destacan *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Mbandaka*, *S. Typhi*, *S. enterica* subespecie *arizonae*, *S. Glostrup*, y *S. Agona*.

En Colombia, en el año 2005, se reportaron por el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública, SIVIGILA (Ministerio de la Protección Social, Instituto Nacional de Salud) 7941 casos de ETA. Los productos alimenticios comúnmente asociados a los brotes fueron: pescados (22%), agua (20%) y carnes de ganado (14%).

En Uruguay, en el año 1995, *Salmonella* spp. fue reconocido nuevamente como agente etiológico de ETA, por lo que se lo consideró como un patógeno re-emergente.

En la ciudad de Santiago de Chile entre 1999-2000, se realizó un estudio sobre la situación epidemiológica de ETA. En el mismo el SESMA (Servicio de Salud Metropolitano del Ambiente) analizó en forma retrospectiva los brotes de ETA notificados. En los brotes confirmados, se realizó una investigación epidemiológica, recolectando muestras de los alimentos sospechosos y de las deposiciones de los pacientes. En las muestras correspondientes a alimentos se buscó *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *E. coli* enterohemorrágico, *E. coli* enterotoxigénico, *C. perfringens* y *B. cereus*.

Como resultado se destacó la asociación existente entre el queso de cabra y los brotes de diferentes agentes bacterianos como *Salmonella* spp., *S. aureus* y *Shigella* spp., y entre la carne molida y la presencia de *E. coli* diarreogénicas (Prado *et al.*, 2002).

1.10.- Situación en Argentina

En Argentina, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), dependiente del Ministerio de Salud de la Nación, registra semanalmente todas las notificaciones establecidas por la Ley Nacional 15.465. De acuerdo a las notificaciones de los últimos 3 años, en nuestro país se producen entre 450.000 y 500.000 episodios de diarrea por año, de los cuales entre el 40% y el 50% corresponde a menores de 5 años. Si bien no se especifican las causas o el agente causal, la OMS estima que el 70% de las diarreas son provocadas por el consumo de alimentos o agua contaminados. Por ende, en Argentina, entre 315.000 y 350.000 episodios de diarrea por año estarían vinculados con ETA.

Las ETA causadas por *Salmonella* spp. son de notificación obligatoria (Ley 15.465) y entre ellas se incluye únicamente a Fiebre Tifoidea y Paratifoidea, cuyos agentes etiológicos son *S. Typhi* y *S. Paratyphi*. De esta manera los casos de Salmonelosis notificadas no son de notificación obligatoria y en el SINAVE se las incluye entre las diferentes

causas de diarrea, por lo cual no se conocen cifras reales sobre el impacto de esta enfermedad en la Argentina. Al considerar los escasos datos disponibles es evidente que *S. Enteritidis* es la serovariedad más frecuentemente aislada de humanos y alimentos de consumo humano y animal (Caffer *et al.*, 2007).

En Argentina, a partir de 1972 se serotifican las cepas de *Salmonella* en forma continua. Sin embargo, no se diferencia la notificación de casos de Fiebre Tifoidea de Fiebre Paratifoidea, y la infección por *Salmonella* no se informa en la planilla C2 de notificación obligatoria, salvo en casos de brotes.

Entre 1993 y 2002 ocurrieron 152 brotes de ETA que afectaron a 3.309 personas, de las cuales 4 fallecieron, el 33% de los brotes de ETA causados por *Salmonella* spp. se produjeron por consumo de agua contaminada y el 27% fue debido al consumo de carnes rojas (SIRVETA, 2000).

Según lo reportado en el (BEP N° 30) entre 2004 y 2005 en el Laboratorio Nacional de Referencia de Enterobacterias (LNRE, INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”), se analizaron 961 aislamientos de *Salmonella* spp. de origen humano remitidos de la mayoría de las provincias. El mayor porcentaje de cepas, procedió de Buenos Aires, CABA, Mendoza y Salta.

Las cepas fueron aisladas de materia fecal (94,7%), hemocultivo (3,7%) y de otros animales (1,6%), incluyendo urocultivo, líquido ascítico, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, abscesos, secreción de oído, hueso y vómito. Las 5 serovariedades prevalentes, en el período 2004-2005 fueron *S. Enteritidis* (36%), *S. Typhimurium* (20,5%), *S. Infantis* (8,7%), *S. Newport* (5,3%) y *S. Agona* (4,9%), siguiendo la misma tendencia que en los años 2002-2003. (BEP N° 30).

Desde el año 2000, en el LNRE se implementó una base de patrones de electroforesis en campo pulsado, esta técnica permite establecer la relación genética

entre aislamientos y representa una valiosa herramienta para la vigilancia epidemiológica y el estudio de brotes causados por dichos patógenos. En el 2004, el LNRE se integró a la red Pulse-Net y fue designado Laboratorio de Referencia Regional para América Latina.

Durante los años 2009, 2010 y 2011, en Argentina se reportaron 26, 14 y un caso de Fiebre Tifoidea y Paratifoidea cada 10.000 habitantes, respectivamente (Boletín semanal vigilancia epidemiológica). Como se mencionó anteriormente, debemos considerar que los principales serovares de *Salmonella* spp. asociados a ETA no están incluidos en el informe oficial debido a que no son causa de Fiebre Tifoidea y Paratifoidea.

Si bien el conocimiento de las ETA aumentó con el transcurso de los años, la Salmonelosis no-Tifoidea es la ETA de origen bacteriano más prevalente en el mundo y particularmente en América Latina (Global Salm-Surv 2005).

1.11.- Detección de *Salmonella* spp. a partir de alimentos

Según las especificaciones del Código Alimentario Argentino (CAA) los alimentos no deben estar contaminados con *Salmonella* spp. Sin embargo, los datos oficiales respecto a alimentos contaminados con *Salmonella* spp. son escasos. En la Provincia de Buenos Aires durante 2001 y 2005 se analizaron 991 muestras de productos cárneos y lácteos, procedentes de establecimientos elaboradores y bocas de expendio. Este trabajo se realizó en base a microorganismos indicadores de higiene y de contaminación fecal (coliformes totales y coliformes fecales y *E. coli*) y microorganismos patógenos (*Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo, *E. coli* O157:H7/NM). Del total de 19 muestras positivas a patógenos, se encontró que el 15,79% de los aislamientos correspondió a *E. coli*, el 15,79% a *E. coli* O157:H7, 15,79 % a *Salmonella* spp., el 10,53% a *S. aureus* coagulasa positivo y la mayor frecuencia correspondió a *L. monocytogenes* con un 42,10%. En referencia a los recuentos de

patógenos la contaminación más frecuente con *Salmonella* spp. es en carne molida y chacinados cocidos (Michelena, 2008).

La producción de alimentos libres de *Salmonella* spp. no es un tema prioritario únicamente para la salud pública, sino que también es prioritario para la cadena de producción-comercialización de estos alimentos. Es por ello que la legislación a nivel nacional y regional (CAA) e internacional (Mercosur, CODEX ALIMENTARIUS) considera la ausencia de *Salmonella* spp. como criterio obligatorio para muchas categorías de alimentos y en particular para los alimentos de origen animal.

En el CAA existe una aparente heterogeneidad respecto de las metodologías recomendadas para la detección, aislamiento y confirmación de *Salmonella*. Esta observación es un reflejo de las diferentes épocas en las cuales fueron adoptados los criterios microbiológicos, muchos de los cuales fueron revisados o modificados recientemente y otros no.

En el CAA, artículo 255 se establece como parámetro microbiológico obligatorio para carne molida o picada fresca la ausencia de *Salmonella* spp. y para su análisis se recomienda el manual de Bacteriología Analítica de FDA (BAM) Capítulo 5 *Salmonella* o equivalente. Las metodologías recomendadas para el aislamiento y caracterización de *Salmonella* spp. en productos y subproductos cárnicos son costosas y requieren demasiado tiempo hasta obtener un resultado preliminar. Actualmente surgen otras alternativas diagnósticas, como los métodos rápidos basados en biología molecular que permiten la detección de microorganismos en los alimentos en menor tiempo.

1.12.- Reacción en cadena de la polimerasa

El avance en la Biología Molecular permitió el desarrollo de diversos métodos alternativos para la detección de bacterias patógenas a partir de diferentes matrices

alimentarias, los cuales proporcionan ventajas en cuanto a eficiencia, sensibilidad y disminución del tiempo de detección. Estos métodos rápidos, por estar basados en la determinación de ácidos nucleicos, tienen la potencialidad de ser muy específicos. Tal es el caso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la técnica PCR en tiempo real (RT-PCR), ambas tecnologías moleculares basadas en la amplificación *in vitro* del ADN (Malorny, 2004). Los métodos moleculares permiten la detección y cuantificación de ADN específico de la bacteria blanco a partir de un número muy reducido de moléculas en la muestra. Además, no permite únicamente detectar al patógeno, sino que también se pueden detectar genes que codifican para otras proteínas involucradas en la patogenicidad como adhesinas, endotoxinas, exotoxinas que revisten importancia en la práctica microbiológica. Por esto, en los últimos años se estimuló la utilización de técnicas moleculares tanto en las etapas de tamizaje como en las etapas de confirmación e identificación del diagnóstico bacteriológico.

La PCR permite producir múltiples copias de un fragmento de ADN específico *in vitro*, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Esta metodología se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa, que permite fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente.

El material de inicio es ADN templado o blanco (en el caso de las bacterias, el material de inicio es ADN bicatenario).

La mezcla de reacción (*master mix*) contiene:

- Polimerasa: como su nombre lo indica, esta metodología se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa, que permite fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Esta enzima requiere de una pequeña cadena de ADN con un extremo 3'OH libre para comenzar a funcionar, esta secuencia recibe el nombre de cebador. La polimerasa más utilizada es *Taq*, aunque existen

otras variantes más específicas.

- Cebadores (*primers*): son oligonucleótidos (20-30 bases) que presentan una secuencia complementaria a los extremos de la región de ADN que se desea amplificar.
- Nucleótidos (dNTP): en forma de nucleótidos trifosfato (ATP, CTP, TTP y GTP), se deben incorporar a la reacción como una mezcla de iguales cantidades de cada uno de ellos.
- Cloruro de magnesio (Cl_2Mg): el Mg^{2+} se debe incorporar en concentraciones adecuadas en forma de Cl_2Mg en el momento de preparar la mezcla de reacción, ya que actúa como cofactor enzimático y contribuye a la estabilización de los fragmentos de ADN.
- Buffer de PCR: es provisto con la polimerasa en una concentración 10X.
- Agua de calidad molecular.

Cada ciclo de amplificación consiste típicamente en tres temperaturas, en las cuales los fragmentos de ADN experimentan diferentes procesos fisicoquímicos (desnaturalización, hibridación y extensión) con el fin de replicarse hasta que se produce la acumulación de suficiente producto que pueda ser detectado.

En el primer paso se incuba la muestra a aproximadamente 94°C para permitir la desnaturalización de las dos cadenas complementarias del ADN molde. Esto es seguido por la hibridación de un par de cebadores o *primers* complementarios a los extremos del ADN templado que se va a amplificar. La temperatura de incubación en este paso depende la secuencia de ADN de los cebadores y de la concentración de sales en la mezcla de reacción. Finalmente, cada ciclo se completa mediante una etapa de extensión a 72°C, donde la polimerasa sintetiza a partir de los cebadores la nueva cadena

complementaria de ADN en la dirección 5' a 3'. Una amplificación estándar tiene entre 30 y 40 ciclos.

Si bien, las técnicas basadas en PCR son una poderosa herramienta para la detección de patógenos a partir de alimentos, pueden generar diferentes resultados entre laboratorios debido a la falta de validación de protocolos estandarizados, a la variabilidad de equipos y reactivos, y a la posible interferencia de la matriz con la reacción de PCR. Para reconocer estos posibles inconvenientes se utilizan controles de sistema, controles externos y controles internos. Como control de sistema se usa la misma mezcla de reacción de PCR sin ADN templado. Los controles externos positivos y negativos son templados conocidos, que se analizan en tubos independientes del ADN problema.

La RT-PCR es una técnica desarrollada a mediados de los años 90 con el objetivo principal de cuantificar el ADN templado presente en una muestra de ADN. La RT-PCR se basa en la detección de una señal fluorescente proporcional al producto de amplificación en cada ciclo de PCR. La PCR cuantitativa se realiza en termocicladores con sistemas de detección de fluorescencia y recolección de los datos en tiempo real.

Las diferencias entre PCR convencional o PCR de punto final y RT-PCR son más fáciles de comprender si se analiza la cinética de reacción de la PCR. Una PCR posee usualmente 3 fases: exponencial, no exponencial y *plateau*. Al inicio de la reacción todos los componentes están presentes en suficiente cantidad y la amplificación ocurre de una manera exponencial, duplicándose en cada ciclo la cantidad de ADN. Con el progreso de los ciclos comienzan a escasear los reactivos de la PCR, la velocidad de incremento en el número de amplicones disminuye y la reacción continúa de forma no exponencial. Luego de unas rondas más de amplificación la PCR no genera más templados debido a la pérdida de algunos componentes críticos de la reacción, entrando en la fase final conocida como *plateau*.

En la PCR de punto final los productos de amplificación son analizados por electroforesis en geles y visualizados mediante la utilización de colorantes como el bromuro de etidio. Este proceso se realiza con el producto final de la PCR, que se obtiene en la fase de *plateau* de la reacción.

En este punto, es extremadamente dificultoso realizar una adecuada cuantificación porque la PCR genera la misma cantidad de producto independientemente de la cantidad inicial de templados presentes. A su vez, la detección por punto final es muy costosa en tiempo, dado que hay que esperar a que termine la reacción para cargar la muestra en el gel y realizar la electroforesis.

Existen dos alternativas en cuanto a la química de fluorescencia de la RT-PCR:

- 1) utilización de moléculas que se unen al ADN de cadena doble como el Sybr Green.
- 2) utilización de oligonucleótidos fluorogénicos de secuencia específica.

Los colorantes (*dyes*) de unión al ADN son la base de los métodos inespecíficos de detección de RT-PCR. La mayoría de las moléculas fluorogénicas utilizadas interactúan con la hendidura menor de la doble hélice de ADN. Estos colorantes emiten una mínima fluorescencia cuando se encuentran libres en la solución pero generan una fuerte señal cuando se unen al ADN de cadena doble y son expuestos a una longitud de onda capaz de excitarlos. Uno de los colorantes más utilizados en RT-PCR es el Sybr Green.

Los métodos inespecíficos de marcaje fluorescente son relativamente menos costosos, ya que no requieren del diseño de oligonucleótidos o conjugados químicos y se encuentran mínimamente afectados por pequeños cambios en la secuencia blanco que pueden impedir la hibridación del oligo fluorescente. Sin embargo, los dímeros de cebadores formados y otros productos de amplificación inespecíficos compiten por la unión a los fluoróforos e interfieren en la interpretación de los resultados. Desafortunadamente, la formación de dímeros es más frecuente cuando existe un reducido número de copias

iniciales de templado, hecho bastante frecuente en los estudios de búsqueda de microorganismos.

La formación de dímeros de cebadores puede ser revelada observando la curva de temperaturas de disociación o Melting del ADN (T_m). Dado su menor tamaño, los dímeros poseen una T_m inferior que la secuencia amplificada. Sin embargo esta metodología de ajuste no es aplicable cuando la T_m de ambas secuencias son similares o no son discernibles con el equipo de RT-PCR utilizado.

Ventajas de los mecanismos de detección inespecíficos

- La cantidad de fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de productos de PCR.
- Se puede aplicar al estudio de cualquier secuencia de ADN de cadena doble.
- Al no requerir sondas específicas, se reduce el costo y el tiempo de puesta a punto.

Desventajas de los mecanismos de detección inespecíficos

- Pueden generarse falsos positivos dado que los colorantes no específicos se unen a cualquier ADN de cadena doble incluyendo los productos inespecíficos como los dímeros de cebadores.
- Se requiere el análisis de la curva de disociación de ADN al final de la PCR para verificar la formación de productos inespecíficos.

La adopción de sondas de oligonucleótidos fluorescentes agregó un nuevo nivel de especificidad a la RT-PCR mediante la confirmación de un fragmento del amplificado en adición a la especificidad aportada por el par de cebadores externos.

Las metodologías de PCR cuantitativas de detección específica utilizan el efecto de transferencia energética de resonancia fluorescente (FRET, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*). La FRET se basa en la proximidad e interacción de un fluoróforo dador o “*reporter*” y un fluoróforo aceptor o “*quencher*”. Los fluoróforos dadores son moléculas

que al absorber energía, pasan a un estado excitado, retornando al estado inicial mediante la liberación de energía en forma de fluorescencia. Los "*quenchers*" son moléculas que aceptan la energía emitida durante la des-excitación de un fluoróforo y la disipan en forma de calor más que en fluorescencia.

Aunque las técnicas de RT-PCR basadas en sondas FRET son mucho más específicas que los métodos de detección que utilizan Sybr Green, son más costosas y requieren una mayor validación y optimización.

Los colorantes fluorescentes unidos a las sondas deben poseer ciertas características para ser de utilidad en la RT-PCR:

- Diferentes longitudes de onda de absorción y emisión de fluorescencia.
- Fácil y fuerte unión al ADN de la sonda.
- Señal detectable a bajas concentraciones.
- Producción de una señal fluorescente diferencial cuando la sonda se encuentre hibridada al producto de amplificación.
- Resistencia a elevadas temperaturas.
- Falta de inhibición de la actividad de la polimerasa.

Para el diseño de una sonda fluorogénica se deben tener en cuenta algunas consideraciones generales:

- Tamaño entre 15 a 35 nucleótidos.
- Contenido en C+G de 40 a 60%.
- No deben contener bases repetidas contiguas y en particular G.
- No deben hibridar con los cebadores externos.
- Poseer un T_m 5°C mayor que los cebadores para permitir su unión al templado antes del comienzo de la fase de extensión.

Existen varias sondas de ADN específicas utilizadas en la RT-PCR: Las Sondas TaqMan®, actualmente son las más utilizadas. En adición a los cebadores externos, esta metodología utiliza un tercer oligonucleótido interno conocido como sonda. El colorante fluorescente dador, típicamente FAM™, se encuentra unido al extremo 5' de la sonda y el aceptor, generalmente TAMRA™ está unido al extremo 3'. Actualmente, TAMRA™ está siendo reemplazado por los dadores de tipo BHQ (*Black Hole Quenchers*) porque proveen una menor fluorescencia de fondo. En tanto que las moléculas dadoras y aceptoras se encuentren estrechamente cercanas (alrededor de 100 Å), la fluorescencia del dador es secuestrada por el colorante receptor y no es detectada. En las sucesivas etapas de extensión de la cadena de ADN la polimerasa encuentra y degrada el extremo 5' de la sonda hibridada a la cadena molde mediante su actividad 5'-3' exonucleasa. Como consecuencia de ello, los colorantes emisor y aceptor son liberados por separado a la solución y la fluorescencia comienza a ser detectada.

En el mercado hay disponibles *Kits* comerciales que adoptan este sistema. Uno de ellos es el sistema Foodproof® *Salmonella* Detección Kit – 5' nuclease (Merck), se basa en la utilización de sondas TaqMan marcadas con un colorante dador FAM unido al extremo 5' terminal y un *quencher* unido al extremo 3' terminal de la sonda. El sistema incluye un control interno de amplificación competitivo y su sonda específica marcada en su extremo 5' terminal con HEX. Estas sondas se unen al ADN producto del proceso de amplificación y genera una alta especificidad. En estos *kits* se incluye mezcla de reacción, *Taq* DNA polimerasa, Uracil-DNA-Glycosylase (UNG) para eliminar cualquier ADN generado en el laboratorio, controles externos y control interno en tubos separados.

Ventajas del sistema de RT-PCR TaqMan

- Para generar la señal fluorescente se requiere una hibridación específica entre la sonda y el ADN templado.
- Las sondas pueden ser marcadas con diferentes fluorocromos, permitiendo la detección de múltiples secuencias en un solo tubo de reacción.

Desventajas del sistema de RT-PCR TaqMan

- La química TaqMan requiere la síntesis de diferentes sondas para cada secuencia a amplificar, haciendo el ensayo específico pero al mismo tiempo más costoso.
- Se requiere el análisis de la curva de disociación de ADN al final de la PCR para verificar la formación de productos inespecíficos.
- El diseño de los métodos basados en sondas es un tanto más complejo de optimizar que los ensayos basados en Sybr Green.

1.13.- Validación de métodos analíticos

Se define como validación a la confirmación de los resultados obtenidos por una determinada técnica mediante la provisión de evidencia objetiva, de que se cumplieron requisitos particulares para un uso pretendido y específico (Trullols *et al.*, 2004).

Según la rigurosidad de las diferentes etapas de validación, es posible clasificar a los métodos analíticos de la siguiente manera:

I) métodos del propio laboratorio, **II)** métodos de revistas científicas, **III)** métodos oficiales y **IV)** métodos estándar.

Se define como método cualitativo, a aquel cuya respuesta se basa en la presencia o ausencia del analito, detectado directa o indirectamente en una cierta cantidad de muestra (Feldsine *et al.*, 2002).

Según (Trullols *et al.*, 2004), para validar un método cualitativo se deben incluir los siguientes parámetros:

a) Rango de trabajo: intervalo de concentración en el cual el analito puede determinarse con un adecuado nivel de confianza y precisión. Bajo el concepto de rango de trabajo se incluyen los términos límite de detección y límite de corte.

- Límite de detección es la menor concentración de analito detectable, y límite de corte es la cantidad óptima de analito detectable.
- El límite de corte se establece mediante la concordancia entre un grupo de resultados obtenidos al aplicar repetida e independientemente el mismo método analítico en alícuotas de la misma muestra.

b) Selectividad: parámetro que permite ponderar la detección de la mayor cantidad de microorganismos especificados por parte de la técnica evaluada y la ausencia de reacción positiva con otros géneros y especies relacionados.

La selección de un mínimo de 50 cepas puras de microorganismos relacionados y la selección de un mínimo de 30 cepas potencialmente competitivas deben ser analizadas como cultivos puros. Bajo el concepto de selectividad se incluyen los términos exclusividad e inclusividad (Feldsine *et al.*, 2002; NordVal, 2004).

Exclusividad es la habilidad del método de no detectar un rango relevante de cepas relacionadas que pueden provocar reacciones cruzadas.

Inclusividad es la habilidad del método alternativo de detectar un rango de cepas verdaderamente positivas para los analitos blanco (Feldsine *et al.*, 2002).

c) Robustez: resistencia de un método al cambio de respuesta cuando se introducen pequeñas variaciones deliberadas a los parámetros del mismo.

Deben especificarse las condiciones diferentes para poder identificar cuáles son los factores de la técnica que pueden afectar la robustez. Deben determinarse como mínimo

10 resultados y todos los pasos del método, incluidas la toma y preparación de la muestra, deben realizarse n veces (Organismo Argentino de Acreditación, 2003).

1.14.- Prevención y control

La implementación de estrategias de prevención y control requiere una coordinación intra e intersectorial con grupos multidisciplinarios de intervención que comprenda salud humana, sanidad animal y vegetal, salud ambiental, vigilancia epidemiológica, cadena agroalimentaria, organismos reguladores de control, redes de laboratorios y de informática, y fundamentalmente la educación de la comunidad sobre seguridad alimentaria.

Las medidas de intervención para prevenir y controlar la Salmonelosis en las poblaciones humanas deben cubrir todas las etapas de producción de los alimentos "desde la granja a la mesa". Para ello, se necesita contar con la decisión política de controlar esta enfermedad, contemplando los costos económicos y sociales que implica el control de las ETA.

La reducción en el nivel de contaminación por *Salmonella* spp. en los productos cárnicos hace necesaria una profunda revisión de todos los puntos críticos que intervienen en la cadena alimentaria. La importancia de los distintos niveles que participan en la producción y comercialización de los productos de origen animal debe ser completa, desde los mercados de materias primas para piensos hasta las carnicerías, supermercados y el propio consumidor, pasando por las fábricas de alimento, las granjas, los mataderos y salas de despiece, los puntos de venta, los restaurantes y el hogar de los consumidores.

Por lo tanto el control de *Salmonella* spp. en la cadena alimentaria es un objetivo complicado debido a las relaciones existentes entre la contaminación medioambiental, los animales de producción y el hombre. El control de alimentos debe incluir el muestreo y

análisis desde la materia prima hasta el producto final. Otro elemento esencial en la prevención de la Salmonelosis humana es la educación tanto de manipuladores de alimentos como de los consumidores.

Las estrategias de prevención y control utilizadas para la capacitación del personal afectado a la manipulación y procesamiento de la carne molida están basadas en las Buenas prácticas de Manufactura (BPM), teniendo en cuenta que en el ámbito nacional el CAA incluye en el Capítulo II la obligación de aplicar BPM, y la Resolución MERCOSUR 80/96 indica la aplicación de las mismas para los establecimientos elaboradores que comercialicen sus productos en dicho mercado.

La aplicación de las BPM, así como los Procedimientos Estandarizados de Sanitización (POES) y el Manejo Integrado de Plagas (MIP), constituyen una herramienta básica para la obtención de alimentos seguros para el consumo humano.

En cuanto a la educación de los consumidores, es de fundamental importancia la concientización sobre el manejo y almacenamiento seguro de los alimentos, la higiene en la cocina y el tratamiento culinario adecuado para limitar el riesgo de infección por *Salmonella* (Wray y Wray 2000).

2. OBJETIVOS

2.1.- Objetivo General

El objetivo del proyecto es prevenir la presencia de *Salmonella* spp. en la carne bovina molida destinada a consumo minorista. Para ello nos planteamos desarrollar y validar una técnica de PCR en tiempo real (RT- PCR) para la detección de *Salmonella* en muestras de carne bovina molida. Posteriormente, se propone analizar muestras de carne bovina molida a nivel de boca de expendio mediante una Norma Internacional para el aislamiento y caracterización *Salmonella* spp. utilizando la técnica de RT-PCR desarrollada y validada como tamizaje.

2.2.- Objetivos Específicos

Enmarcado dentro del objetivo general podemos elaborar dos objetivos específicos centrales:

2.2.1.- Objetivo A

1. Desarrollar una técnica de RT-PCR para la detección del gen *invA* a partir del pre-enriquecimiento.
2. Validar la metodología desarrollada.

2.2.2.- Objetivo B

1. Determinar la presencia de *Salmonella* spp. en carne bovina molida a nivel de boca de expendio minorista utilizando la técnica de RT-PCR desarrollada y validada, una PCR de punto final y una técnica de RT-PCR comercial.

2. Analizar las muestras según la Norma Internacional BAM Capítulo 5 *Salmonella* (2007) – FDA.
3. Caracterizar los aislamientos de *Salmonella* spp. mediante técnicas fenotípicas y genotípicas.
4. Capacitar a los manipuladores de carne de los comercios analizados para prevenir la presencia de *Salmonella* spp.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Desarrollo de una técnica de RT-PCR para la detección del gen *invA* a partir del pre-enriquecimiento

3.1.1.-Diseño de cebadores

A partir de la secuencia del gen *invA* de *Salmonella enterica* (Accession number U43238) se realizó la búsqueda de secuencias homólogas en la base de datos de NCBI mediante el algoritmo BLAST. Se obtuvieron 78 secuencias homólogas de *Salmonella* spp. Se diseñaron cebadores *forward* (F) y *reverse* (R) en regiones conservadas de las secuencias alineadas mediante el software DNAMAN.

3.1.2.- Cepas

Se utilizaron 12 cepas de *Salmonella enterica* portadoras del gen *invA* (Tabla 1) de mayor importancia epidemiológica en Argentina, las mismas pertenecen al Laboratorio de Microbiología de Alimentos (LaMA, FCV-UNLP). Se colocaron en 5 ml de caldo cerebro corazón (CCC) (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) y se incubaron a 37°C durante 18 h.

3.1.3.- Extracción de ADN

La extracción del ADN se realizó de acuerdo a Leotta *et al.*, (2005). Un ml del caldo CCC fue centrifugado a 10.000 x g durante 5 min. Se descartaron 950 µl de sobrenadante y se agregaron 150 µl de buffer tritón (tritón X-100 (Merck, Darmstadt, Germany) al 1% en buffer 1X [10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8] a cada tubo. Luego de colocar los

tubos en bloque térmico (Dri-Block® DB-ZD) durante 15 min a 95°C, estos fueron centrifugados a 10.000 x g durante 5 min. De esta manera se obtuvo el ADN que se utilizó para realizar las RT-PCR desarrollada y validada y la PCR de punto final para la detección de *Salmonella* spp.

3.1.4.-Mezcla de reacción de PCR

La mezcla de reacción se realizó en una cabina exclusivamente utilizada para la preparación de mezclas de PCR (LaMA, FCV-UNLP). Se utilizó la mezcla de reacción Perfecta Sybr® Green FastMix™, Low ROX (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD, USA). La cual posee un buffer de reacción con concentraciones optimizadas de Cl₂Mg, dNTPs, AccuFast Taq ADN polimerasa, Sybr Green I, Dye de referencia ROX y estabilizadores de la reacción. A la mezcla de reacción se le incorporaron los cebadores diseñados (0,1 nmol/ul) y se llevo a volumen con agua tridestilada. Finalmente, se agregó el ADN templado en una concentración aproximada de 0,02 pg. El volumen final de cada mezcla de reacción fue de 20 µl.

3.1.5.- Controles

Como control positivo se utilizó una cepa de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 y como control negativo una cepa de *E. coli* ATCC 25922 (LaMA, FCV-UNLP). Cada una de las cepas se colocó en 5 ml de CCC (Biokar Diagnostics) y se incubaron a 37°C durante 18 h. La extracción del ADN se realizó según el punto 3.1.3. Además de los controles positivo y negativo, se utilizó un tubo sin ADN blanco como control de sistema.

3.1.6.-Condiciones de la RT-PCR

Para la amplificación se utilizó el programa Mx3005P Instrument Qualification Test 3, se seleccionó PCR Sybr® (con una curva final de disociación). El perfil térmico consistió en: un ciclo a 95°C durante 10 min, 40 ciclos de 10 seg de desnaturalización a 95°C, 30 seg de hibridación-extensión a 56°C y un ciclo final de extensión de 1 min a 95°C. Finalmente se realizó una rampa de disociación desde 55°C a 95°C, 30 seg. El tiempo de análisis total fue de 1 h y 36 min (Figura 5).

3.1.7.- Estandarización

La estandarización de la técnica de RT-PCR desarrollada para la detección del gen *invA* se realizó *in vitro* con cultivos puros de *Salmonella enterica* (Tabla 1) en diferentes concentraciones. Se determinó el rango de trabajo, el límite de corte y la robustez de la técnica desarrollada.

a) Rango de trabajo y límite de corte

Se determinó la probabilidad de detección del gen *invA* al comparar el número de resultados positivos con la concentración de cada cepa analizada. Para ello, se utilizó el ADN templado de cada una de las cepas analizadas en un rango de 10^4 a 10^1 UFC/20 μ l de mezcla de reacción de PCR. Los ensayos se realizaron por triplicado, por un mismo operador, en un intervalo de 1 a 2 días.

b) Robustez

Se utilizaron las 12 cepas enumeradas en la Tabla 1, además de los controles positivo y negativo. Se identificaron aquellas variables que podrían afectar el desempeño de la técnica, tales como realizar el ensayo en diferentes días y por diferente operador. Se

empleó como blanco el ADN correspondiente al límite de corte determinado. Los ensayos se realizaron por sextuplicado y se repitieron en las mismas condiciones, en 3 días consecutivos, por 2 operadores.

3.2.- Validación intra-laboratorio de la RT-PCR desarrollada

Se realizó la validación de la metodología según las recomendaciones de Feldsine *et al.*, (2002) y el Organismo Argentino de Acreditación (2003) para estudios pre-colaborativos, las cuales fueron avaladas por Trullols *et al.*, (2004).

3.2.1.- Cepas

Se utilizaron 50 cepas de *Salmonella* spp. (Tabla 2) y 30 cepas de diferentes géneros bacterianos que pueden estar presentes en la carne bovina molida (Tabla 3) las cuales pertenecen a la colección del LaMA (FCV-UNLP). Las diferentes cepas se colocaron en 5 ml de CCC (Biokar Diagnostics) y se incubaron a 37°C durante 18 h. La extracción del ADN de las cepas así como de los controles se realizó según lo explicado en el punto 3.1.3.

3.2.2.- Procedimiento

Se utilizaron 180 porciones de carne molida de 25 g cada una, previamente analizadas y libres de *Salmonella* spp. Ciento cincuenta porciones de carne molida fueron contaminadas experimentalmente con cepas de *Salmonella enterica*, en las siguientes concentraciones: 50 porciones con 10^1 UFC/25 g, 50 porciones con 10^2 UFC/25 g, y 50 porciones con 10^3 UFC/25 g. Treinta porciones se contaminaron con cepas no *Salmonella* en una concentración de 10^5 UFC/25 g. Las muestras fueron conservadas a -20°C

durante 3 meses. Cada muestra de carne molida se incubó en 225 ml de caldo de lactosado (BAM) Capítulo 5 *Salmonella* (2007) de la FDA. Luego de la incubación, se fraccionaron dos ml de cada caldo de enriquecimiento en tubos Eppendorf para realizar la extracción del ADN.

Cada muestra fue analizada simultáneamente con la técnica de RT-PCR desarrollada y con una técnica de PCR previamente validada (Malorny *et al.*, 2003) considerada *gold standard*. Cada 10 muestras se utilizaron dos sin inocular como controles de sistema.

PCR de punto final para la detección de *Salmonella* spp. (Malorny *et al.*, 2003)

La extracción de ADN se realizó según en punto 3.1.3. Para la mezcla de reacción se utilizaron los siguientes reactivos: Buffer de PCR 1X (Invitrogen), mezcla de dNTPs 0,2 mM (Promega), 2 pmol/μl de cada cebador F y R (Rhan *et al.*, 1992), 2 mM de Cl₂Mg (Invitrogen), 0,04 U/μl *Taq* polimerasa (Invitrogen) y 10,3 μl de agua tridestilada por tubo de reacción. Se fraccionó en 20 μl cada microtubo de PCR. Finalmente se agregó 5 μl de ADN templado. Se utilizó un termociclador My Cycler™ (BioRad). El perfil térmico consistió en un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 1 min; 38 ciclos a 95°C por 30 seg, 64°C por 30 seg y 72°C por 30 seg, y un ciclo a 72°C por 4 min de extensión final (Figura 6).

Luego de la amplificación se preparó un gel de agarosa al 2,5 % en buffer TAE 1X con 0,03 μg/ml de bromuro de etidio (Promega). El producto de amplificación se resuspendió en buffer de siembra (Xilene cyanol 0,25% y glicerol 30%). Se diluyó una parte del buffer de siembra 1X en 5 partes del amplificado. Como marcador de peso molecular se utilizó CienMarker (Biodynamics S.R.L., Buenos Aires, Argentina). Se realizó la corrida electroforética a 90 Volts por 45 minutos. Para documentar los geles se utilizó el

UV-transiluminador (modelo 2000, BioRad, Hercules, California, USA) y el software Launch Doc It ® Ls image acquisition).

3.2.3.- Parámetros a evaluar y análisis estadístico

La determinación de selectividad se realizó de acuerdo a los conceptos propuestos por Feldsine *et al.*, 2002. Se realizaron ampliaciones de todas las muestras contaminadas con las cepas listadas en las Tablas 2 y 3 por duplicado.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa Win Episcopo 2.0 (test Evaluación utilizando nivel de confianza 95%). Se utilizaron las siguientes fórmulas probabilísticas: inclusividad (%) = $A/A+C \times 100$, exclusividad (%) = $D/B+D \times 100$, precisión analítica (%) = $A+D/A+B+C+D \times 100$ (Tabla 4).

3.3.- Obtención de las muestras

En la ciudad de Berisso, provincia de Buenos Aires, existen 92 carnicerías habilitadas. Entre octubre de 2010 y abril de 2011, se tomaron muestras de todas las carnicerías habilitadas con la colaboración de la Secretaría de Salud del Municipio de Berisso. De las 92 carnicerías se tomaron muestras de carne bovina molida cruda se realizó una encuesta al responsable de cada establecimiento. Esta encuesta fue diseñada para evaluar las buenas prácticas de manufactura en cada establecimiento, como así también las buenas prácticas de higiene (Anexo 1). Las muestras se remitieron al LaMA (FCV-UNLP) donde fueron procesadas inmediatamente manteniendo la trazabilidad (las muestras se enumeraron de 1 a 92).

3.4.- Análisis bacteriológico

Detección de *Salmonella* spp. a partir de muestras de carne molida obtenidas a nivel de boca de expendio

Noventa y dos muestras de carne molida fueron enriquecidas en caldo lactosado e incubadas a 35°C por 24 h +/- 2 h según la metodología recomendada por BAM capítulo 5 *Salmonella* (2007) de la FDA.

Para la detección de *Salmonella* spp. a partir del pre-enriquecimiento se utilizaron las siguientes técnicas moleculares:

- a) Técnica de PCR de punto final para la detección de *Salmonella* spp. (Malorny *et al.*, 2003).
- b) Técnica de detección desarrollada y validada en una etapa intra-laboratorio.
- c) Técnica de RT-PCR comercial (Merck).

a) PCR de punto final

Se realizó según el punto 3.2.2.

b) RT-PCR desarrollada y validada en una etapa intra-laboratorio

La extracción de ADN, la preparación de la mezcla de reacción, las condiciones de PCR, y los controles utilizados se describen en el punto 3.1.

c) RT-PCR comercial: Foodproof® *Salmonella* Detección Kit – 5´ nuclease (Merck)

c.1) Extracción de ADN

Se utilizó un *kit* de extracción de ADN recomendado por el fabricante (Foodproof® Short Prep I, Merck). A partir del caldo de pre-enriquecimiento (caldo lactosado) se agito y dejo en reposo por 5 a 10 min. Se transfirió 50 µl del sobrenadante al tubo con solución lista para usar de reactivo de lisis Foodproof Short Prep I. Se mezcló utilizando el vortex por 5 seg e incubó a 95-100°C por 10 min en un bloque térmico (Dri-Block® DB-ZD). Se colocaron los tubos en vortex por 5 seg y centrifugando 1 min a 8000 x g.

c.2) Preparación de la mezcla de reacción

El *kit* comercial contiene la mezcla de reacción, *Taq* DNA polimerasa, Uracil-DNA-Glycosylase (UNG) para eliminar cualquier ADN generado en el laboratorio, controles externos y control interno en tubos separados. Se fraccionó en 20 µl cada microtubo de PCR según especificaciones del fabricante y se agregó 5 µl de ADN templado.

c.3) Condiciones de la PCR

Para la amplificación se utilizó el programa Mx3005P Instrument Qualification Test 3. Se utilizaron los fluorógenos FAM y HEX. Se utilizó el siguiente perfil térmico en: un ciclo a 37°C durante 4 min y 95°C por 5 min y 50 ciclos a 95°C 5 seg, 60° por 60 seg (detección de fluorescencia). El tiempo de análisis fue de 1 h 42 min (Figura 7).

3.5.- Procedimiento microbiológico para el aislamiento de *Salmonella* spp.

Las muestras fueron procesadas según la metodología recomendada en el artículo 255 del CAA: BAM, Capítulo 5 *Salmonella* (2007) de la FDA (Figura 8).

Para realizar el preenriquecimiento se pesaron 25 g de muestra y se incubó en 225 ml de caldo lactosado (Biokar Diagnostics) durante 24 h +/- 2 h a 35 °C. El enriquecimiento se efectuó incubando 0,1 ml en 10 ml de caldo Rappaport Vassiliadis (Biokar Diagnostics) y 1 ml en 10 ml de caldo Tetrionato (Acumedia Manufacturers, Inc. Michigan, USA) durante 24h +/- 2 h a 42 °C y posteriormente se sembró una ansada (10 microlitros) en medios sólidos selectivos: agar bismuto sulfito (ABS) (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France), en agar xilosa lisina desoxicolato con tergitol (XLT4) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) y Hektoen (HE) (Laboratorios Britania S.A, Buenos Aires, Argentina) y se incubó durante 24 h +/- 2 h a 35 °C +/- 2. Luego de la incubación se seleccionaron dos o más colonias sospechosas de *Salmonella* de cada agar selectivo. Se realizaron las pruebas de TSI (triple azúcar hierro) (Laboratorios Britania S.A) y LIA (agar lisina hierro) (Laboratorios Britania S.A) durante 24 h +/- 2 h a 35 °C +/- 2.

Caracterización fenotípica

A partir de colonias presuntamente positivas en TSI y LIA se confirmaron mediante pruebas bioquímicas y serológicas.

a) Pruebas Bioquímicas

Para realizar la identificación bioquímica de las colonias sospechosas se les efectuó las siguientes reacciones: glucosa (TSI); SH₂ (LIA y TSI); Urea (Becton Dickinson); caldo rojo de fenol (Becton Dickinson) con dulcitol (Anedra, Buenos Aires, Argentina), lactosa (Anedra) y sacarosa (Anedra); Voges Proskauer (Laboratorios Britania S.A); Rojo de metilo (Laboratorios Britania S.A); Movilidad Indol Ornitina (M.I.O)

(Laboratorios Britania S.A); Indol (Laboratorios Britania S.A) y Citrato de Simmons (Laboratorios Britania S.A).

b) Pruebas serológicas

Se realizó el análisis serológico para la identificación del género *Salmonella* spp. utilizando las pruebas de aglutinación el látex con el kit *Salmonella* LA (Denka Seiken Co. Ltd, Niigata-Ken, Japan).

Los aislamientos positivos se remitieron al Laboratorio Central de Salud Pública de la República del Paraguay, donde se les realizó la serotipificación de acuerdo con el esquema de Kauffmann-White (Popoff, 2001).

Para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana se utilizó la técnica de difusión en agar de acuerdo a las normas del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) documento M31A3. Los antibióticos utilizados fueron: Ácido Nalidíxico (NAL) 30 µg (Britania), Ampicilina (AMP) 10 µg (Britania), Cefixima (CFM) 30 µg (Britania), Cefotaxima (CTX) 30 µg (Britania), Ciprofloxacina (CIP) 5 µg (Britania), Cloranfenicol (CHL) 30 µg (Britania), Gentamicina (GEN) (10 µg) (Britania), Nitrofurantoína (NIT) 300 µg (Britania), Tetraciclina (TET) 30 µg (Britania), Trimetoprima-sulfametoxazol (STX) 1,25/23,75 µg (Britania). La interpretación de resultados se realizó según los puntos de corte indicados (CLSI documento M100S19). Se definieron como multirresistentes aquellos aislamientos que presentaron resistencia a tres o más grupos de antimicrobianos.

3.6.- Análisis estadístico

Los resultados obtenidos con las técnicas de PCR fueron contrastados con los resultados obtenidos en el aislamiento (Tabla 4). El análisis estadístico de los resultados se realizó según el punto 3.2.3.

3.7.- Capacitación a los expendedores de carne de la ciudad de Berisso

Se realizaron capacitaciones colectivas e individuales a los manipuladores y expendedores de carne de 92 carnicerías de la ciudad de Berisso. El trabajo de capacitación se realizó en forma conjunta entre la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP) y la Municipalidad de Berisso.

Las capacitaciones se planificaron con base en los resultados obtenidos en las visitas a los comercios expendedores de carne, en los resultados de las encuestas a los responsables de cada comercio y en el análisis microbiológico de carne molida fresca para la detección y aislamiento de *Salmonella* spp.

En las jornadas de capacitaciones colectivas se citaron a los manipuladores de carne de entre 10 y 20 comercios. Las capacitaciones consistieron en tres charlas:

- ✓ Reglamentación legal nacional, provincial y local relacionada con el expendio de carne
- ✓ Salmonelosis. Vías de transmisión y consecuencias en los consumidores, particularmente en niños menores de 5 años.
- ✓ Análisis de los resultados obtenidos en el conjunto de carnicerías convocadas y medidas de intervención dirigidas a resolver los problemas identificados.

Las capacitaciones individuales consistieron en comunicar a cada establecimiento los resultados obtenidos avalados por la Facultad de Ciencias Veterinarias y la Municipalidad de Berisso. Una vez que el personal de cada carnicería tomó conocimiento

del informe se identificaron los problemas asociados a las instalaciones, a las buenas prácticas de manipulación, buenas prácticas de higiene, transporte de materia prima y conservación de carne. Finalmente y en base a los problemas identificados se capacitó al personal y se sugirieron medidas de intervención individualizadas.

4. RESULTADOS

4.1.- Desarrollo de una técnica de RT-PCR para la detección del gen *invA* a partir del pre-enriquecimiento.

4.1.1.-Diseño de cebadores

Los oligonucleótidos cebadores diseñados luego del análisis de 78 secuencias homólogas de *Salmonella* spp. fueron los siguientes:

Cebador *forward* (Salmo F): 5'ACGTTTCGGGCAATTCGTTATTC 3'

Cebador *reverse* (Salmo R): 5' CGGGCATACCATCCAGAGAAC 3'

4.1.2.- Estandarización

a) Rango de trabajo y límite de corte

El límite de detección de la técnica de RT-PCR desarrollada para la detección de *Salmonella* spp. fue establecido usando diferentes concentraciones bacterianas en cultivos puros. Los resultados fueron positivos en las tres repeticiones, al trabajar con el ADN de las 12 cepas utilizadas en concentraciones de 10^4 y 10^3 UFC/20 μ l de mezcla de reacción de PCR. Los 36 (12 cepas y 3 repeticiones) ensayos independientes usando 10^4 UFC/20 μ l de mezcla de reacción de PCR fueron positivos. Sobre 36 ensayos independientes, realizados con el ADN de las 12 cepas de *Salmonella enterica* usando 10^3 UFC/20 μ l de mezcla de reacción de PCR, 30 muestras fueron positivas. Finalmente, todos los ensayos fueron negativos en tres repeticiones al utilizar el ADN de las 12 cepas de *Salmonella enterica* en concentraciones de 10^2 y 10^1 UFC/20 μ l de mezcla de reacción

de PCR. Por lo tanto, se consideró como límite de detección y límite de corte de la técnica de RT-PCR, al ADN correspondiente a 10^4 UFC/20 μ l de mezcla de reacción. El límite de detección obtenido con el control positivo (*Salmonella* Enteritidis ATCC 13076) fue 10^2 UFC/20 μ l de mezcla de reacción. Los tres ensayos realizados con la cepa *E. coli* ATCC 25922 fueron negativos con todas las concentraciones utilizadas.

b) Robustez

Todos los resultados fueron reproducibles al utilizar el ADN templado correspondiente a 10^4 UFC/20 μ l de mezcla de reacción de cada una de las 12 cepas de *Salmonella enterica* en 3 días consecutivos y por 2 operadores (72 resultados independientes). Se demostró que la técnica desarrollada fue robusta, ya que no se obtuvieron resultados no deseables al introducir variables en forma deliberada.

4.2.- Validación intra-laboratorio de la técnica de RT-PCR desarrollada

4.2.1.- Selectividad

Inclusividad. La totalidad (N=150) de las muestras de carne molida contaminadas con tres concentraciones de *Salmonella enterica* presentaron señal positiva. Se observó una única curva de Melting con un pico a una temperatura de 82°C (Figura 9).

Exclusividad. Al utilizar el ADN correspondiente a 10^5 UFC/20 μ l de mezcla de reacción, todas las cepas no *Salmonella* (N=30) fueron negativas.

4.2.2.- Análisis estadístico de los resultados

La técnica desarrollada para la detección de *Salmonella enterica* cumplió los siguientes parámetros: 100% de inclusividad, 100% de exclusividad, 100% de precisión analítica (valor predictivo positivo y valor predictivo negativo).

4.3.- Análisis de muestras de carne molida obtenidas a nivel de boca de expendio

Entre octubre de 2010 y abril de 2011, se analizaron y procesaron 92 muestras de carne molida. Las muestras fueron procesadas según la metodología recomendada en el CAA la cual fue considerada como *gold standard*. Se utilizaron como tamizaje tres técnicas moleculares para la detección de *Salmonella* spp. (PCR de punto final, RT-PCR desarrollada y validada en una etapa intra-laboratorio y RT-PCR comercial). Finalmente se evaluó el desempeño de cada PCR, al comparar los resultados obtenidos con el aislamiento.

En la Tabla 5 se presentan los resultados positivos obtenidos luego del procesamiento de las muestras por técnicas de PCR y aislamiento.

4.3.1.- Detección de *Salmonella* spp. a partir de muestras de carne molida obtenidas a nivel de boca de expendio

Sobre un total de 92 muestras de carne molida, se obtuvieron 13 (14%) muestras positivas por RT-PCR comercial, y ocho (8,7%) muestras positivas al utilizar la PCR de punto final y la RT-PCR desarrollada y validada en una etapa intra-laboratorio. En las figuras 10, 11 y 12 se muestran resultados obtenidos con cada una de las técnicas utilizadas como tamizaje para la detección de *Salmonella* spp.

4.3.2.-Procedimiento microbiológico para el aislamiento de *Salmonella* spp.

Sobre un total de 92 muestras de carne molida fresca, se obtuvieron 13 (14%) aislamientos mediante la metodología recomendada en el CAA.

Caracterización fenotípica

Los 13 aislamientos fueron confirmados como *Salmonella* spp. mediante pruebas bioquímicas y serológicas.

En la Tabla 6 se muestran los resultados del perfil bioquímico y la confirmación serológica. Las trece colonias sometidas a pruebas bioquímicas dieron reacciones típicas para el género *Salmonella* spp.

Se realizó la serotipificación de los trece aislamientos. Los serotipos fueron *Salmonella* Derby (n=5), *Salmonella* Newport (n=3), *Salmonella* Give (n=2) *Salmonella* Anatum (n=2), *Salmonella* Meleagridis (n=1).

Respecto a la resistencia antimicrobiana de los serotipos de *Salmonella* aislados de carne molida, se determinó que el 100% de las cepas fue sensible a: cefixima, cefotaxima, ciprofloxacina, gentamicina, nitrofurantoína y trimetoprima-sulfametoxazol. Cuatro (70%) cepas de *S.* Derby presentaron resistencia al ácido nalidíxico y una (7,7%) cepa *S.* Newport presentó resistencia a tetraciclina. Una cepa (7,7%) de *S.* Derby fue multirresistente, ya que presentó resistencia a ampicilina, cloranfenicol y tetraciclina. (Tabla 10).

4.4.- Análisis estadístico

a) PCR de punto final

Se obtuvo 61,53% (IC 35,09 -87,98) de inclusividad, 100% (IC 100-100) de exclusividad, 100% (100-100) de valor predictivo positivo y 94,04% (IC 88,98 -99,10) de valor predictivo negativo. En las Tablas 7 a y b se presentan los resultados obtenidos del análisis estadístico.

b) RT-PCR desarrollada y validada en una etapa intra-laboratorio

Se obtuvo 61,53% (IC 35,09 -87,98) de inclusividad, 100% (IC 100-100) de exclusividad, 100% (100-100) de valor predictivo positivo y 94,04% (IC 88,98 -99,10) de valor predictivo negativo. En las Tablas 8 a y b se presentan los resultados obtenidos del análisis estadístico.

c) RT-PCR comercial: Foodproof® *Salmonella* Detección Kit – 5´ nuclease (Merck)

Se obtuvo un 100% de inclusividad, exclusividad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo. En las Tablas 9 a y b se presentan los resultados obtenidos del análisis estadístico.

4.5.- Capacitación a los manipuladores de carne de los comercios analizados para prevenir la presencia de *Salmonella* spp.

En el Anexo 2 se muestran los resultados obtenidos de las encuestas realizadas en cada carnicería previa toma de muestra. Entre los problemas relacionados con la comercialización de la carne, el 81,5% de las carnicerías carece de documentación que avala la procedencia de la misma y solo el 23,9% de las carnicerías tritura la carne en el momento de la venta. Cabe destacar dentro de los problemas relacionados con las

características edilicias se encontró que el 84,4% de las carnicerías posee baño, el 26,1% carece de ante baño y en el 26,1% el baño contacta con el lugar de expendio. En cuanto a la higiene de las carnicerías ninguna cuenta con un procedimiento de sanitización estandarizado y solo el 23,9% tiene agua caliente. De la inspección visual realizada por el inspector municipal se demostró que el lavado de manos de los carniceros fue insuficiente en el 98,9% y la sanitización general del comercio fue insuficiente en el 96,7%.

Se realizaron cuatro jornadas de capacitación colectiva a las que se invitó al personal de todos los comercios participantes. En total se capacitaron 167 manipuladores y expendedores de carne correspondientes a las 92 carnicerías. Estas capacitaciones se basaron en explicar la legislación vigente para luego abordar los problemas identificados en las encuestas en ese grupo de carnicerías. El análisis de los resultados asociado a la importancia de las ETA generó una mayor predisposición a la concientización por parte de los manipuladores y expendedores de carne.

Una vez identificado claramente el problema se aportaron pautas para mejorar la trazabilidad de la carne, los hábitos de manipulación de carne, se describieron buenas prácticas de manufactura (BPM), procedimientos estandarizados de sanitización (POES) y el manejo integrado de plagas (MIP). A cada participante se le entregó material impreso para evacuar dudas y una lista de proveedores de desengrasantes, desinfectantes y equipamiento de carnicería en la zona de Berisso para que puedan consultar.

En una segunda etapa se realizó una capacitación individualizada en cada uno de los 92 comercios participantes. La misma consistió en observar y sugerir medidas de intervención tendientes a corregir los problemas identificados para cada caso en particular.

5. DISCUSIÓN

Los métodos tradicionales de detección de *Salmonella* spp. en alimentos son lentos y laboriosos, están basados en el uso de medios de cultivo selectivos y la posterior caracterización de colonias sospechosas por pruebas bioquímicas y serológicas. Requieren en primer lugar que la bacteria forme una colonia en un medio de cultivo. Estos métodos no implican una inversión económica y un gasto en material excesivo. Sin embargo, necesitan mano de obra suficiente para la preparación de medios y registro de resultados. Además, se necesita un periodo de incubación prolongado, ya que el microorganismo buscado puede ser minoritario respecto a la flora total y puede estar subletalmente lesionado (Rodríguez *et al.*, 2009).

Los métodos rápidos destinados a la detección, el recuento, la caracterización y la subtipificación de microorganismos (patógenos y del deterioro) permiten obtener resultados de manera sencilla, fiable y en menor tiempo que con los métodos tradicionales. Los factores que justifican la utilización de métodos rápidos e impulsan su desarrollo son numerosos, entre ellos se pueden mencionar las presiones regulatorias, las modernas prácticas de producción y la complejidad analítica (Leotta, 2009). Sin embargo, se debe considerar que antes de la adopción de nuevos métodos por parte de la industria, estos deben tener constancia del proceso de estandarización y validación ante entidades internacionales, o bien en instancias inter e intra-laboratorio (Feldsine *et al.*, 2002; OAA, 2003; NordVal, 2004; Trullols *et al.*, 2004).

En la industria de los alimentos no es aceptable un método rápido que contemple la posibilidad de generar un falso resultado negativo, ya que el impacto de liberar un lote de alimento contaminado con un patógeno, y que este ocasione un brote de ETA, puede generar un gran costo para la salud pública con terribles consecuencias sobre la

aceptación de la empresa elaboradora-comercializadora o marca comercial por parte de los consumidores (Manual de métodos rápidos-MTHA, 2011).

Un falso resultado positivo, no tiene las consecuencias mencionadas, aunque si tiene costos económicos para la empresa ya que un falso resultado positivo debe ser confirmado y la confirmación puede demorar varios días. Durante este tiempo se producen costos de estacionamiento.

El avance de la genética permitió el desarrollo de metodologías basadas en el estudio del ADN que se pueden utilizar como métodos rápidos, los cuales proporcionan ventajas en cuanto a eficiencia, sensibilidad y disminución del tiempo de detección. Estos métodos, por estar basados en la determinación de ácidos nucleicos, tienen la característica de ser muy específicos. Tal es el caso de las diferentes estrategias de PCR, las que se basan en la amplificación *in vitro* del ADN. Actualmente, la utilización de las técnicas de PCR como herramienta para la detección de patógenos fue aceptada mundialmente como método rápido tanto para el análisis de matrices alimentarias, como para muestras ambientales y clínicas (Malorny *et al*; 2003).

En Argentina comenzaron a utilizarse nuevas técnicas de RT-PCR para la detección de microorganismos (Brusa *et al.*, 2010, Aliverti *et al.*, 2011; Brusa *et al.*, 2011). Sin embargo, aún no es posible utilizarlas en forma extensiva debido a su alto costo.

5.1.- RT-PCR desarrollada y validada en una etapa intra-laboratorio

En este estudio se desarrolló, estandarizó y validó una técnica de RT-PCR con agentes intercalantes para la detección de *Salmonella* spp.

Tanto para la extracción de ADN, como para el procesamiento de las muestras, la premisa fue utilizar métodos simples y económicos disponibles en los laboratorios de

análisis de alimentos que utilizan PCR. Por lo tanto, dicho método se puede aplicar como tamizaje para la detección de *Salmonella* spp. en carne molida pudiendo obtener un resultado en menos de 24 horas.

Los resultados obtenidos en la validación intra-laboratorio de la técnica de RT-PCR desarrollada, cumplió con los parámetros establecidos siendo estos: 100% de inclusividad, exclusividad, precisión analítica. Además, se determinó como límite de detección y límite de corte de la técnica de RT-PCR desarrollada, al ADN correspondiente a 10^4 UFC/20 μ l de mezcla de reacción. Estos resultados coinciden con los obtenidos en la validación de la PCR de punto final destinada a la detección de *Salmonella* spp. a partir de diferentes matrices alimentarias y validada por Mallorny *et al.* (2003).

5.2.- Desafío de las técnicas de PCR contra la metodología de aislamiento (*gold standard*)

En este trabajo se analizaron muestras de carne molida de 92 carnicerías de la ciudad de Berisso. Se utilizaron tres técnicas de tamizaje por PCR para la detección de *Salmonella* spp. y la metodología recomendada por el CAA para el aislamiento de *Salmonella* spp. en carne molida. Tanto por aislamiento como por RT-PCR comercial se obtuvieron trece (14%) muestras positivas, resultados similares a los obtenidos por Michelena (2008) en la provincia de Buenos Aires. Con respecto a los resultados obtenidos por la PCR de punto final y RT-PCR desarrollada y validada en una etapa intra-laboratorio fueron ocho (8,7%) muestras positivas.

La extracción de ADN con buffer tritón es una técnica más rápida, menos laboriosa y más económica que los métodos de extracción artesanal y los métodos comerciales. Leotta *et al.* (2005) demostraron que esta extracción es adecuada para el análisis de

muestras de carne molida luego de un período de enriquecimiento, ya que se obtiene mayor cantidad de ADN que con un *kit* comercial. Por esta razón, en este trabajo se utilizó la extracción de ADN con buffer tritón para la técnica de PCR de punto final y la RT-PCR desarrollada y validada en una etapa intra-laboratorio. En una próxima etapa se podría considerar la utilización simultánea de un *kit* comercial de extracción de ADN para eliminar la extracción como una variable que afecte el desempeño de la PCR desarrollada.

Si bien la detección temprana de *Salmonella* spp. a partir de un alimento es ideal, en el presente trabajo no consideramos el análisis directo de la carne molida por PCR. Entre los motivos que justifican esta decisión se encuentran: 1) aún no se desarrolló una técnica de tamizaje que pueda detectar la presencia o ausencia de un microorganismo patógeno mediante un análisis directo, 2) el pre-enriquecimiento permite la multiplicación de bacterias blanco presentes en baja cantidad, estresadas y reduce la flora bacteriana acompañante y por ende la cantidad de ADN específico a detectar por PCR (Malorny y Hoorfar, 2005). Asimismo, Lauri (2009) recomienda el pre-enriquecimiento para eliminar el efecto de sustancias inhibitoras presentes en la matriz alimentaria (hemoglobina, lactoferrina, polisacáridos y grasas). La existencia de inhibidores en muestras de alimentos, pueden actuar a diferentes niveles durante el proceso de extracción y amplificación de los ácidos nucleicos y, eventualmente, conducir a la obtención de resultados falsos negativos (Alcazar, 2006; Rossen, 1992).

Otro aspecto a tener en cuenta es que la detección del ADN de un patógeno por PCR, no asegura la viabilidad del mismo en la muestra al momento del análisis (Vantarakis *et al.*, 2000). Este punto queda descartado en la RT-PCR desarrollada y validada debido al alto límite de detección que presentó la técnica.

En el presente trabajo se utilizó para el diseño de la RT-PCR Sybr Green. Algunas de las ventajas de esta estrategia de PCR es su bajo costo, fácil manejo y alta sensibilidad. Sin embargo, la utilización de agentes intercalantes puede generar falsos resultados positivos, ya que los fluorógenos se unen a cualquier doble hebra de ADN, inclusive de productos inespecíficos. En este trabajo no se obtuvieron resultados falsos positivos sino falsos resultados negativos. Como se mencionó los resultados falsos negativos son menos deseables que los resultados falsos positivos. Al comparar las técnicas utilizadas para procesar las 92 muestras de carne molida se obtuvo un menor desempeño de la PCR de punto final y la técnica desarrollada y validada en una etapa intra-laboratorio. Entre las causas más frecuentes de falsos resultados negativos obtenidos con técnicas de PCR se pueden enumerar la extracción de DNA, la especificidad de los oligonucleótidos cebadores, la matriz alimentaria y la presencia de otros microorganismos en el alimento. En nuestro caso utilizamos solo un par de cebadores diseñados con secuencias de banco genéticos internacionales. Otros autores utilizaron sistemas de PCR múltiple para la amplificación de *Salmonella* para mejorar la selectividad de la técnica y principalmente la inclusividad (Aabo *et al.*, 1993; Bäumlert *et al.*, 1997; Kwang *et al.*, 1996). Rahn *et al.* (1992), amplificó una secuencia de 284 pb dentro del gen *invA* para la detección de *Salmonella*. Para ello se emplearon 630 cepas de *Salmonella* y 142 géneros de bacterias diferentes a ésta. Todas las cepas evaluadas fueron detectadas, excepto de *S. Litchfield* y *S. Senftenberg*. Como se mencionó en la introducción (Pág. 12), las cepas de *Salmonella* se clasifican en serovares en la base de la amplia diversidad de lipopolisacárido (LPS) de antígenos (O) y antígenos flagelares proteínas (H), de conformidad con el esquema de Kauffmann-White, y en la actualidad aproximadamente 2500 serotipos son reconocidos (Bergey's, 2005). La especie tipo es *Salmonella enterica*, ya que el 99,8% de las cepas de *Salmonella* aisladas del hombre y

de los animales de sangre caliente pertenecen a *S. enterica* subespecie *enterica* y tienen propiedades bioquímicas características.

En nuestro trabajo, para el diseño de los oligonucleótidos cebadores utilizamos 12 cepas de *Salmonella enterica* portadoras del gen *invA* de mayor importancia epidemiológica en Argentina.

La serotipificación constituye un importante complemento de la identificación bioquímica y desde el punto de vista epidemiológico permite determinar la prevalencia de una serovariedad en distintas zonas geográficas, como así también es de utilidad para el estudio de brotes y para conocer la fuente de infección y las vías de transmisión. En nuestro trabajo, la serotipificación de los aislamientos de las muestras de carne molida, permitió establecer los clones circulantes en la carne molida que se comercializa en Berisso, por lo tanto rediseñando los oligonucleótidos cebadores nos permitirá mejorar el desempeño de la RT-PCR desarrollada, para ser utilizada como técnica rápida de detección de *Salmonella* en laboratorios de alimentos en un tiempo menor que con la metodología tradicional y a un bajo costo por muestra.

Con respecto a la RT-PCR comercial cabe mencionar que utiliza sondas de hidrólisis TaqMan que se unen al ADN producto del proceso de amplificación y genera una alta especificidad. Los oligonucleótidos cebadores fueron diseñados mediante el análisis de más de 1000 serovares de *Salmonella* spp. aislados en diferentes países. Además, el *kit* incluye la utilización de controles externos y control interno en tubos separados. El fabricante recomienda la utilización del *kit* de extracción de ADN Foodproof® Short Prep I. A pesar de que esta técnica se utiliza en muchos laboratorios de análisis de alimentos y que su utilidad es demostrada para la detección de *Salmonella* en alimentos, la principal limitante es el alto costo por muestra.

En cuanto a la resistencia antimicrobiana se determinó que el 30% de los serotipos fue resistente a Ácido Nalidíxico, el 15,4% lo fue frente a Tetraciclina y el 7,6% de las cepas lo fue a Ampicilina y Cloranfenicol. El 7,7% de los serotipos fueron clasificados como multirresistentes (AMP, CMP, TET). Como se mencionó en la introducción (Pág. 18) la mayoría de los serotipos no-Tifoideos de *S. enterica* aislados en diversos países se consideran zoonóticos, además en el hombre la Salmonelosis no-Tifoidea suele cursar como un proceso autolimitado (Pág. 17). Sin embargo, en el caso de pacientes inmunodeprimidos o en niños menores de 5 años resulta vital contar con tratamientos efectivos. Por lo tanto, el incremento de la resistencia en serotipos no-Tifoideos de *S. enterica* es un importante problema en salud pública.

5.3.- Capacitación a manipuladores de carne molida para prevenir la presencia de *Salmonella* spp.

La presencia de microorganismos patógenos en alimentos y las enfermedades producidas por los mismos es uno de los problemas esenciales y crecientes en salud pública. Este fenómeno se debe al incremento en su frecuencia, el surgimiento de nuevas formas de transmisión, la aparición de grupos de población vulnerables y el impacto socioeconómico que ocasionan, entre otras causas.

Los animales utilizados para la producción de carne y derivados son un importante reservorio de *Salmonella* spp. y las infecciones en humanos se producen por el consumo de alimentos contaminados como carne mal cocida. Esta problemática genera un gran impacto económico en la industria de alimentos y en el sistema de salud.

Por este motivo la legislación a nivel nacional y regional (CAA) e internacional (Mercosur, CODEX ALIMENTARIUS) considera la ausencia de *Salmonella* spp. como

criterio obligatorio para muchas categorías de alimentos y en particular para los alimentos de origen animal. En el artículo 255 del CAA, se especifica que la carne molida debe prepararse en presencia del interesado, salvo aquellos casos en que por la naturaleza de los establecimientos o volumen de las operaciones sean autorizados expresamente por la autoridad competente. Sin embargo, en Argentina no se establece la búsqueda de bacterias patógenas para el consumidor en las superficies que contactan con la carne (Leotta *et al.*, 2011).

Dentro de la alimentación, la carne molida ocupa un lugar preponderante en la dieta de los argentinos. Teniendo en cuenta el alto grado de manipulación de este alimento durante la comercialización, es sumamente importante la adopción de medidas que ayuden a garantizar al consumidor la calidad sanitaria. Por este motivo es importante la función del Estado en el control sanitario de este alimento de consumo masivo mediante la capacitación de los manipuladores de la carne molida.

En la ciudad de Berisso no se realiza el análisis de carne molida que se comercializa en las bocas de expendio minorista y es por ello que hasta el presente no se realizaron estudios sistemáticos que permitan detectar los riesgos y puntos críticos de control en el proceso de triturado y envasado.

Uno de los motivos de este trabajo fue conocer la prevalencia de *Salmonella* spp. en la carne molida obtenida a nivel de boca de expendio, con el fin de instaurar medidas de prevención y control de los alimentos. En este sentido independientemente de la técnica de detección y aislamiento que utilizamos se obtuvieron 13 (14%) muestras positivas, resultados que coinciden a los encontrados por Michelena (2008).

En cuanto a los problemas identificados al realizar la encuesta en cada carnicería, se destaca la falta de trazabilidad de la carne, ya que el 81,5% de las carnicerías carece de documentación que avala la procedencia de la carne. Teniendo en cuenta lo

establecido en el artículo 255 del CAA, solo el 23,9% de las carnicerías tritura la carne en el momento de la venta. En cuanto a la higiene general de las carnicerías, ninguna cuenta con un procedimiento de sanitización estandarizado y solo el 23,9% tiene agua caliente y de la inspección visual realizada por el inspector municipal con respecto al lavado de manos de los carniceros resulto insuficiente en el 98,9% y en cuanto a la sanitización general del comercio fue insuficiente en el 96,7%. Por lo que los problemas identificados estarían indicando falta de presión de fiscalización por parte de los organismos de control, como también de falta de concientización por parte de los manipuladores de este alimento.

Con base en los resultados obtenidos a nivel de boca de expendio, la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP) y el Municipio de la ciudad de Berisso, plantearon la realización de un trabajo colaborativo denominado "Carnicerías Saludables" que contribuye al conocimiento de los puntos críticos en las etapas de triturado y envasado de la carne molida, así como de la implementación de estrategias de prevención y control por medio de la capacitación del personal implicado en dicha tarea, a través del estudio de la calidad microbiológica de la carne molida destinada al consumo interno.

Todas las medidas aplicadas en la capacitación de los manipuladores están basadas en la aplicación de las BPM y están concebidas de manera que permitan la higiene de las operaciones desde la llegada de las materias primas hasta la venta de la carne molida. De esta manera, se brindó capacitación dirigida a resolver los problemas identificados en las carnicerías de Berisso en un tiempo definido, para que los manipuladores de carne conozcan las bases de lo que constituye una correcta manipulación y dimensionen su responsabilidad para con la salud de los consumidores.

Finalmente, consideramos importante continuar con este tipo de estudios, inclusive con otros alimentos, ya que el conocimiento de los problemas detectados en los

comercios de expendio minorista, el conocimiento detallado de las cepas de *Salmonella* spp. circulantes y la capacitación de los manipuladores de alimentos permitirán mejorar las estrategias de prevención y control de las ETA y en particular de la Salmonelosis.

6. CONCLUSIONES

6.1.- Se desarrolló, estandarizó y validó en una etapa intra-laboratorio una RT-PCR para la detección de *Salmonella* spp. utilizando Sybr Green.

6.2.- Se evaluó el desempeño de tres técnicas de PCR comparando los resultados con la metodología tradicional mediante el análisis de 92 muestras de carne molida obtenidas a nivel de boca de expendio. Se detectó *Salmonella* spp. por RT-PCR comercial en trece carnicerías (14 %) y se comprobó que el desempeño de la técnica desarrollada y validada en una etapa intra-laboratorio así como la PCR de punto final no fue promisorio.

6.3.- Se describió por primera vez en Berisso la circulación de *S. Derby*, *S. Newport*, *S. Give*, *S. Anatum* y *S. Meleagridis*. De las cuales, se identificó una cepa de *S. Derby* con resistencia antimicrobiana múltiple. Estos antecedentes son importantes para futuros estudios epidemiológicos y para el diseño de nuevas técnicas en base a clones de *Salmonella* spp. circulantes en la Argentina.

6.4.- El desempeño de la RT-PCR desarrollada y validada en una etapa intra-laboratorio podría mejorarse mediante el rediseño de los oligonucleótidos cebadores teniendo en cuenta los serovares prevalentes hallados en la carne molida comercializada en Berisso.

6.5.- Se identificaron los principales problemas sanitarios a nivel de boca de expendio minorista y se capacitaron a todos los manipuladores de carne de la ciudad de Berisso para minimizar el riesgo de transmisión de *Salmonella* spp. a través de carne molida.

7. REFERENCIAS

1. Aabo S, Rasmussen DE, Rossen L, Sorensen D y Olsen E. *Salmonella* identification by the Polymerase chain reaction. Mol Cell Probes 1993; 7(3):171-8.
2. Acha P, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Vol. I Bacteriosis y micosis. Publicación Científica N° 580, p. 240 – 253; 2001; 3a ed. Washington: OPS.
3. Alcazár Montañez C; Rubio Lozano M; Núñez Espinosa F; Alonso Morales R. Detección de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* en quesos frescos y semimadurados que se expenden en vía pública en la ciudad de México. Revista Veterinaria México 2006; 37 N° 004: p. 417-429.
4. Aliverti V, Lirón JP, Brusa V, Aliverti F, Brocardo S, Leotta GA. 2011. Evaluación de tres técnicas de PCR para detectar *Salmonella* spp. a partir de carne picada. I Congreso Internacional de Zoonosis y Enfermedades Emergentes y VII Congreso Argentino de Zoonosis. Organizado por La Asociación Argentina de Zoonosis.
5. Alvarez Martínez N. Virulencia, resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella entérica*. Tesis doctoral 2007. Departamento de Biología Funcional Área de Microbiología. Universidad de Oviedo, España.
6. Bacteriological Analytical Manual (BAM). Chapter 5 *Salmonella* (2007) de La Food Drug Administration. BAM. En: <http://www.cfsan.fda.gov>.
7. Bäumlér AJ, Heffron F y Reissbrodt R. La rápida detección de *Salmonella enterica* con primers específicos para *iroB*. J Clin Microbiol 1997; 35: p. 1224 -1230.
8. Brusa V., Palacios M., Loup V., Copes J., Pineda G., Brocardo S., Aliverti V., Aliverti F., Galleri D., Peral Garcia P., Pellicer K., Leotta G.A. 2010. Evaluación de un sistema

-
- de PCR en tiempo real para la detección de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de carne bovina molida. *Analecta Veterinaria* 30 (sup): 25-28.
9. Brusa V, Lirón JP, Aliverti F, Aliverti V, Brocardo S, Copes JA, Leotta GA. 2011. Desarrollo y evaluación de una técnica RT-PCR para la detección de genes *stx* en carne picada. I Congreso Internacional de Zoonosis y Enfermedades Emergentes y VII Congreso Argentino de Zoonosis.
 10. Benenson S, Raveh D, Schlesinger, Alberton J, Rudensky B, Hadas-Halpern I y Yinnon AM. The risk of vascular infection in adult patients with non Typhi *Salmonella* bacteriemia. *Am J Med* 2001; p. 110:60-3.
 11. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition 2005. Popoff and Le Minor. Volume II, Editorial Board, p. 786.
 12. Berghold C, Kornschöber C, Lederer I and Alleeberger F. *Occurrence of Salmonella enteritidis* phage type 29 in Austria: an opportunity to assess the relevance of chicken meat as source of human *Salmonella* infections. 2004. *Eurosurveillance* 9 (10-12): 31-34.
 13. Boletines Epidemiológicos del Ministerio de Salud de la Nación. En: <http://www.msal.gov.ar/html/site/pdf> .
 14. Bowe F, Lipps CJ, Tsolis RM, Groisman E, Heffron F y Kusters JG. At least four percent of the *Salmonella* Typhimurium genome is required for fatal infection of mice. *Infect. Immun* 1998; 66: 3372-7.
 15. Caffer Mi, Alcain A, Pangopulo M, Terragno R. Evolución de la Salmonelosis en Argentina, en el período 2004-2006. *Revista Argentina de Microbiología* 2007; 39 (1): 2.
 16. Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de EE.UU. 2007. En: <http://www.cdc.gov/foodnet>.

17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Edition, 2009; document M100-S19. Pennsylvania, USA.
18. Codex Alimentarius. En: <http://www.codexalimentarius.net>.
19. Código Alimentario Argentino (CAA). Ley 18284/69 Decreto reglamentario 2126/71. Ed. Marzocchi). En: <http://www.alimentosargentinos.gov.ar>.
20. Copes J, Pellicer K, Echeverría G, Stanchi N, Martinez C, Leardini. Investigación de *Listeria monocytogenes* en quesos de pasta blanda. Revista Argentina de Microbiología. 2000; 32: 49 – 52.
21. Daum L, Barnes W, Mc Avin J, Neidert M, Cooper L, Huff W, *et al.* Real-Time PCR detection of *Salmonella* in suspect foods from a gastroenteritis outbreak in Kerr County, Texas. J Clin Microbiol. 2002; 40:3050-2.
22. de Boer E, Nouws JFM. Slaughter pigs and pork as a source of human pathogenic *Yersinia enterocolitica*. International Journal of Food Microbiology Vol 12, Issue 4, 1991; p. 375 - 378.
23. European Food safety authority (EFSA) 2009. En: <http://www.efsa.europa.eu>.
24. Elley A. Intoxicaciones alimentarias de etiología microbiana. Editorial Acribia, Zaragoza, España, 1994, p. 17: 1 - 17.
25. Emberland KE, Nygard K, Heler BT, Aavistsland P, Lassen J, Stavnes T and Gondrosen, B. 2006. Outbreak of *Salmonella* Kedougou in Norway associated with salami, April-June 2006. Eurosurveillance 11 (7): 060706.
En: <http://www.eurosurveillance.org/ew/2006/060706.asp>.
26. Everest P, Wain M, Roberts G, Rook L y Dougan G. The molecular mechanisms of severe typhoid fever. Trends Microbiol 2001; p. 9: 316 - 20.

27. Faruque Shah M , Nityananda Chowdhury, Rasel Khan, Rubayet Hasan M, Jebun Nahar, Johirul Islam M, Shinji Yamasaki, Ghosh AN, Balakrish Nair G and David Sack A. *Shigella dysenteriae* Type 1-Specific Bacteriophage from Environmental Waters in Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology* 2003; p. 7028 – 7031.
28. Feldsine P, Abeyta C, Andrews W. AOAC International Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis. *J. AOAC Internat* 2002; 85: p. 1187-1200.
29. Garrity GM, Bell JA y Lilburn TG. Taxonomic outline of Prokariotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2º Edición. Release 5.0., springer- verlag. New York 2004; p. 79-122.
30. Gast R, Porter R, Holt S. Applying tests for specific yolk antibodies to predict contamination by *Salmonella enteritidis* in eggs from experimentally infected laying hens. United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service 1998; p. 12 - 18.
31. Gillespie IA, Adak GK, Threlfall EJ. National outbreak of *Salmonella* Ajiobo in England and Wales, June 2006. En: <http://www.eurosurveillance.org/ew/2006/060713.asp>.
32. González Fraga S, Villagra de Trejo A, Pichel M, Figueroa S, Merletti G, Caffer MI. Caracterización de aislamientos de *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 asociados a cuadros de diarrea. *Rev. argent. Microbiol* 2009; 41: 11 - 19.
33. Graeber I, Montenegro MA, Bunge C, Boettcher U, Tobias H, Heinemeyer EA y Helmuth R. Molecular marker analysis of *Salmonella* Typhimurium from surface waters, humans, and animals. *Eur. J. Epidemiol* 1995; 11: 325 - 31.
34. Guiney DG, Fang FC, Krause M. Biology and clinical significance of virulence plasmides in *Salmonella* serovars. *Clinical Infectious Diseases* 1995; 2: 146-51.

35. Gulig PA, Danbara H, Guiney DG. Molecular analysis of *spv* virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. *Molecular Microbiology* 1993; 7(6), p. 825-830.
36. Gurtler JB, Kornacki JL, Beuchat LR. *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. *International Journal of Food Microbiology* 2005; 104: p. 1 - 34.
37. Hoffmann B, Beer M, Schelp C, Schirrneier H, Depner K. Validation of a real time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *J Virol Methods* 2005; 130: p. 36-44.
38. Hueck C. Type III secretion system in bacterial pathogens of animal and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: p. 379-433.
39. ICMSF. Microbiología de los alimentos. Características de los patógenos microbianos. ED. Acribia S.A. 1996. Zaragoza, España.
40. Jones BD y Falkow S. Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. *Annu. Rev. Immunol* 1996; 14: p. 533-61.
41. Kwang J, Littledike ET y JE Keen. El uso de la reacción en cadena de la polimerasa para la detección de *Salmonella*. *Lett. Appl. Microbiol* 1996; 22: p. 46 -51.
42. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberq PC, Winn WC q 999. Enterobacteriaceae. In Konemam editor, *Diagnóstico Microbiológico*, 5 ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A. Springer 1999; p.171- 250.
43. Lauri A, Mariani P. Potentials and limitations of molecular diagnostic methods in food safety. *Genes Nutr* 2009; 4: p. 1-12.
44. Le Minor L y Popoff MY. Request for an opinion. Designation of *Salmonella enterica* spp. nov. rev, as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int. J. Syst. Bacteriol* 1987; 37 p. 465 – 468.

45. Ledel Muller L, Hjertqvist M, Payne L, Petterson H, Olsson A, Plym Forshell L and Anderson Y. Cluster of *Salmonella* enteritidis in Sweden 2005-2006- suspected source: almonds. *Eurosurveillance* 12(6): 1206-225. 2007.
46. Leotta GA, Chinen I, Epszteyn S, Miliwebsky E, Melamed IC, Motter M, Ferrer M, Marey E, Rivas M. Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Revista Argentina de Microbiología* 2005; 37: 1-10.
47. Leotta GA. Métodos rápidos: una herramienta útil y práctica para el análisis microbiológico de los alimentos. *Revista Argentina de Microbiología* 2009; 41: p. 63-64.
48. Leotta GA, Adriani C, Aliverti F, Aliverti V, Brocardo S, Brusa V, Copes J. Análisis microbiológico integral de las carnicerías de Berisso, Provincia de Buenos Aires. Poster. I Congreso Internacional de Zoonosis y Enfermedades Emergentes y VII Congreso Argentino de Zoonosis. Organizado por: La Asociación Argentina de Zoonosis. Ciudad autónoma de Buenos Aires, abril 2011.
49. Leotta GA, Copes J, Aliverti V, Aliverti F, Brusa V, Pacheco S, Ortega E, de la Torre JH, Lirón JP. 2011. Manual de métodos rápidos para la detección, caracterización y subtipificación de patógenos bacterianos presentes en alimentos. Curso Métodos Rápidos. Maestría en Tecnología e Higiene de Alimentos. Universidad Nacional de La Plata.
50. Linder E. Toxicología de los alimentos. Editorial Acribia 1995. Zaragoza España. p. 53-65.
51. López C. Estado del conocimiento de la Campylobacteriosis en la República Argentina: alcances y limitaciones. Tesis Maestría en Salud Pública 2000. Centro de Estudios Avanzados. Universidad de Buenos Aires.

-
52. Luzzi I, Galetta P, Massari M, Rizzo C, Dionisi AM, Filetici E, Cawthorne A, Tozzi A. An Eastern outbreak of *Salmonella* Thymurium DT 104 associated with the traditional pork salami in Italy. 2007. *Eurosurveillance* 12 (4): p. 1204-226. En: <http://www.eurosurveillance.org/em/v12n04/1204-226.asp>.
53. Malorny B, Hoofar J, Bunge C, Helmuth R. Multicenter validation of the Analytical Accuracy of *Salmonella* PCR: towards in an International Standard. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: p. 290-6.
54. Malorny B. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella*. *Food Applied Environ. Microbiol* 2004; 70: p. 7046-52.
55. Malorny B, Hoorfar J. Toward standardization of diagnostic PCR testing of fecal samples: lessons from the detection of *Salmonellae* in pigs. *J. Clin. Microbiol* 2005; 43: p. 3033-3037.
56. Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG y Finlay BB. *Salmonella* pathogenicity islands big virulence in small packages. *Microbes Infect* 2000; 2: p. 145 - 56.
57. Masana MO. Prevalence, Characterization, and Genotypic Analysis of *Escherichia coli* O157:H7/NM from Selected Beef Exporting Abattoirs of Argentina 2010. En: <http://www.faqs.org/periodicals>.
58. Mc Clelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney J, Porwollik S, Ali J, Dante M, Du F, Hou S, Layman D, Leonard S, Nguyen C, Scott K, Holmes A, Grewal N, Mulvaney E, Ryan E, Sun H, Florea L, Miller W, Stoneking T, Nhan M, Waterston R y Wilson RK. Complete genome sequence of *Salmonella enteric* serovar Typhimurium LT2. *Nature* 2001; 413: p. 852 - 6.
59. Mead GC. Prospects for competitive exclusion treatment to control *Salmonellas* and other foodborne pathogens in poultry. *Vet. J.* 1999; 159: p. 111–123.

60. Michelena. Producción segura de cárneos y lácteos. Análisis de la contaminación. Tesis de Maestría en Salud Pública Orientación Sistemas de Salud 2008. Laboratorio Central de Salud Pública de la Provincia de Buenos Aires, La Plata.
61. Millerd SI y Pegues DA. *Salmonella* species, including *Salmonella* Typhi. En: Principles and Practice of infectious diseases. Mandell, Douglas y Bennett (eds.) 5° edición. Ed. Churchill Livingstone, Filadelfia. 2000; p. 2345 - 62.
62. Mims CA, Playfair JHL, Roitty IM y Williams R. Microbiología Médica 1° edición. Ed. Mosby / Doyma, Madrid 1995; p. 25: 1 - 30.
63. Morgan D, Milne L, Kumar S, Murray D, Man W, Goergiou M, Verlander NQ, de Pinna E and Mc Evoy M. *Outbreak of Salmonella* Enteritidis phage type 13a: case-control investigation in Hertsmere, United Kingdom. *Eurosurveillance* 2007, 12 (7-8): p. 1207-225. En: <http://www.eurosurveillance.org/em/v12n07/1207-225.asp>.
64. Nagaraja KV, Pomeroy BS, Williams JE. Infecciones paratifoideas. En: Enfermedades de las aves. Ed: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WM, Yoder HW. Editorial El Manual Moderno 1995, México, D.F.
65. Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) ofrecido en el sitio de Internet En: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
66. NordVal Validation. Protocol for the validation of alternative microbiological methods. NV-DOC.D-2004-01-01.
67. Nygard K, Lindstedt BA, Wahl E, Jensvoll L, Kjelso C, Molbak K, Torpdhal M and Kapperud G. Outbreak of *Salmonella* typhimurium infection traced to imported cures sausage using MLVA-subtyping. *Eurosurveillance*. 2007; 12 (3):070315.
En: <http://www.eurosurveillance.org/ew/2007/070315.asp>.

68. OPS “Microbial Contamination of street foods, sold en Latin America and socioeconomic characteristics of their vendors and consumers”. Editors: Almeida C, Schuch DMT, Gelli DS, Cuellar JA, Diez AV, Escamilla JA. INPPAZ, OPS. 1996.
69. Organismo Argentino de Acreditación. Guía para validación de métodos de ensayo. 2003. Código DC-LE-05: p. 1-16.
70. Pérez MA. Fuentes de infección y transmisión de Salmonelosis. Salud Pública, México. 1974, 16: p. 37 - 48.
71. Pestka J y Witt MF. An overview of immune function. Food Technol. 1985; 39: p. 83 - 90.
72. Popoff MY y Le Minor L. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. Institute Pasteur. Dr. Roux. Paris, France. 1992.
73. Popoff MY. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 8th edition. World Health Organization Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Instituto Pasteur, Paris. 2001.
74. Poppe C, Smart N, Khakhria R, Johnson W, Spika J, Prescott J. *Salmonella* typhimurium DT104: a virulent and drug-resistant pathogen. Can Vet J. 1998; 39 (9): p. 559 - 65.
75. Prado V, Solari V, Alvarez IM, Arellano C, Vidal R, Carreño M, Mamani N, Fuentes D, O’Ryan M Y Muñoz V. Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos en Santiago de Chile. Período 1999-2000. Rev. med. Chile 130 (5): p. 495-501.
76. Raffatellu M, Chessa D, Wilson RP, Tukul C, Akcelik M y Bäumlér J. Capsule-mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. Infect. Immun. 2006; 74: 19-27.
77. Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio C, Curtiss R and Gyles CL. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by

-
- polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes*. 1999; Vol 6. 4: p. 271 – 279.
78. Rodríguez M, De Diego I y Mendoza MC. Extra-intestinal Salmonellosis in a general hospital (1991-96). Relationships between *Salmonella* genomic groups and clinical forms. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 3291.
79. Rodríguez I, Herrero A, Martínez N, Martín MC, Rodicio MR y Mendoza MC. Detección and caracterización of *Salmonella enterica* serovar Virchow. En: “Modern Multidisciplinary Applied Microbiology: Exploiting Microbes and their Interactions”. Méndez Vilas. Ed. Wiley- VCH, Alemania. 2006c; p. 687-91.
80. Rossen L. Inhibition of PCR by components of food samples, microbiological diagnosis assays and DNA-extraction solutions. *J Food Microbiol.* 1992; 17: p.37-45.
81. Salm-Surv, 2005. En: <http://www.who.int/salmsurv/GSSProgressReport2005.pdf>.
82. Salyers A y Whitt D. *Bacterial Patogénesis: a molecular approach*. ASM press, Washinton. 2002; p: 681 - 695.
83. Sistema Regional para la vigilancia de Enfermedades transmitidas por Alimentos (SIRVETA). Informe de consulta técnica. 27-31 de marzo de 2000. INPPAZ/OPS/OMS. En [http://: www.infopanalimentos.org](http://www.infopanalimentos.org).
84. Trullols E, Ruisánchez I, Rius X. Validation of cualitative analytical methods. *Trends Analyt Chem* 2004; 23: 137 - 45.
85. Vadillo S, Piriz S, Mateos E. *Manual de microbiología veterinaria*. Madrid: Editorial McGraw Hill. 2002; p. 327 - 338.
86. Vantarakis A, Kamininou G, Venieri D, Papapetropoulou M. Development of a multiplex-PCR detection of *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in mussels. *Lett Appl Microbiol.* 2000; 31: p. 105-9.

87. Velilla A, Terzolo H y Feingold S. Avances en el diagnóstico molecular de *Salmonella* PCR aplicada a la avicultura y a la microbiología de los alimentos. INTA Balcarce. Abril, 2004. En: <http://www.inta.gov.ar/balcarce>.
88. Wallis TS y Galyov EE. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. Mol. Microbiol. 2000; 36: p. 997 -1005.
89. Wobeser GA. Avian cholera. Diseases of Wild Waterfowl. New York (NY): Plenum Press; 1981; p. 47-60.
90. World Health Organization (WHO). Prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections. Report of a WHO Consultation. Geneva, 1997.
91. Wray C & A Wray. *Salmonella* en los animales domésticos. CAB International, Wallingford, Oxon, Reino Unido. eds 2000.
92. Zhang S, Kingsley A, Santos R, Andrews-Polymenis H, Raffatellu M, Figueiredo J. Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium-induced diarrhea. Infect Immun 2003; 71:p. 1-12.

8. FIGURAS

Figura 1: Localización de los factores de virulencia representativos de *Salmonella enterica* (Madigan *et al.*, 1998 b modificado).

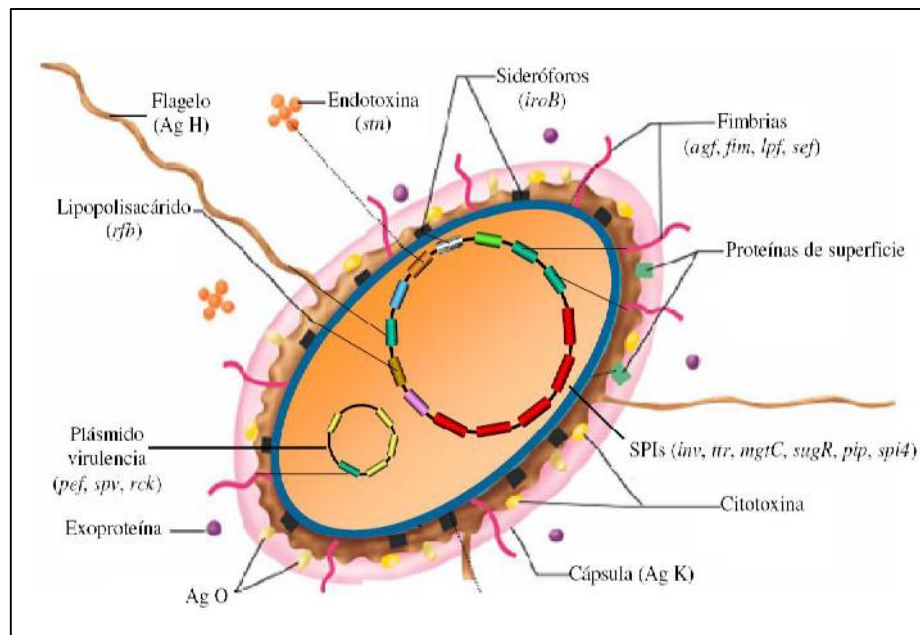


Figura 2: Modelo de regulación del aparato de secreción tipo III de *Salmonella* spp. (Hueck, 1998).

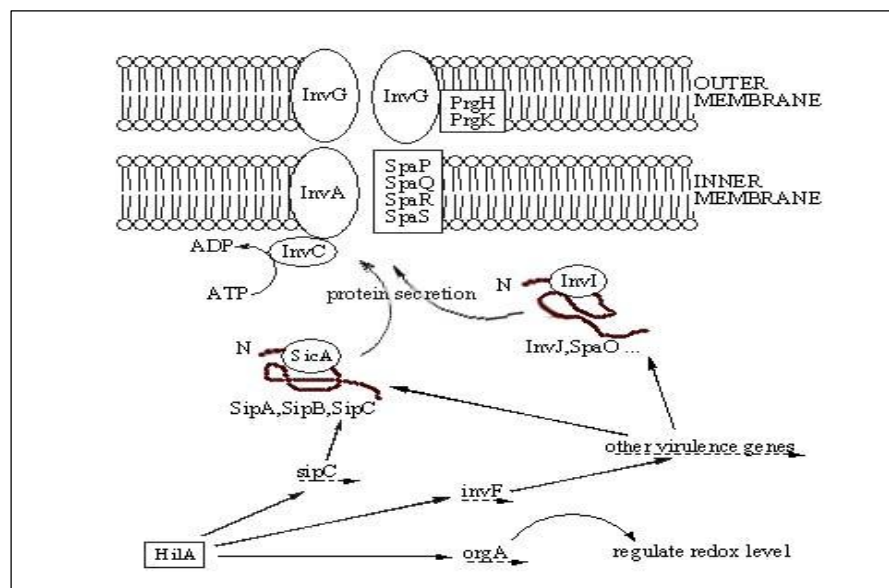


Figura 3: Invasión de la mucosa intestinal por *Salmonella* (Ralph y Gianella, 1995).

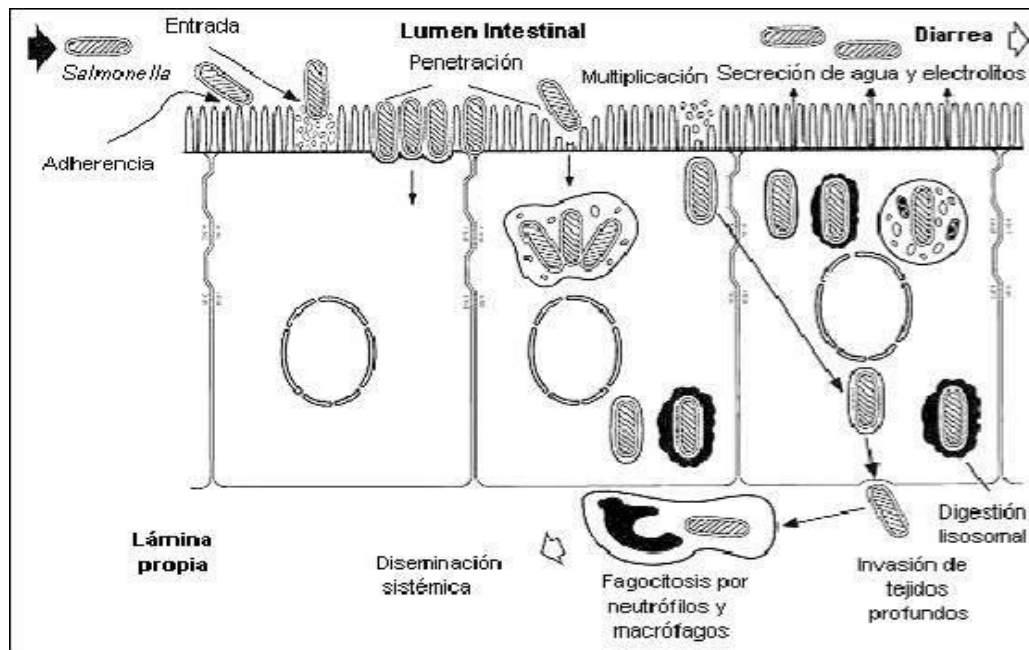


Figura 4: Esquema simplificado de la transmisión de *Salmonella*.

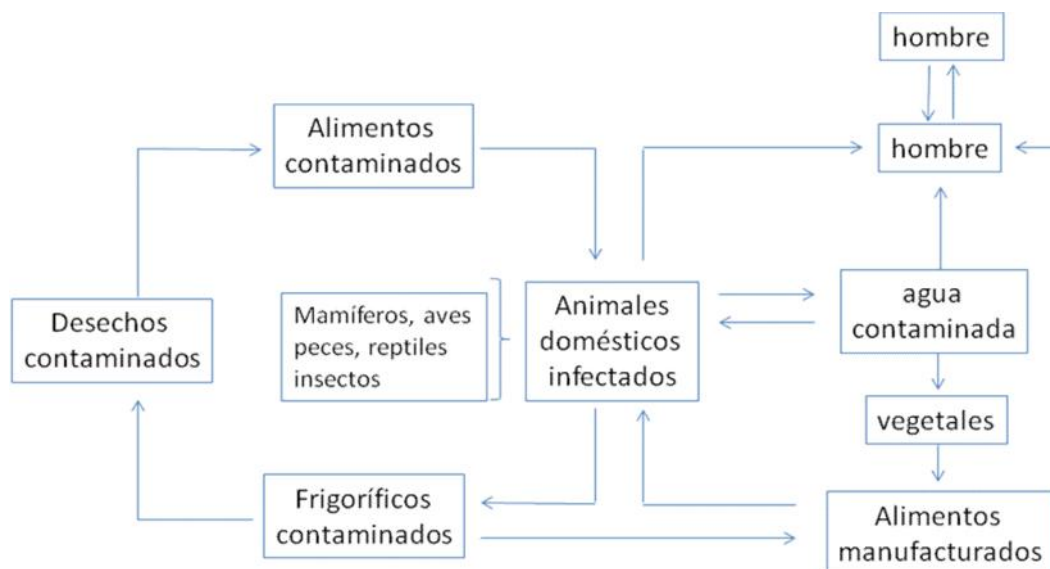


Figura 5: Perfil térmico de la técnica de RT-PCR desarrollada y validada en una etapa intralaboratorio para la detección de *Salmonella* spp.

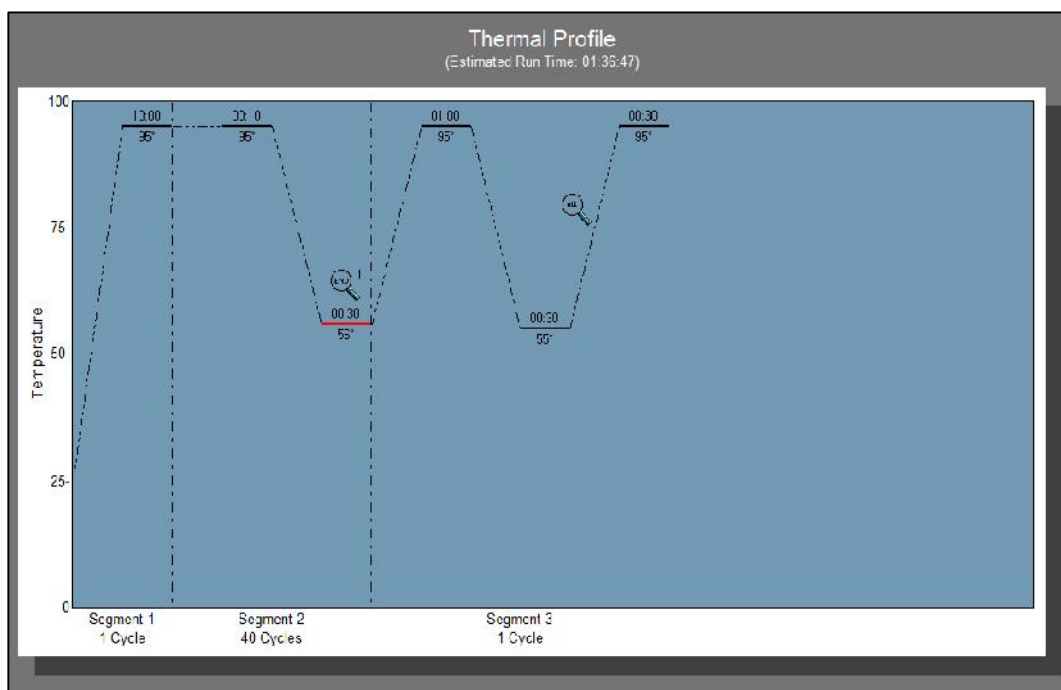


Figura 6: Perfil térmico de la técnica PCR de punto final para la detección de *Salmonella* spp.

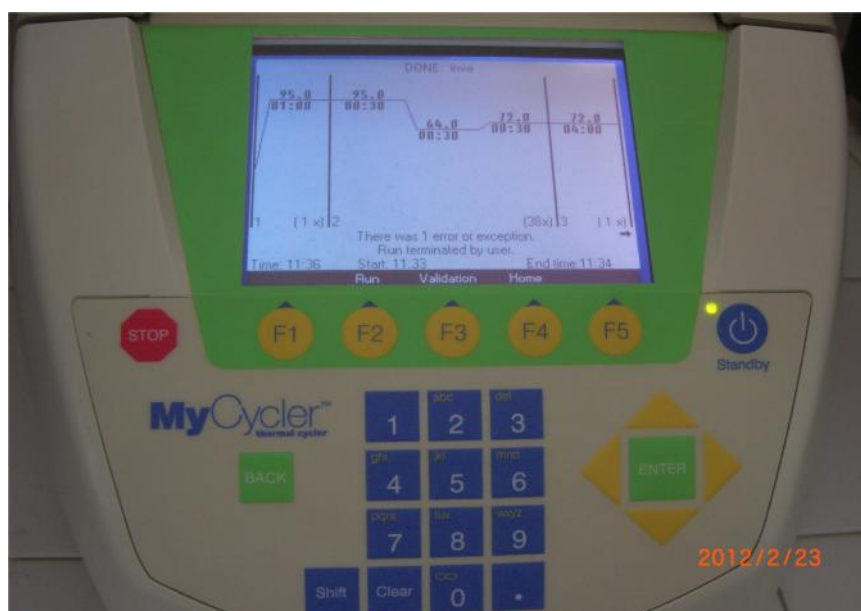


Figura 7: Perfil térmico de la técnica de RT- PCR comercial.

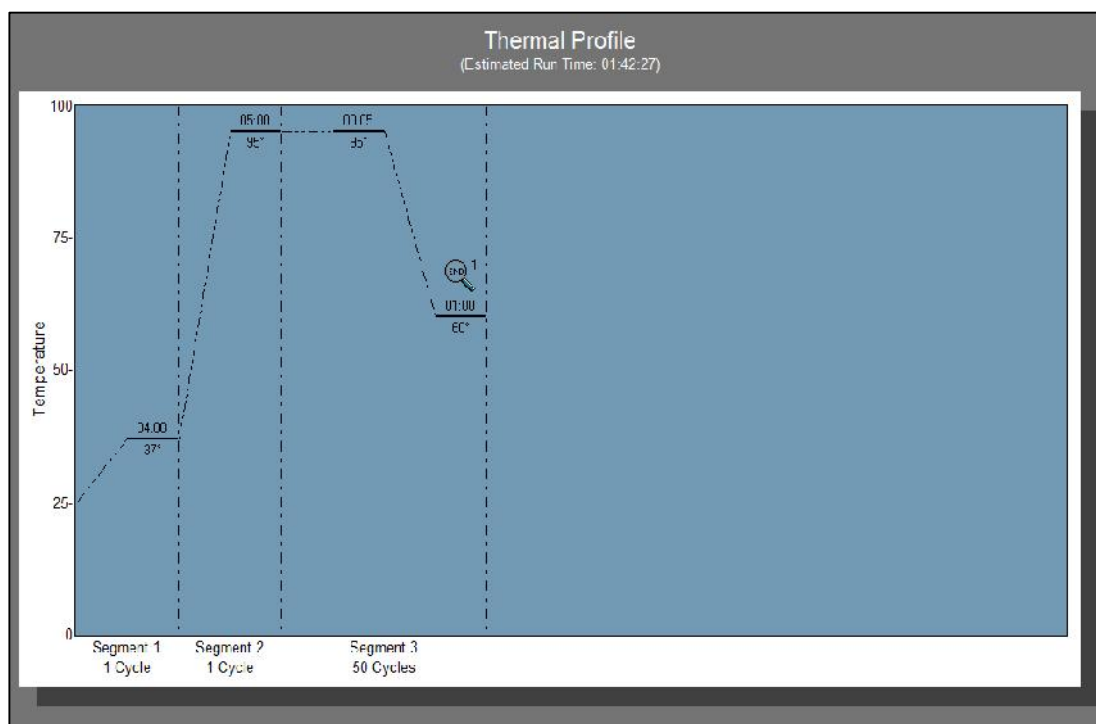


Figura 8: Diagrama de flujo para el aislamiento *Salmonella* spp. utilizando la metodología BAM. Capítulo 5- *Salmonella*.

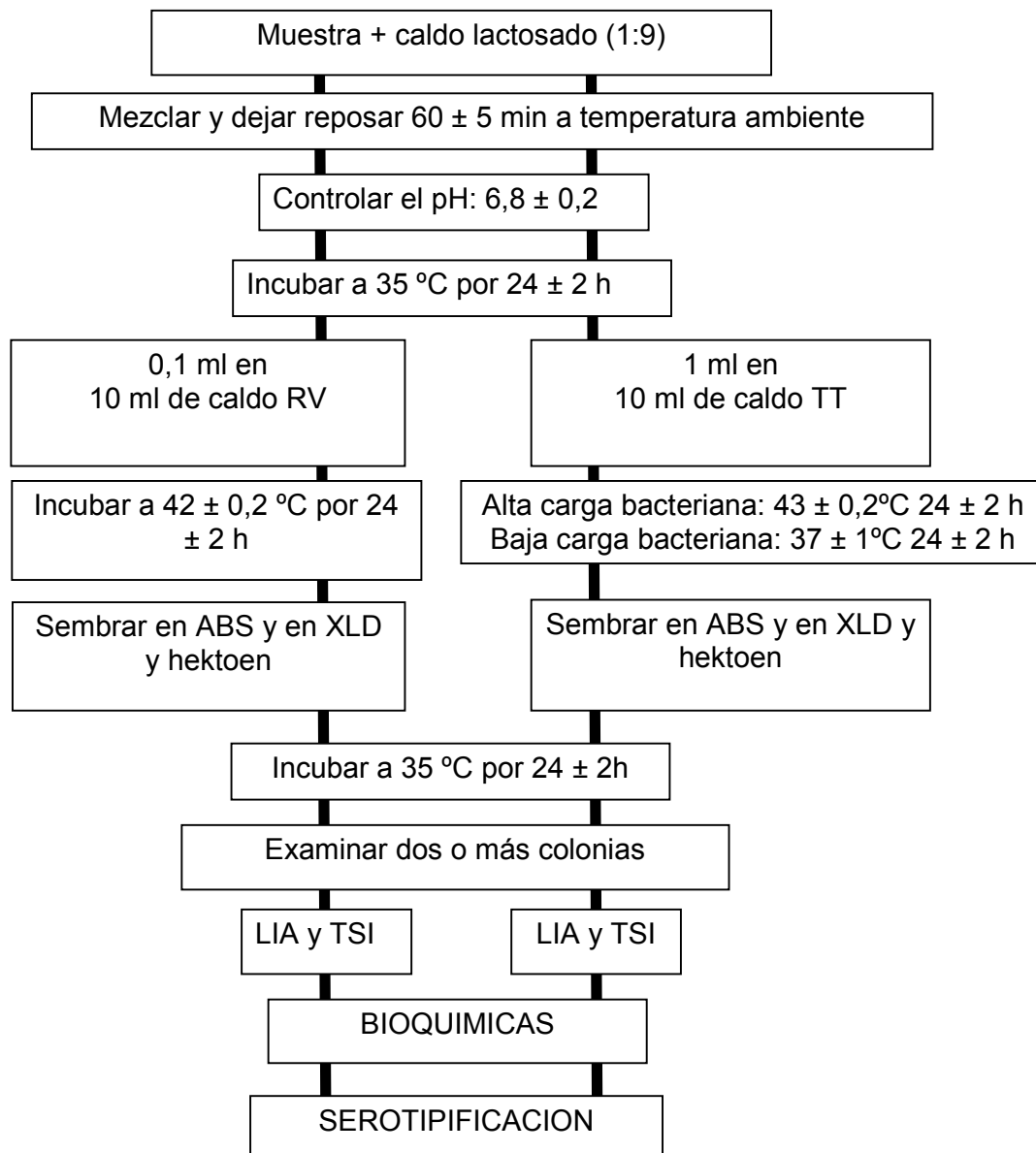


Figura 9: Se presenta una muestra con resultado positivo para *Salmonella* spp. (curva gris), Curva de Melting (CT: 82) obtenida por RT-PCR desarrollada y validada en una etapa intralaboratorio.

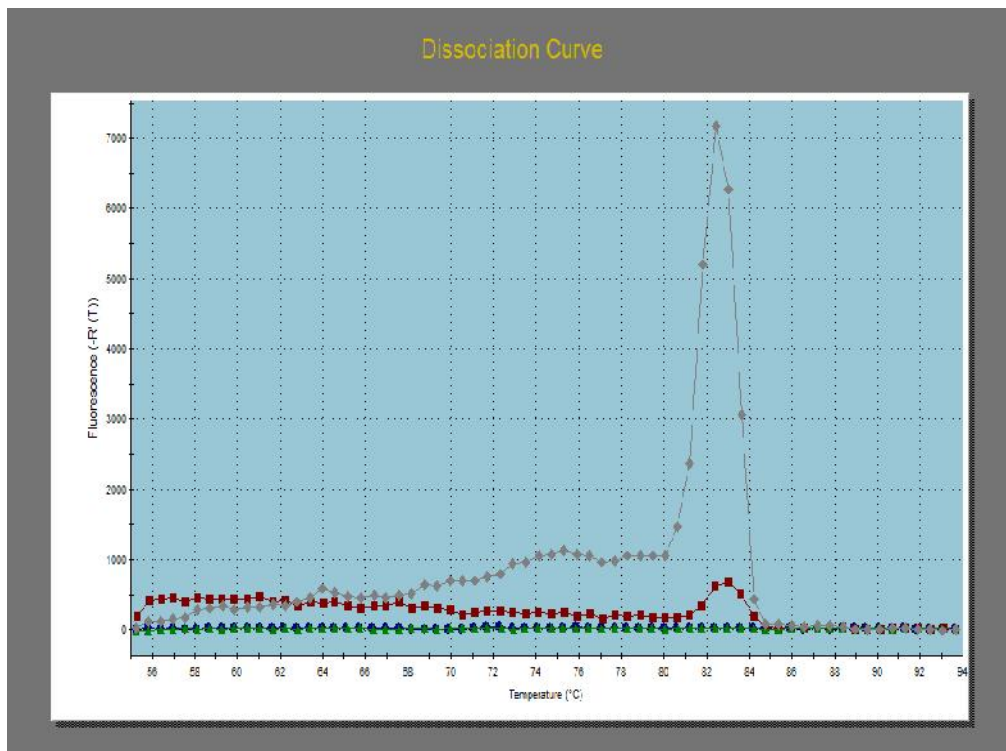


Figura 10: Electroforesis en gel de agarosa al 2,5 % en buffer TAE 1X con 0,03 µg/ml de bromuro de Etidio (Promega) para el análisis de 6 muestras de carne molida utilizando PCR de punto final para la detección de *Salmonella* spp. Línea: 1, 2, 4 y 6: muestras positivas. Línea: 3 y 5: muestras negativas. Línea: 7 Control positivo: *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076; Línea 8: control negativo: *E. coli* ATCC 25922; Línea M: Marcador de Peso molecular CienMarker (Biodynamics S.R.L., Buenos Aires, Argentina).

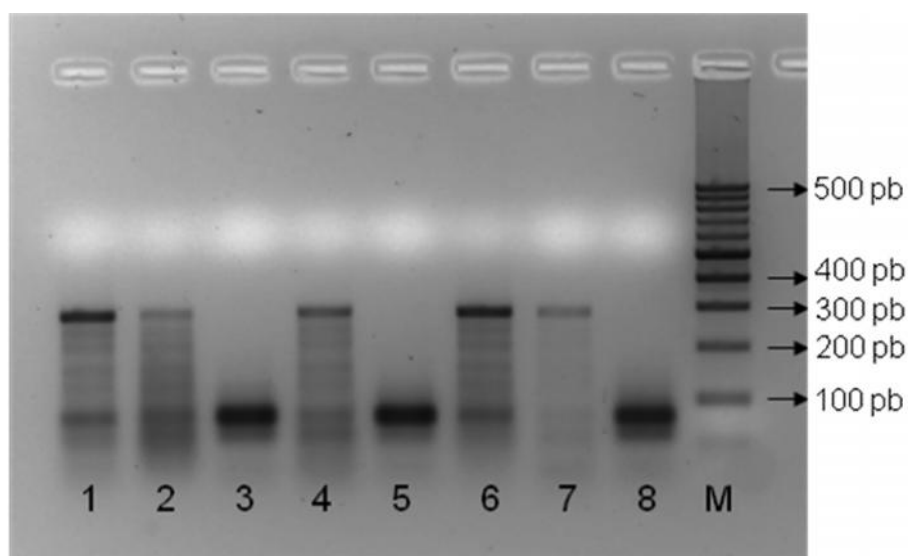


Figura 11: Se presenta una muestra con resultado negativo para *Salmonella* spp. (curva roja), Curva de Melting (CT: 71) obtenida por RT-PCR desarrollada y validada en una etapa intra- laboratorio.

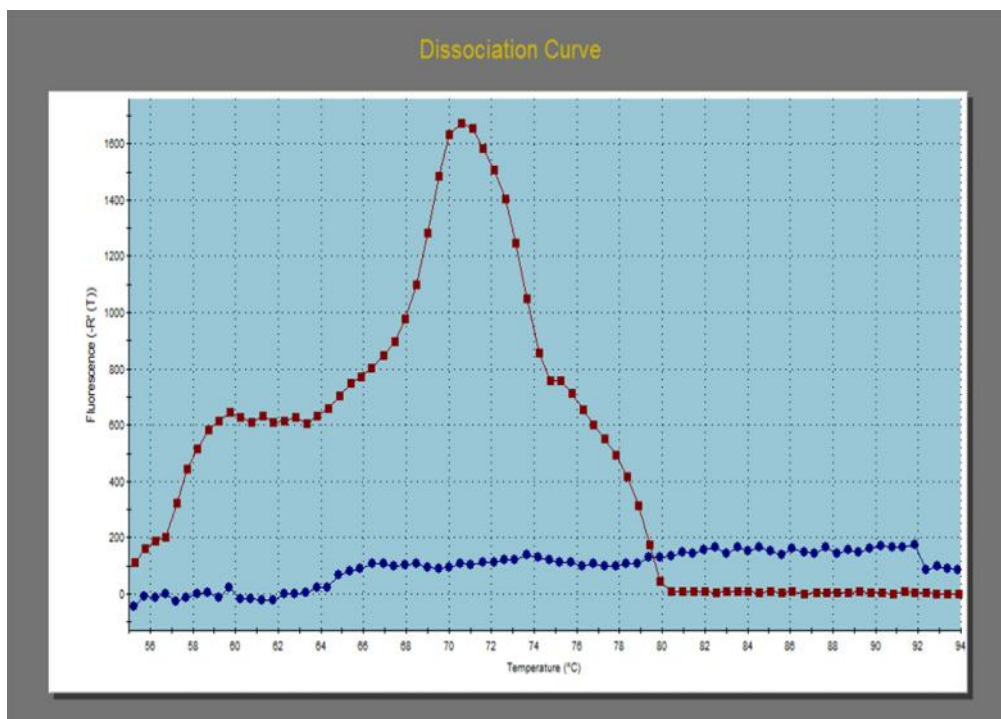
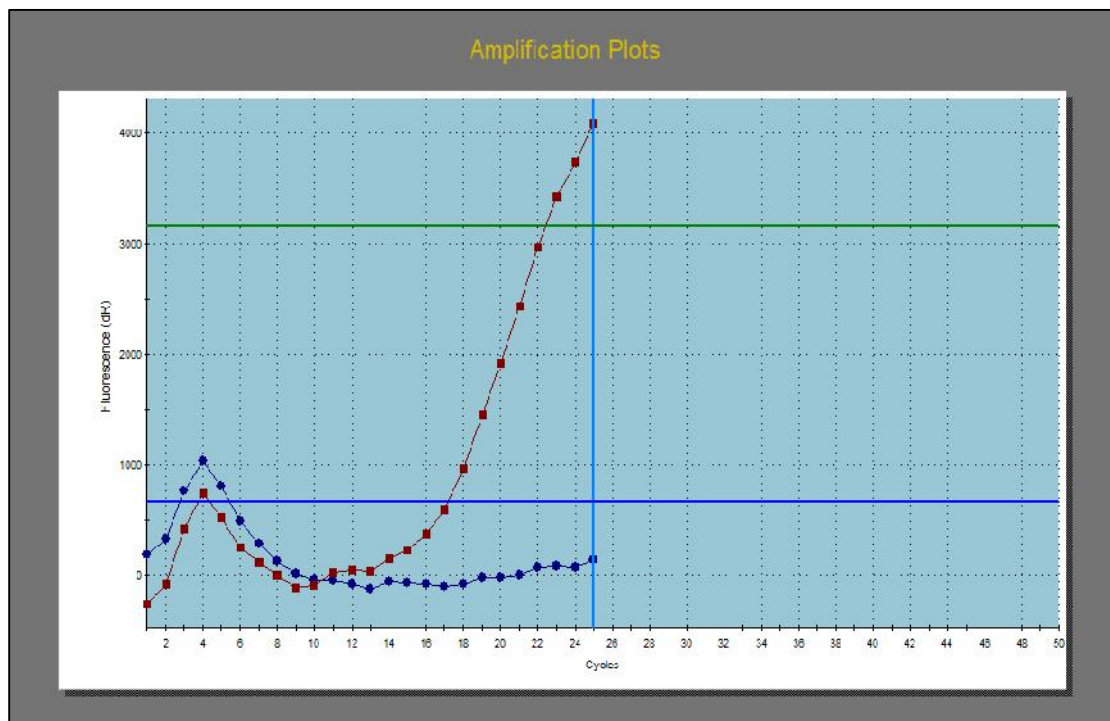


Figura 12: Se presenta una muestra con resultado positivo obtenido por RT-PCR comercial (curva roja: FAM) con el IAC negativo (curva azul) en el ciclo 25 (50 min).



9. TABLAS

Tabla 1: 12 cepas de *Salmonella enterica* portadoras del gen *invA* utilizadas para el diseño de los oligonucleótidos cebadores.

MICROORGANISMO	CEPA	MICROORGANISMO	CEPA
<i>Salmonella</i> Enteritidis	LAMA 107	<i>Salmonella</i> Newport	LAMA 129
<i>Salmonella</i> Dublin	LAMA 256	<i>Salmonella</i> Give	LAMA 133
<i>Salmonella</i> Choleraesuis	LAMA 127	<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	LAMA 370
<i>Salmonella</i> Typhimurium	LAMA 209	<i>Salmonella</i> Bredeney	LAMA 374
<i>Salmonella</i> Gaminara	LAMA 213	<i>Salmonella</i> Adamstua	LAMA 373
<i>Salmonella</i> Saintpaul	LAMA 124	<i>Salmonella</i> Stanley	LAMA 376

Tabla 2: Cepas *Salmonella* utilizadas para determinar la inclusividad de la técnica de RT-PCR desarrollada y validada en una etapa intra-laboratorio.

MICROORGANISMO	CEPA	MICROORGANISMO	CEPA
<i>Salmonella</i> Enteritidis	LAMA 107	<i>Salmonella</i> Typhimurium	LAMA 209
<i>Salmonella</i> Enteritidis	LAMA 123	<i>Salmonella</i> Gallinarum	LAMA 257
<i>Salmonella</i> Enteritidis	LAMA 135	<i>Salmonella</i> Gallinarum	LAMA 106
<i>Salmonella</i> Enteritidis	LAMA 110	<i>Salmonella</i> Infantis	LAMA 128
<i>Salmonella</i> Enteritidis	LAMA 366	<i>Salmonella</i> Newport	LAMA 129
<i>Salmonella</i> Enteritidis	LAMA 364	<i>Salmonella</i> Newport	LAMA 132
<i>Salmonella</i> Enteritidis	LAMA 253	<i>Salmonella</i> Give	LAMA 133
<i>Salmonella</i> Enteritidis	LAMA 120	<i>Salmonella</i> Saintpaul	LAMA 187
<i>Salmonella</i> Dublin	LAMA 256	<i>Salmonella</i> Saintpaul	LAMA 124
<i>Salmonella</i> Choleraesuis	LAMA 255	<i>Salmonella</i> Saintpaul	LAMA 371
<i>Salmonella</i> Choleraesuis	LAMA 127	<i>Salmonella</i> Agona	LAMA 188
<i>Salmonella</i> Typhimurium	LAMA 24	<i>Salmonella</i> Ohio	LAMA 191
<i>Salmonella</i> Typhimurium	LAMA 384	<i>Salmonella</i> Ohio	LAMA 194
<i>Salmonella</i> Typhimurium	LAMA 225	<i>Salmonella</i> Senftenberg	LAMA 116
<i>Salmonella</i> Typhimurium	LAMA 227	<i>Salmonella</i> Senftenberg	LAMA 367
<i>Salmonella</i> Typhimurium	LAMA 219	<i>Salmonella</i> Senftenberg	LAMA 192
<i>Salmonella</i> Typhimurium	LAMA 190	<i>Salmonella</i> Senftenberg	LAMA 196
<i>Salmonella</i> Derby	LAMA 368	<i>Salmonella</i> Rissen	LAMA 195
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	LAMA 370	<i>Salmonella</i> Gaminara	LAMA 213
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	LAMA 372	<i>Salmonella</i> Muenster	LAMA 215
<i>Salmonella</i> Adamstua	LAMA 373	<i>Salmonella</i> Bovismorbificans	LAMA 216
<i>Salmonella</i> Heidelberg	LAMA 113	<i>Salmonella</i> Tennessee	LAMA 365
<i>Salmonella</i> Mbandaka	LAMA 114	<i>Salmonella</i> Bredeney	LAMA 374
<i>Salmonella</i> Mbandaka	LAMA 380	<i>Salmonella</i> Stanley	LAMA 376
<i>Salmonella</i> Anatum	LAMA 118	<i>Salmonella</i> Albany	LAMA 369

Tabla 3: Cepas no *Salmonella* utilizadas para determinar la exclusividad de la técnica de RT-PCR desarrollada y validada en una etapa intra-laboratorio.

MICROORGANISMO	CEPA	MICROORGANISMO	CEPA
<i>Citrobacter freundii</i>	LAMA 485	<i>Shigella boydii</i>	LAMA 23
<i>Enterobacter cloacae</i>	LAMA 28	<i>Shigella dysenteriae</i>	LAMA 29
<i>Enterobacter faecalis</i>	LAMA 402	<i>Shigella flexneri</i>	LAMA 17
<i>E. coli</i> enterotoxigénico	LAMA 22	<i>Shigella flexneri</i>	LAMA 15
<i>E. coli</i> enteropatogénico	LAMA 19	<i>Shigella flexneri</i>	LAMA 10
<i>E. coli</i> enteroinvasivo	LAMA 14	<i>Shigella flexneri</i>	LAMA 5
<i>E. coli</i> enteroagregativo	LAMA 12	<i>Shigella flexneri</i>	LAMA 136
<i>Staphylococcus aureus</i>	LAMA 430	<i>Shigella sonnei</i>	LAMA 3
<i>Staphylococcus aureus</i>	LAMA 337	<i>Yersinia enterocolitica</i>	LAMA 2
<i>Staphylococcus aureus</i>	LAMA 326	<i>Hafnia alvei</i>	LAMA 27
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	LAMA 25	<i>Proteus vulgaris</i>	LAMA 18
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	LAMA 769	<i>Proteus mirabilis</i>	LAMA 16
<i>Morganella morgani</i>	LAMA 21	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LAMA 13
<i>Campylobacter coli</i>	LAMA 398	<i>Listeria innocua</i>	LAMA 259
<i>Campylobacter jejuni</i>	LAMA 399	<i>Listeria monocytogenes</i>	LAMA 258

Tabla 4: Tabla de contingencia para el análisis estadístico de los resultados.

		Aislamiento		
		Positivo	Negativo	Total
TAMIZAJE	Positivo	A Verdadero positivo	B Falso negativo	A + B
	Negativo	C Falso negativo	D Verdadero negativo	C + D
	Total	A + C	B + D	A + B + C + D

Tabla 5: Resultados positivos obtenidos luego del muestreo y procesamiento de 92 muestras de carne molida utilizando como tamizaje las técnicas moleculares PCR de punto final, RT-PCR desarrollada y validada en una etapa intra-laboratorio, y RT-PCR comercial. La metodología tradicional recomendada por BAM fue considerada *gold standard*.

Nº carnicería	PCR de punto final	RT-PCR desarrollada	RT-PCR comercial	Aislamiento
01	+	+	+	+
02	-	-	+	+
04	-	-	+	+
27	+	+	+	+
32	+	+	+	+
37	+	+	+	+
50	+	+	+	+
57	-	-	+	+
58	-	-	+	+
65	+	+	+	+
75	+	+	+	+
86	-	-	+	+
89	+	+	+	+

Tabla 6: Resultados del perfil bioquímico y serológico obtenidos a partir de los aislamientos obtenidos identificados con el número de carnicería.

	Aislamientos de <i>Salmonella</i> spp.												
	01	02	04	27	32	37	50	57	58	65	75	86	89
TSI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LIA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SH2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UREA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dulcitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
lactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rojo de metilo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato de Simmons	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Movilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ornitina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aglutinación	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 7 a: Análisis estadístico utilizando la tabla de contingencia. Se comparan los resultados obtenidos con la PCR de punto final y los obtenidos mediante la metodología de aislamiento.

		Aislamiento		
		Si	No	Total
PCR de punto final	Positivo	8	0	8
	Negativo	5	79	84
	Total	13	79	92

Tabla 7 b: Resultados del análisis estadístico de utilizando el programa Win Episcope 2.0 (Test Evaluación utilizando nivel de confianza 95%)

	%	Límite Inferior	Límite Superior
Sensibilidad	61,538	35,092	87,985
Especificidad	100,000	100,000	100,000
Prevalencia Verdadera	14,130	7,012	21,248
Prevalencia Aparente	8,696	2,938	14,453
Valor Predictivo +	100,000	100,000	100,000
Valor Predictivo -	94,048	88,988	99,107
	Valor	Límite Inferior	Límite Superior
J de Youden	0,6154	0,3509	0,8799

Tabla 8 a: Análisis estadístico utilizando la tabla de contingencia. Se comparan los resultados obtenidos con la técnica de PCR desarrollada y validada en una etapa intralaboratorio y los resultados obtenidos con la metodología de aislamiento.

		Aislamiento		
		Si	No	Total
RT- PCR	Positivo	8	0	8
desarrollada	Negativo	5	79	84
y validada	Total	13	79	92

Tabla 8 b: Resultados del análisis estadístico de utilizando el programa Win Episcope 2.0 (test Evaluación utilizando nivel de confianza 95%)

	%	Límite Inferior	Límite Superior
Sensibilidad	61,538	35,092	87,985
Especificidad	100,000	100,000	100,000
Prevalencia Verdadera	14,130	7,012	21,248
Prevalencia Aparente	8,696	2,938	14,453
Valor Predictivo +	100,000	100,000	100,000
Valor Predictivo -	94,048	88,988	99,107
	Valor	Límite Inferior	Límite Superior
J de Youden	0,6154	0,3509	0,8799

Tabla 9 a: Análisis estadístico utilizando la tabla de contingencia. Se comparan los resultados obtenidos con la RT-PCR comercial y los obtenidos mediante la metodología de aislamiento.

		Aislamiento		
		Si	No	Total
RT-PCR comercial	Positivo	13	0	13
	Negativo	0	92	92
	Total	13	92	105

Tabla 9 b: Resultados del análisis estadístico de utilizando el programa Win Episcope 2.0 (test Evaluación utilizando nivel de confianza 95%)

	%	Límite Inferior	Límite Superior
Sensibilidad	100,000	100,000	100,000
Especificidad	100,000	100,000	100,000
Prevalencia Verdadera	12,381	6,081	18,681
Prevalencia Aparente	12,381	6,081	18,681
Valor Predictivo ⁺	100,000	100,000	100,000
Valor Predictivo ⁻	100,000	100,000	100,000
	Valor	Límite Inferior	Límite Superior
J de Youden	1,0000	1,0000	1,0000

Tabla 10: Prueba de resistencia a los antibióticos realizada en los serotipos de *Salmonella* identificados.

Aislamiento	Serovar	Perfil de resistencia a los antibióticos									
		halos en mm									
		NAL	AMP	CFM	CTX	CIP	CHL	GEN	NIT	TET	SXT
01	S. Derby	10	24	26	30	27	24	22	20	19	27
02	S. Newport	22	22	25	30	31	25	21	20	18	27
04	S. Meleagridis	21	23	25	29	32	26	23	21	18	25
27	S. Newport	22	25	28	35	33	25	23	21	6	22
32	S. Give	21	23	25	31	33	25	22	20	18	27
37	S. Give	21	24	28	32	35	25	22	20	18	26
50	S. Anatum	20	24	27	33	32	24	22	22	16	26
57	S. Anatum	19	24	27	32	32	24	23	20	16	25
58	S. Derby	6	22	26	31	28	25	22	21	19	26
65	S. Derby	6	22	25	30	28	25	22	21	20	29
75	S. Derby	20	6	25	32	35	6	23	22	6	18
86	S. Derby	11	26	29	33	28	24	23	20	19	27
89	S. Newport	20	23	26	31	33	25	22	20	16	26

NAL: Ácido Nalidíxico, **AMP:** Ampicilina, **CFM:** Cefixima, **CTX:** Cefotaxima, **CIP:** Ciprofloxacino, **CHL:** Cloranfenicol, **GEN:** Gentamicina, **NIT:** Nitrofurantoína, **TET:** Tetraciclina, **STX:** sulfametoxazol. Los números rojos corresponden a aislamientos resistentes.

Anexo 2. Resultados de las encuestas realizadas en 92 establecimientos expendedores de carne en la ciudad de Berisso.

Item	comercios	%
Carne con documentación que avala su procedencia	75	81,5
Hay un lugar donde se puede realizar la higiene y desinfección de manos y utensilios	83	90,2
El local tiene baño	78	84,8
El baño ¿tiene antebañó?	25	26,1
El baño ¿contacta con el lugar de expendio?	24	26,1
¿Posee filtro sanitario?	5	5,4
¿Posee un procedimiento de sanitización estandarizado?	0	
El desposte ¿se realiza en el establecimiento?	84	91,3
La carne ¿se tritura en el momento?	22	23,9
Ropa completa (bota, pantalón, casaca, gorro)	20	21,5
Posee cofia	6	6,5
Usa guantes	0	
Presencia de animales	12	13,0
Posee agua de red	92	100,0
Agua caliente	22	23,9

Comercios que comercializan otros alimentos además de carne fresca

Productos	comercios	%
Productos cocidos	33	35,9
Pescado	10	10,9
Quesos	24	26,1
Verduras	14	15,2
Fiambres	31	33,7

Resultados obtenidos de la inspección visual respecto de la sanitización de los pisos de los comercios expendedores de carne fresca

sanitización	comercios	%
Muy buena	0	
Buena	25	27,2
Regular	51	55,4
Mala	16	17,4

Resultados obtenidos de la inspección visual respecto de la sanitización de las superficies que no contactan con los alimentos

sanitización	comercios	%
Muy buena	0	
Buena	24	26,1
Regular	61	66,3
Mala	7	7,6

Resultados obtenidos de la inspección visual respecto de la sanitización de las superficies que contactan con los alimentos

Mesadas		
sanitización	comercios	%
Muy buena	0	
Buena	15	16,3
Regular	65	16,3
Mala	12	13,0

Cuchillos		
sanitización	comercios	%
Muy buena	0	
Buena	12	13,0
Regular	69	75,0
Mala	11	12,0

Picadora		
sanitización	comercios	%
Muy buena	0	
Buena	11	12,0
Regular	71	77,2
Mala	10	10,9

Bandejas		
sanitización	comercios	%
Muy buena	0	
Buena	14	15,2
Regular	67	72,8
Mala	7	7,6

Resultados obtenidos de la inspección visual respecto del estado sanitario de la ropa del personal

sanitización	comercios	%
Muy buena	0	
Buena	19	20,7
Regular	66	71,7
Mala	7	7,6

- **Preguntas al personal**

Lavado de manos

Suficiente 1 (1,1%) Insuficiente 91 (98,9%)

Sanitización general del comercio

Suficiente 3 (3,3%) Insuficiente 89 (96,7%)