

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES A LA DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE PATÓGENOS ALIMENTARIOS

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNA: LARA SOBRINO GREGORIO

TUTORA: ANA ISABEL JIMÉNEZ BELENGUER

COTUTORA: ANA GONZÁLEZ PELLICER

Curso Académico: 2013/2014

VALENCIA, 30 DE JUNIO DE 2014

Licencia Creative Commons “Reconocimiento no Comercial –Sin Obra Derivada”



TÍTULO: APLICACIÓN DE MÉTODOS MOLECURALES A LA DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE PATÓGENOS ALIMENTARIOS

RESUMEN: Los riesgos microbiológicos y las enfermedades de transmisión alimentaria son un problema de salud pública cada vez mayor. En muchos países se han registrado durante los últimos decenios aumentos significativos de la incidencia de enfermedades provocadas por microorganismos transmitidos principalmente por los alimentos y el agua. En este trabajo se tiene como objetivo determinar la calidad microbiológica de muestras de alimentos presentes en el mercado, concretamente de carne picada de ternera y de cerdo, teniendo en cuenta las normas microbiológicas vigentes. Para ello se analizó la presencia de aerobios mesófilos, *Salmonella* sp., *Escherichia coli* y *Arcobacter* sp. en un total de 7 muestras de carne picada adquiridas en mercados municipales de la provincia de Valencia, mediante métodos culturales clásicos y métodos moleculares, en concreto la técnica de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para *Salmonella* y *Arcobacter*. Los resultados obtenidos indicaron altos valores en los recuentos de aerobios mesófilos, así como tres resultados positivos para *Salmonella* y dos para *Escherichia coli* en las siete muestras analizadas en el laboratorio, lo que indica una mala higiene en la manipulación de la carne o en el lugar de la compra. En cambio, se obtuvo resultados negativos para el género *Arcobacter*, tanto por método de cultivo como por PCR, lo que indica que dicha carne no estaba contaminada por este patógeno emergente. Además se estudió la sensibilidad a antimicrobianos en *Escherichia coli* mediante el método del antibiograma disco-placa obteniendo como resultado multiresistencia a varios de los antibióticos utilizados, lo que implica un posible abuso en la utilización de antibióticos en producción animal, indicando la necesidad de disminuir su uso en dicho ámbito.

Palabras clave: carne picada de cerdo, carne picada de ternera, aerobios mesófilos, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Arcobacter*, normas microbiológicas, PCR, resistencia a antibióticos.

ABSTRACT: Microbiological risks and food-borne diseases are an ever-increasing public health problem. In recent decades, significant increases in the incidence of diseases caused by microorganisms which are mainly food- and water-borne have been recorded in many countries. The aim of this paper is to determine the microbiological quality of food samples present on the market, specifically minced beef and pork, taking into account the microbiological standards currently in force. For this purpose, the presence of mesophilic aerobic micro-organisms, *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, and *Arcobacter* sp. was analyzed in a total of 7 samples of minced meat purchased in municipal markets in the province of Valencia, using conventional cultural and molecular methods, namely the PCR (Polymerase Chain Reaction) technique for *Salmonella* and *Arcobacter*. The findings obtained showed high values in counts of mesophilic aerobic micro-organisms as well as three positive results for *Salmonella* and two for *Escherichia coli* in the seven samples analyzed in the laboratory, indicating poor hygiene in the handling of the meat or in the place of purchase. However, negative results were obtained for the *Arcobacter* genus, both by culture method and by PCR method, indicating that the mentioned meat was not contaminated by this emerging pathogen. Furthermore, the sensitivity to antimicrobials was studied in *Escherichia coli* by means of the antibiogram disc-plate method, obtaining as a result multi-resistance to several of the antibiotics used, which implies a possible abuse in the use of antibiotics in animal production and indicates the need to reduce their use in this area.

Keywords: minced pork, minced beef, mesophilic aerobic micro-organisms, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Arcobacter*, microbiological standards, PCR, antibiotic resistance.

Autor del TFG: Dña. Lara Sobrino Gregorio

Tutora Académica: Prof. Dña. Ana Isabel Jiménez Belenguer

Cotutora: Dra. Dña. Ana González Pellicer

Valencia, Junio de 2014

Mi agradecimiento, en primer lugar, va dirigido a Ana Jiménez, Ana González y M^a Antonia Ferrús, por darme la oportunidad de realizar un trabajo en el que he puesto todo mi esfuerzo e ilusión. Gracias por la confianza ofrecida y la ayuda mostrada durante todo este tiempo, en el que se pasan momentos malos, pero también momentos muy buenos. Gracias por todo.

En segundo lugar, gracias a mis compañeros, así como al apoyo ofrecido por Nancy durante todas las mañanas en el laboratorio. Gracias por haberme dejado ser tal y como soy, y poder así disfrutar del trabajo realizado.

Agradecer a Erik su apoyo incondicional, su paciencia y su forma de alegrarme el día. Gracias por aguantarme en los momentos difíciles y por empujarme a seguir adelante en todas mis decisiones.

Por último, y no por ello menos importante, agradecerles a mis padres, Rosario y Julio, y mi hermana, Agua, todo lo que hacen por mí. Gracias por ayudarme, por estar ahí, por disfrutar también de cada momento logrado, sin vuestro apoyo este trabajo nunca se habría escrito y, por eso, este trabajo es también vuestro.

A todos, muchas gracias.

I. INTRODUCCIÓN	1
1. La carne	1
1.1. Vías de contaminación microbiológica en la carne	1
1.2. Factores que afectan al crecimiento de la microbiota inicial	1
2. La carne de vacuno y de cerdo	2
3. La carne picada	2
4. Normas microbiológicas	3
4.1. Aerobios mesófilos.....	4
4.1.1. Asociación con alimentos	4
4.2. <i>Escherichia coli</i>	5
4.2.1. Parámetros de crecimiento	5
4.2.2. Características bioquímicas	5
4.2.3. Poder patógeno	6
4.2.4. Asociación con los alimentos.....	7
4.2.5. Control de <i>Escherichia coli</i>	7
4.3. <i>Salmonella</i>	7
4.3.1. Parámetros de crecimiento	8
4.3.2. Características bioquímicas	9
4.3.3. Poder patógeno	9
4.3.4. Asociación con los alimentos.....	10
4.3.5. Control de <i>Salmonella</i>	11
4.4. <i>Arcobacter</i>	11
4.4.1. Parámetros de crecimiento	12
4.4.2. Características bioquímicas	12
4.4.3. Poder patógeno	13
4.4.4. Asociación con alimentos	13
5. Resistencia a antibióticos en bacterias presentes en alimentos.....	14
5.1. Fundamento del método antibiograma disco-placa.....	15
5.1.1. Indicaciones y limitaciones	15
6. Métodos moleculares de detección de patógenos	15
6.1. Fundamento de la PCR.....	15
6.1.1. Ventajas y desventajas	16
II.OBJETIVOS.....	18
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
1. Origen de las muestras	19
2. Análisis de las muestras	19
2.1. Toma de muestras	19

2.2. Análisis microbiológico	19
2.2.1. Método horizontal para el recuento de microorganismos: Recuento de colonias a 37°C mediante la técnica de siembra en profundidad (según la ISO 4833-1:2013)	19
2.2.2. Recuento de enterobacterias lactosa positivo (coliformes totales) y detección de <i>Escherichia coli</i> (Pascual y Calderón, 2000)	20
2.2.3. Método horizontal para la detección de <i>Salmonella</i> spp (según la norma ISO 6579:2002).....	20
2.2.4. Identificación de <i>Arcobacter</i>	21
3. Estudio de la sensibilidad a antimicrobianas en <i>E. coli</i>.	22
3.1. Método del antibiograma disco-placa	23
4. Detección de <i>Salmonella</i> y <i>Arcobacter</i> mediante métodos moleculares	23
4.1. Extracción de ADN	23
4.2. Detección de <i>Salmonella</i> y <i>Arcobacter</i> mediante PCR	24
4.2.1. PCR <i>Salmonella</i>	24
4.2.2. PCR <i>Arcobacter</i>	25
IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
1. Recuento de aerobios mesófilos	26
2. Detección e identificación de <i>Escherichia coli</i>	27
2.1. Mediante método por cultivo.....	27
2.2. Número Más Probable (NMP)	28
2.3. Estudio de la sensibilidad a antimicrobianos en <i>E.coli</i> mediante el método del antibiograma disco-placa.....	28
3. Detección e identificación de <i>Salmonella</i>	30
3.1. Mediante método por cultivo.....	30
3.2. Mediante el método de la PCR	31
4. Detección e identificación de <i>Arcobacter</i>	32
4.1. Mediante método por cultivo.....	32
4.2. Mediante el método de la PCR	32
V. CONCLUSIONES	34
VI. BIBLIOGRAFÍA	35
VII. ANEJO I	I

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Normas microbiológicas para la carne picada	3
Tabla 2: Taxonomía del género <i>Arcobacter</i>	11
Tabla 3: Muestras de carne picada	19
Tabla 4: Antibióticos utilizados en el trabajo y su clasificación	22
Tabla 5: Antimicrobianos y concentración de uso en el ensayo de sensibilidad	23
Tabla 6: Reactivos para la PCR de <i>Salmonella</i>	24
Tabla 7: Condiciones de la PCR para la amplificación	24
Tabla 8: Reactivos para la PCR de <i>Arcobacter</i>	25
Tabla 9: Condiciones de la PCR para la amplificación	25
Tabla 10: Recuentos de aerobios mesófilos en la carne picada de cerdo y de ternera analizada	26
Tabla 11: Tabla del NMP por gramo o mililitro	28
Tabla 12: Resultados de las resistencias de los aislados frente a los 12 antibióticos.....	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Gráfico del recuento de aerobios mesófilos	26
Figura 2: IMViC positivo para <i>Escherichia Coli</i>	27
Figura 3: Porcentaje de los antibióticos según su clasificación como resistentes, intermedios o sensibles	29
Figura 4: Resistencia a antibióticos en el aislado 1.....	29
Figura 5: Detección de <i>Salmonella</i> mediante PCR: muestra 5 a la 7 a distintos tiempos.....	31
Figura 6: Detección de <i>Arcobacter</i> mediante PCR: muestra 1 a la 4 a distintos tiempos.....	33

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico
APPCC: Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control
aprox.: Aproximadamente
ARN: Ácido Ribonucleico
a_w: Actividad de agua
BES: Boletín Epidemiológico Semanal
BIOHAZ: El Panel sobre Riesgos Biológicos de la EFSA
B.O.E: Boletín Oficial del Estado
BPA: Buenas Prácticas Agrícolas
BPF: Buenas Prácticas de Fabricación
BPH: Buenas Prácticas de Higiene
CECT: Colección Española de Cultivos Tipo
CITAIVIA: Centro de Tecnología Animal
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI: Concentración Mínima Inhibitoria
DAEC: *E.coli difuso-adherentes*
dNTPs: Desoxirribonucleótido trifosfato
EAggEC: *E.coli enteroagregativa*
EFSA: European Food Safety Authority
Eh: Potencial de óxido-reducción
EHEC: *E.coli enterohemorrágico*
EIEC: *E.coli enteroinvasor*
EPEC: *E.coli enteropatógeno*
ETEC: *E.coli enterotoxigénico*
FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
ICMSF: International Commission on Microbiological Specifications for Foods
IMViC: Indol, Rojo de metilo, Voges Proskauer, Citrato de Simmons
ISO: International Organization for Standardization
ISPCH: Instituto de Salud Pública de Chile
LT: Toxina termolábil
MAGRAMA: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio ambiente
NMP: Número Más Probable
OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal
OMS: Organización Mundial de la Salud
pb: Pares de bases
PCR: Reacción de la Polimerasa en Cadena
rRNA: Ácido ribonucleico ribosómico
RT-PCR: Reverse Transcriptase PCR
SIM: Sistema de Información Microbiológico
ST: Toxina termoestable
UFC: Unidades Formadoras de Colonias
UV: Ultravioleta
VP: Voges-Proskauer
VTEC: *E.coli* productor de Verotoxina

I. INTRODUCCIÓN

1. La carne

En la base para la alimentación humana se encuentra la carne, gracias a su alto valor nutritivo proporcionado principalmente por su riqueza proteica, es por eso que su industria es de las más importantes en el sector alimentario. Sin embargo, la carne es un alimento perecedero debido a sus características de composición, pH y actividad de agua (a_w), constituyendo un medio idóneo para el crecimiento de microorganismos (Pascual y Calderón, 2000). Por eso, un aspecto importante, tanto para los consumidores como para las autoridades sanitarias, es el aspecto sanitario, ya que la carne puede ser contaminada por microorganismos patógenos y transferir diversas enfermedades.

A menudo, la transmisión de enfermedades mediante la carne puede ser evitada con el buen cocinado de la misma. Normalmente las intoxicaciones por estos productos son debidas a un consumo inadecuado de la carne cruda, insuficientemente cocinada o por la posterior contaminación del producto cocinado debido a las malas condiciones higiénicas y de mantenimiento (Bermúdez y Rodríguez, 2001).

1.1. Vías de contaminación microbiológica en la carne

En un animal recién sacrificado encontramos una microbiota muy escasa en la profundidad del músculo (1 microorganismo/gramo aprox.) procedente, generalmente, del intestino siendo transportada al músculo por la sangre. En la parte superficial de la carne encontramos mayor contaminación microbiana, especialmente en la canal, ya que se trata de la parte de la carne expuesta al ambiente del matadero y depende, en gran medida, de las condiciones higiénicas de manipulación. Después de la contaminación debida al sacrificio, ésta continúa en los procesos de desuello, evisceración y despiece provocada por la gran facilidad de contaminación por microorganismos procedentes del intestino, suelo, ambiente o personas que manipulan las canales o piezas de carne.

A continuación, debido a la refrigeración de la carne, puede aparecer contaminación cruzada con otros productos o carnes, además de la contaminación causada por el crecimiento de microorganismos psicrófilos. Por último, la contaminación podrá agravarse en el transporte de las canales o piezas de carne a los lugares de venta y en su posterior almacenamiento si no tenemos las condiciones higiénicas adecuadas.

Principalmente, la contaminación microbiana que habitualmente se encuentra en carne pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Leuconostoc*, *Flavobacterium*, *Proteus*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Chromobacterium*, *Streptomyces*, levaduras (*Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*), mohos (*Sporotricum*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Geotricum*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Monilia*, *Aspergillus*, *Thamnidium*) y microorganismos que provocan enfermedades como salmonelosis (*Salmonella*), brucelosis (*Brucella*), carbunco (*Bacillus anthracis*) o tularemia (*Pasteurella tularensis*) (Pascual y Calderón, 2000).

1.2. Factores que afectan al crecimiento de la microbiota inicial

Los principales factores que influyen en el crecimiento de los microorganismos en las carnes son la actividad de agua (a_w), el potencial de óxido-reducción, el pH y la temperatura.

La actividad de agua (a_w) en carne fresca es de 0,98-0,99, siendo valores favorables para la multiplicación de todas las especies microbianas, ya que cuanto mayor actividad de agua, mayor desarrollo microbiano hay. En cuanto al potencial de óxido-reducción (Eh),

inmediatamente después de la muerte del animal, el músculo todavía tiene en su interior reservas de oxígeno que hacen que el Eh sea positivo y elevado, lo que favorece el crecimiento de los microorganismos aerobios. Después, las reservas de oxígeno se agotan y el Eh profundo disminuye y se hace negativo, favoreciendo ahora a los microorganismos anaerobios de la putrefacción. El pH también influye en el crecimiento microbiano, ya que al descender el pH de la carne después de la muerte del animal, baja la velocidad del crecimiento de los microorganismos. Por último, un factor muy importante es la temperatura, ya que a menor temperatura se producirá menor crecimiento microbiano, por eso la carne debe ser inmediatamente conservada a bajas temperaturas para evitar su mayor contaminación (Bourgeois y col., 1994). Al refrigerar la carne se consigue inhibir el desarrollo de los microorganismos en general, exceptuando la microbiota psicrófila y algunos mohos y levaduras que soportan las bajas temperaturas. En cambio, con la congelación se consigue destruir algunas bacterias e inhibir el crecimiento de otras. Éste método no asegura la destrucción de todos los microorganismos patógenos, por lo tanto los productos deben ser controlados después de su descongelación para evitar toxiinfecciones alimentarias (Pascual y Calderón, 2000).

2. La carne de vacuno y de cerdo

El consumo total de carne en España durante el 2013 descendió respecto a los años anteriores, siendo 2.431.301,27 miles de kg la cantidad consumida en los hogares. En el caso de la carne de vacuno, disminuyó su consumo en un 4,5% dando 203.291,38 miles de kg consumidos durante el año y 495.551,65 miles de kg en carne de cerdo, la cual aumentó en un 0,8% su consumo en 2013 (MAGRAMA, 2014).

3. La carne picada

Según la Orden de 14 de Enero de 1986, por la que se aprueba la norma de calidad para carnes picadas de vacuno, ovino y porcino destinadas al mercado interior (B.O.E.21.01.1986) se define a la carne picada como un producto constituido por carne magra de vacuno, ovino o porcino, debidamente picada, que no ha sufrido ni la acción del calor, ni la maduración, ni la maceración. Además en dicho producto no se admitirán otros ingredientes facultativos ni aditivos y deberá tener las características organolépticas adecuadas (B.O.E.21.01.1986).

En cuanto a la contaminación microbiana producida en la carne picada, es mucho mayor debido a que, durante el picado de la carne, se liberan los constituyentes y líquidos celulares proporcionando una fuente nutritiva óptima para los microorganismos. Además, aumenta el área superficial de la carne por lo que los microorganismos tienen facilidad para disponer del oxígeno y se origina un crecimiento de los mismos por toda la superficie de la carne.

La población microbiana alterativa se compone fundamentalmente de micrococáceas, bacterias lácticas, *Brochothrix thermosphacta*, psicrótrofos y enterobacterias, responsables de una serie de cambios no deseables en dicho producto. El tipo de microorganismo varía en función de las condiciones del producto y de los tratamientos que recibe. Así, los microorganismos psicrotrofos como *Pseudomonas* crecerán sobre todo en productos que no lleven sal (compuesto que inhibe el crecimiento de la mayoría de los microorganismos debido a la disminución de a_w que provoca) u otros ingredientes como especias y aditivos, como es el caso de las hamburguesas.

En general los recuentos microbianos de la carne picada comercial son de 10 a 100 veces mayores que los que se obtienen de las correspondientes piezas enteras. El desarrollo dependerá del producto cárnico y de los envases que rodeen a dicho producto, ya que si se utiliza envases con películas impermeables habrá menos oxígeno disponible para los microorganismos y tardarán más tiempo en aparecer (Bermúdez y Rodríguez, 2001).

4. Normas microbiológicas

Según la Orden, de 14 de Enero de 1986, por la que se aprueba la norma de calidad para carnes picadas de vacuno, ovino y porcino destinadas el mercado interior (B.O.E.21.01.1986) se establece que para obtener una buena higiene en la carne picada se tiene que utilizar carnes procedentes de animales que hayan pasado la inspección *ante* y *post mortem* y que cumplan la Reglamentación Técnico-Sanitaria correspondiente. Además, la carne picada de las carnicerías debe estar en bandejas o envases perfectamente limpios, expuestos a la vista del público dentro de los expositores frigoríficos. La manipulación de dicha carne deberá hacerse con espátula o instrumentos dedicados exclusivamente a dicha función, que impida el contacto manual y que sea de fácil limpieza (B.O.E.21.01.1986).

Una buena higiene significa obtener un buen resultado respecto a la ausencia de microorganismos no deseables para dicho producto. En las normas microbiológicas para canales bovinos y porcinos se hace referencia a la determinación de los microorganismos *Salmonella*, *Enterobacteriaceae* y aerobios mesófilos mediante el uso de la norma ISO más actual. Parecidas son las determinaciones que se realizan a la carne picada de ternera y cerdo (tabla 1), utilizadas en este trabajo, ya que las normas microbiológicas indican la obligatoriedad de determinar, mediante las normas ISO vigentes, *Salmonella*, colonias aerobias y *E.coli*. Los resultados en los análisis se compararán con los criterios microbiológicos para poder interpretar los resultados y clasificar el producto como satisfactorio o insatisfactorio (en el caso de la determinación de *Salmonella*) y satisfactorio, aceptable o insatisfactorio (en el caso del recuento de colonias aerobias y *E.coli*). Dependiendo de los resultados, el producto se considerará apto o no apto para el consumo humano.

Tabla 1: Normas microbiológicas para la carne picada

Parámetro	Criterios de seguridad alimentaria	Criterios de higiene de los procesos	
	<i>Salmonella</i>	Recuento de colonias aerobias	<i>E.coli</i>
Método de referencia	EN/ISO 6579*	ISO 4833*	ISO 16649-1 ó 2*
Categoría de alimento	Carne picada a base de especies distintas a las aves de corral destinada a ser consumida cocinada	Carne picada	Carne picada
Criterio microbiológico	n=5, c=0, m=Ausencia en 10g, M=Ausencia en 10g	n=5, c=2, m=5x10 ⁵ ufc/g, M=5x10 ⁶ ufc/g	n=5, c=2, m=50 ufc/g, M=500 ufc/g
Fase en la que se aplica el criterio	Productos comercializados durante su vida útil	Final del proceso de fabricación	
Interpretación del resultado	<u>Satisfactorio</u> , si todos los valores observados indican ausencia de la bacteria. <u>Insatisfactorio</u> , si se detecta la presencia de la bacteria en cualquiera de las muestras	<u>Satisfactorio</u> , si todos los valores observados son ≤ m. <u>Aceptable</u> , si un máximo de c/n valores se encuentran entre m y M y el resto de los valores observados son ≤ m. <u>Insatisfactorio</u> , si uno o varios valores son > M o más de c/n valores se encuentran entre m y M.	
Acción en caso de resultado insatisfactorio		Mejoras en la higiene de la producción y mejoras en la selección y/o el origen de las materias primas	

*Se utilizará la última versión de la norma

*Para la interpretación de los resultados: n= número de unidades que componen la muestra; c= número de muestras que dan valores entre m y M; m= número máximo de unidades formadoras de colonias (UFC) o número más probable (NMP) sobre gramo o mililitro de alimento; M= es una cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) o número más probable (NMP) sobre gramo o mililitro de alimento que se usa para separar la calidad marginalmente aceptable de la inaceptable.

Para la toma de muestras y preparación de éstas para las pruebas se tendrá como método de referencia las normas ISO y las directrices del *Codex Alimentarius*, sabiendo que la frecuencia de muestreo para el análisis microbiológico de carne picada en los mataderos o establecimientos donde la produzcan se realizará al menos una vez por semana, cambiando el día de la toma de muestra cada semana, exceptuando casos en los que se podrá reducir la frecuencia de muestreo por determinadas condiciones (SEM, 2014).

4.1. Aerobios mesófilos

Son un conjunto de microorganismos que son capaces de multiplicarse en aerobiosis a temperaturas comprendidas entre 25°C y 40°C. Se pueden identificar después de incubar a una temperatura alrededor de 31°C durante 72 horas, en agar de recuento, dando lugar a colonias visibles y contables (Pascual Anderson, 1989). Sus tasas de crecimientos son elevadas y la duración de su proliferación relativamente corta (de 1 a varios días para alcanzar la fase estacionaria). Se suelen encontrar en alimentos almacenados a temperatura ambiente o en los alimentos refrigerados cuando se ha roto la cadena de frío. Son indicadores del nivel higiénico-sanitario general del producto (Bourgeois y col., 1994).

4.1.1. Asociación con alimentos

En un alimento, una microbiota total alta determina el comienzo de un proceso de alteración, aunque no hay una relación directa entre cantidad de microbiota total y el tiempo de aparición de los fenómenos de alteración, ya que éstos pueden ser consecuencia de un grupo específico de microorganismos que representen un número muy escaso dentro de la población bacteriana total. Además no existe una relación íntima entre el alto número de microbiota total y la presencia de microorganismos patógenos, ya que puede que la mayoría sean no patógenos.

Con el recuento de microorganismos aerobios mesófilos podemos conocer, en conjunto, la calidad microbiológica de los alimentos en los que realizamos dicho procedimiento, sin relacionarla con la presencia directa de microorganismos patógenos, ya que estos deben determinarse de forma directa con métodos específicos para conocer la peligrosidad o inocuidad de dichos alimentos. En cambio, hay microorganismos no patógenos encontrados en los recuentos totales que, en grandes cantidades, pueden ocasionar enfermedades. Este puede ser el caso de *Pseudomonas*, *Proteus*, *Bacillus*, etc.

En cualquier caso, un alimento en el cual el recuento total haya salido elevado, debe ser considerado un alimento impropio para el consumo humano (Pascual Anderson, 1989), tal y como se especifica en las normas microbiológicas de carne picada, clasificando al alimento como insatisfactorio. Altos recuentos microbianos pueden significar que la materia prima esté excesivamente contaminada o que haya deficientes métodos de manipulación durante la elaboración de los productos. Además cabe la posibilidad de tratarse de microorganismos patógenos o de producirse una alteración del producto (tasas superiores a 10^6 - 10^7 microorganismos por gramo suelen corresponder ya al inicio de la descomposición) (Pascual y Calderón, 2000).

Hay dos casos en los que el estudio de la microbiota mesófila total no es adecuado. Esto ocurre cuando tratamos con productos fermentados, ya que estos productos contienen cifras

elevadas de microorganismos que son imprescindibles en la fermentación y forman parte de ella, o en los productos esterilizados, ya que hay que tener en cuenta que la ausencia de microorganismos viables no avala la calidad bacteriológica de la materia prima con la que se ha elaborado el alimento (Pascual Anderson, 1989).

4.2. *Escherichia coli*

Escherichia coli es una especie perteneciente al género *Escherichia*, de la familia *Enterobacteriaceae*, y está integrada por bacilos cortos, Gram negativos, casi siempre móviles y pocas veces encapsulados (Pascual Anderson, 1989). Su nombre proviene del bacteriólogo Theodor Escherich, quien aisló por primera vez en heces de niños con enteritis dicha bacteria en el año 1885.

E.coli se encuentra en el intestino de las personas y los animales de sangre caliente, donde es el anaerobio facultativo predominante, aunque sólo es un componente secundario de su microbiota total. Su presencia en las heces, su fácil cultivabilidad, su carácter generalmente no patógeno y las características de su supervivencia en el agua determinan que *E.coli* se utilice como indicador de contaminación fecal y de la posible presencia de patógenos entéricos, como puede ser *S.Typhi* en el agua.

En 1945, Kauffmann propuso un esquema de serotipado para *E.coli* basado en los antígenos somático de naturaleza polisacárida (O), flagelar (H) y capsular (K). En la actualidad estos antígenos son de aplicación en el sistema O:H, donde los serogrupos principales se definen por los antígenos O y después se subdividen en serovariedades en base a los antígenos H. Las cepas de cada uno de los tipos de *E.coli* patógeno tienden a encuadrarse en determinados serotipos O: H (Adams y Moss, 1997).

4.2.1. Parámetros de crecimiento

La temperatura de crecimiento de *E.coli* se encuentra entre 15º y 45ºC, siendo la temperatura óptima 37ºC y destruyéndose en 15 minutos a 60ºC o en 1 hora a 55ºC (Pascual Anderson, 1989). Es capaz de resistir el almacenamiento en refrigeración o en congelación durante tiempos prolongados. Un pH casi neutro es óptimo para su crecimiento y su actividad de agua (a_w) mínima para el desarrollo se encuentra en 0,95.

4.2.2. Características bioquímicas

Escherichia coli es catalasa-positivo y oxidasa-negativo (Adams y Moss, 1997) y algunas de sus reacciones funcionan mejor a 44ºC que a 37ºC. Además los resultados pueden verse modificados según las cepas de *E.coli*: la mayoría de las cepas de *E.coli* fermentan la lactosa con producción de ácido y gas en el transcurso de 24 a 48 horas, en cambio existen cepas que no fermentan la lactosa o la fermentan lentamente. Pasa algo parecido con la ureasa, *E.coli* es normalmente ureasa negativo, habiendo algunas cepas aisladas de enteritis infantil que se han manifestado como ureasa positiva. También ocurre con el SH₂, encontrando resultados positivos en vez de negativos, siendo este último caso lo normal. Pasa lo mismo con la beta galactosidasa, obteniendo en algunas cepas involucradas en enteritis resultados negativos, siendo lo normal resultados positivos (Pascual Anderson, 1989).

Para *E.coli* suele utilizarse un grupo importante de pruebas llamadas en su conjunto IMViC. Estas pruebas se utilizan para ensayar la capacidad para producir indol del triptófano (I), producir el ácido suficiente para disminuir el pH del medio por debajo de 4,4, punto de viraje del indicador rojo de metilo (M), producir acetoina (V: prueba de Voges-Proskauer (VP)) y utilizar el citrato(C). La mayoría de cepas de *E.coli* producirá como resultados: indol y rojo de metilo positivo y citrato y Voges-Proskauer negativos.

4.2.3. Poder patógeno

Las cepas de *E.coli* que causan enfermedades diarreicas se clasifican en grupos específicos dependiendo de las propiedades de virulencia, los mecanismos de patogenicidad, los síndromes clínicos y distinción en los serogrupos O: H (Doyle y col., 1997). Estas categorías incluyen:

- *E.coli enterotoxigénico* (ETEC):

La enfermedad que causa suele aparecer entre las 12 y las 36 horas desde la ingestión del organismo. Los síntomas son variables, desde una ligera diarrea afebril hasta un síndrome grave parecido al cólera, con heces acuosas sin sangre ni moco, dolores de estómago y vómito. Dicha enfermedad suele durar de 2 a 3 días, aunque en países en desarrollo causa diarreas en niños, pudiendo provocar una deshidratación grave (Adams y Moss, 1997). También son causa de la denominada “enfermedad de los turistas” o “diarrea del viajero”, habitual en personas que viajan a países en desarrollo donde se encuentra este tipo de *E.coli* (Pascual Anderson, 1989).

Hay dos tipos de toxinas: las toxinas termoestables (ST), que son capaces de resistir 100°C durante 15 minutos, y las toxinas termolábiles (LT), que se inactivan a 60°C en 30 minutos y pH bajo (Adams y Moss, 1997). En el caso de las toxinas LT, producen una diarrea profusa con pérdida excesiva del líquido y electrolitos en el intestino, en cambio las toxinas ST tienen un poder antigénico escaso o nulo (Pascual Anderson, 1989).

- *E.coli enteroinvasor* (EIEC):

La enfermedad origina síntomas gastrointestinales parecidos a las de una *shigelosis*. Los signos clínicos más relevantes son: fiebre, dolores abdominales intensos, malestar y con frecuencia una diarrea acuosa mucosa, sanguinolenta y con eliminación de leucocitos fecales (Adams y Moss, 1997). La enfermedad afecta fundamentalmente a niños y adultos (Pascual Anderson, 1989).

- *E.coli enteropatógeno* (EPEC):

La enfermedad aparece entre las 12 y 36 horas a partir de la ingestión del organismo y los síntomas producidos por esta enfermedad abarcan malestar, vómito y diarrea mucosa y rara vez sanguinolenta. En los niños, donde aparece mayoritariamente, la enfermedad se agrava y puede durar más de dos semanas (Adams y Moss, 1997). Dicha enfermedad es más frecuente en países tropicales con medios de vida y prácticas de higiene deficientes (Pascual Anderson, 1989).

- *E.coli enterohemorrágico* (EHEC):

EHEC es también conocido como *E.coli* productor de Verotoxina (VTEC), ya que estas cepas de *E.coli* producen citotoxinas llamadas así por su capacidad para destruir las células Vero (células renales del mono verde africano) (Doyle y col., 1997). Varios serotipos son capaces de causar diarrea, pero el serotipo O157:H7 es el más frecuente en personas. En este caso la transmisión de la enfermedad alimentaria es más habitual que con otras cepas de *E.coli* productoras de diarrea y, además es capaz de producir enfermedades muy graves: la colitis hemorrágica, el síndrome urémico hemolítico y la púrpura trombótica trombocitopénica (Adams y Moss, 1997).

- *E.coli difuso-adherentes* (DAEC):

Estas cepas de *E.coli* pueden producir diarrea leve sin sangre o leucocitos fecales y se han asociado con la diarrea de niños.

- *E.coli enteroagregativa* (EAggEC):

Estas cepas han sido asociadas a la diarrea persistente en lactantes y niños en varios países del mundo, aunque se necesita mucha más información epidemiológica para corroborar su actividad como agente diarreico (Doyle y col., 1997).

4.2.4. Asociación con los alimentos

Entre las fuentes más comunes de infecciones transmitidas por los alimentos se incluyen productos lácteos y zumos no pasteurizados, carne elaborada y cocida de manera insuficiente, frutas y hortalizas crudas, además de un manejo y almacenamiento insalubre de los alimentos preparados (FAO, 2011).

La contaminación fecal de las redes de abastecimiento de agua y los manipuladores de alimentos contaminados han sido la causa de brotes de enfermedad causados por EPEC, EIEC y ETEC. Han sido implicados alimentos como las hortalizas o la ensalada de patatas. Los brotes causados por el serotipo O157:H7 de EHEC han implicado principalmente a carne picada insuficientemente cocida y alguna vez a leche fresca (Adams y Moss, 1997).

En 2011 se produjeron 9.485 casos de infecciones en humanos de *Escherichia coli* productora de toxina shiga en un total de 27 países europeos, siendo un valor notablemente superior al año 2010, debido principalmente a los casos registrados por el brote alimentario producido en Alemania y Francia asociado al consumo de semillas germinadas, por la cepa O104:H4 (BES, 2013).

En el BES se notificó durante el periodo transcurrido entre las semanas 40 y 52 del año 2013, diversas toxiinfecciones provocadas por *Escherichia coli* en 11 comunidades autónomas de España. Hubo 1 caso de *Escherichia coli* O157 y 2 casos de *Escherichia coli* verot. (Instituto de Salud Carlos III, 2014).

4.2.5. Control de *Escherichia coli*

Para prevenir y controlar las infecciones por *E.coli* se requiere un enfoque interdisciplinar en la producción animal y vegetal, así como enfoques basados en el análisis y control de riesgos a lo largo de toda la cadena de abastecimiento de alimentos. Éstos incluyen la aplicación de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), Buenas Prácticas de Fabricación (BPF), Buenas Prácticas de Higiene (BPH) y Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC), desde la granja hasta llegar al consumidor. Así mismo, el almacenamiento y la cocción adecuados ayudan a prevenir las enfermedades transmitidas por los alimentos, incluidas aquellas causadas por las *E.coli* patógenas.

La FAO promueve buenas prácticas en el sector lechero, hortícola y de producción de carne de vacuno para mejorar la cantidad y la calidad de los alimentos (FAO, 2011).

4.3. *Salmonella*

El género *Salmonella* pertenece de la familia *Enterobacteriaceae* y está integrado por bacilos Gram negativos, no esporulados (de 2-4 x 0,6 µm) y, normalmente, móviles mediante flagelos peritricos. Se trata de una bacteria aerobia facultativa. El género *Salmonella* fue creado definitivamente en 1900 por Lignières y se le denominó así en honor de D.E. Salmon, el patólogo veterinario americano que describió por primera vez *Salmonella cholerae-suis*.

Salmonella tiene origen intestinal (fuera del tracto intestinal pueden vivir largos periodos de tiempo) y su reservorio es la población animal (Adams y Moss, 1997), tanto en animales domésticos como en salvajes de diverso tipo, incluidos porcinos, aves de corral, bovinos, roedores y otros como iguanas, tortugas, perros y gatos y también el hombre (BES, 2009). Al padecer una *salmonelosis*, el hombre y los animales están excretando 10⁸ células de

Salmonella por gramos de heces aproximadamente. Además *Salmonella* puede encontrarse en diversas zonas, contaminando locales, materiales de la industria, lugares de restauración alimenticia, etc. El ambiente de los mataderos está, habitualmente, muy contaminado de *Salmonella* (Adams y Moss, 1997).

El género *Salmonella* contiene unas 2.523 cepas distintas (BES, 2009) denominadas serovares o serotipos, de acuerdo con sus antígenos O y H. Su número crece a medida que se aíslan cepas nuevas serológicamente distintas (Forsythe y Hayes, 2002).

El esquema de serotipado de Kauffman-White se ha acreditado como la técnica más útil para la diferenciación de serotipos dentro del género (Adams y Moss, 1997). Básicamente la estructura antigénica de *Salmonella* es similar a la de otras enterobacterias, con dos clases de antígenos principales presentes: antígenos O (somáticos) y antígenos H (flagelares). En algunas cepas se encuentra un tercer tipo como antígeno de superficie, relacionado anteriormente con la virulencia, por lo que se denominó antígeno Vi.

Antígenos somático (O): son los antígenos de la pared bacteriana, de naturaleza polisacárida (Parra y col., 2002). Además son termoestables, estables al alcohol y su aglutinabilidad se ve afectada por la acción del formol al 5 por mil. Intervienen en el poder patógeno del microorganismo y aglutinan con sus anticuerpos homólogos. La aglutinación que se produce es lenta, fina y granular (Pascual Anderson, 1989).

Antígenos flagelares (H): son antígenos constituidos por una proteína, la flagelina, cuya composición en aminoácidos es constante para un tipo antigénico determinado. Depende de dos genes estructurales, que corresponden a la fase 1 y a la fase 2. La mayoría de las cepas del género *Salmonella* pueden expresar las dos especificidades de su antígeno H (difásicos), sin embargo, existen algunas que pueden expresar solamente una sola, ya sea la uno o la dos (monofásicas) (Parra y col., 2002). Además son termolábiles e inestables al alcohol y su aglutinabilidad no se inhibe por la acción del formol al 5 por mil. No intervienen en el poder patógeno de *Salmonella* y aglutinan con sus anticuerpos correspondientes de forma rápida, dando lugar a flóculos grandes que se disgregan fácilmente.

Antígenos Vi: son antígenos que rodean la pared bacteriana, aunque dichos antígenos no se encuentran en todos los serotipos de *Salmonella*. Su presencia impide la aglutinación de los antígenos somáticos (O) y para determinar la presencia de dichos antígenos tenemos que destruir el antígeno Vi por calentamiento. Se trata de un antígeno termolábil que sólo existe en cepas de *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* y, en ocasiones en *S. Dublin*, y que aglutinan lentamente y de forma fina y granulosa (Pascual Anderson, 1989).

4.3.1. Parámetros de crecimiento

Los factores que influyen en la multiplicación de *Salmonella* son la temperatura, el pH, la actividad de agua (a_w) y los nutrientes.

Temperatura: *Salmonella* puede crecer entre 5°C y 45°C, con ligeras variaciones según los serotipos, y la temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 35°C y 37°C. Su crecimiento a dichas temperaturas también depende del pH y la a_w (Pascual, 2005).

Si aumentamos la temperatura por encima de 60°C *Salmonella* puede ser destruida, mientras que si bajamos la temperatura por debajo de 5°C *Salmonella* no se multiplica pero puede sobrevivir durante largos periodos de tiempo, sobre todo en alimentos congelados. Durante la congelación, *Salmonella* disminuye ligeramente en número, pero no se puede asegurar que un alimento esté exento de *Salmonella* gracias a la congelación (Pascual Anderson, 1989).

Salmonella crece a pH comprendidos entre 4,5 y 9, siendo la escala óptima entre 6,5 y 7,5, pudiendo variar el pH mínimo con el serotipo, temperatura de incubación o a_w del medio en el

que se encuentre (Pascual, 2005). La muerte ocurre cuando los límites extremos son sobrepasados, influyendo la naturaleza del ácido orgánico (ISPCH, 2011).

Salmonella se desarrolla bien a valores de 0,95 y 0,99 de a_w . A valores muy bajos, del orden de 0,20, correspondientes a productos deshidratados, sobreviven largo tiempo. La actividad de agua mínima para que se produzca crecimiento de *Salmonella* es de 0,93 a 0,95 aproximadamente, aunque varía para cada alimento y serotipo (Frazier y Westhoff, 1993).

Nutrientes: Cuando el medio de cultivo es escaso en nutrientes, *Salmonella* crece dentro de intervalos de temperaturas, de pH y de actividad de agua más reducidos que cuando el medio es adecuado (ICMSF, 2000).

4.3.2. Características bioquímicas

Salmonella reduce los nitratos a nitritos, degrada los glúcidos fermentativamente, utiliza el citrato como única fuente de carbono, se multiplica en medios normales sin factores de crecimiento, realiza la fermentación de la glucosa con producción de gas y produce SH_2 . En cambio no utiliza la lactosa ni la sacarosa (Bourgeois y col., 1994). Además es catalasa positiva, oxidasa negativa (Adams y Moss, 1997), citrocromo-oxidasa negativa y para la prueba IMViC sus resultados son: producción de indol y Voges-Proskauer negativo y rojo de metilo y citrato positivo (Pascual Anderson, 1989).

4.3.3. Poder patógeno

Salmonella es universalmente considerada una de las causas más importantes de enfermedad transmitida por alimentos. La salmonelosis se define como una infección zoonótica puesto que la fuente principal de la enfermedad humana la constituyen los animales infectados (Adams y Moss, 1997). Dicha enfermedad afecta al hombre y a los animales y está extendida por todo el mundo. La infección es provocada por la ingestión de *Salmonella* por un huésped susceptible, y en un número suficiente para que, al establecerse en el intestino de éste, se produzcan los síntomas característicos de la enfermedad (Pascual Anderson, 1989). Las enterotoxinas producidas en el interior del intestino humano tienen un importante rol en la enfermedad (Forsythe y Hayes, 2002).

Salmonella puede ser transmitida entre animales, ya que los métodos de producción intensivos de las distintas especies, el transporte masificado de los animales y la contaminación de piensos para la alimentación animal proporcionan las condiciones favorables para dicha transmisión. A su vez, la transmisión puede darse de animal a hombre y de hombre a hombre teniendo como vía de difusión los alimentos contaminados.

La presencia de *Salmonella* en un alimento no determina la aparición de la enfermedad, ya que el efecto depende de la ingestión de células vivas de este microorganismo en una tasa suficiente para provocarlo. Esto no significa que la ingestión de una cantidad de *Salmonella* inferior a la que provoca la enfermedad no tenga efecto, ya que las personas que ingieran esa cantidad son portadores de *Salmonella* y, posteriormente será eliminada por la heces. Los serotipos más frecuentes en la *salmonelosis* humana son: S. Typhimurium, S. Enteritidis, S. Agona, S. Infantis, S. Heidelberg, S. Panama y S. Newport.

Salmonella se puede clasificar en varios grupos según sus propiedades patológicas: *Salmonella* patógenas para el hombre productoras de la *fiebre tifoidea* (S. Typhi) y fiebres paratíficas (S. Paratyphi A, B y C), *Salmonella* patógenas para los animales (S. Abortus Equi, S. Abortus Bovis, S. Gallinarum) y *Salmonella* sin huésped específico, siendo estas últimas la mayoría y encontrándose tanto en el hombre como en los animales (S. Typhimurium, S. Enteritidis, S. Newport, S. Derby, etc.)

La patología producida por *Salmonella* varía según sea fiebre tifoidea o gastroenteritis:

Fiebre tifoidea: se trata de un caso típico de fiebre entérica con un periodo de incubación de 7 a 14 días. Sus síntomas más relevantes son: malestar general, fiebre alta (40°C), diarrea, distensión abdominal y manchas rojas en la piel. La tasa de mortalidad en pacientes no tratados es del 10 por 100, mientras que en el 3 por 100 de los casos se desarrolla un estado de portador.

Gastroenteritis: su periodo de incubación está entre 12 y 24 horas, aunque se puede establecer antes y después (6-72 horas). Los síntomas más relevantes son: náuseas, vómitos, dolor abdominal, fiebre de aparición brusca (38-38,5°C), anorexia, diarrea repentina, heces acuosas (verdosas y malolientes), postración y debilidad, espasmos, somnolencia, deshidratación, mialgias, cefalalgias y malestar general. Los enfermos de salmonelosis eliminan gran cantidad de *Salmonella* por las heces (hasta 10⁹ microorganismos por gramo de materia fecal), pudiendo causar nuevas infecciones a otras personas. Los síntomas persisten 2-3 días produciéndose la recuperación varios días después, aunque a veces los síntomas pueden durar semanas o meses. La tasa de mortalidad se estima en algo menos de 1 por 100 y entre el 0,2 y el 5 por 100 de los enfermos son portadores.

Para los serotipos sin huésped específico (*Salmonella* no tifoidea), responsable de la gastroenteritis, la dosis mínima infectante se encuentra en 10⁵-10⁹ microorganismos por gramo de alimento, dependiendo del serotipo y su virulencia, además de la persona que ingiere dicha cantidad. En cambio, para los serotipos con huésped específico como *S. Typhi* y *S. Paratyphi*, la dosis infectante es más baja, a veces inferior a 10 gérmenes (Pascual Anderson, 1989).

4.3.4. Asociación con los alimentos

La carne, la leche, las aves de corral y los huevos son los vehículos principales para transferir *Salmonella*, ya que pueden estar insuficientemente cocinados, permitiendo que las bacterias sobrevivan, o pueden contaminar de modo cruzado otros alimentos que son consumidos sin cocción posterior (Adams y Moss, 1997).

Las fuentes más importantes de *Salmonella* son los alimentos proteicos de origen animal, aunque también es posible la contaminación por otros productos (agua, vegetales, aditivos, etc.). Los niveles de contaminación de la carne con *Salmonella* varían, pero generalmente los mayores corresponden a las aves, como el pollo, pato y pavo (Forsythe y Hayes, 2002).

Además de los alimentos considerados tradicionalmente como posibles vehículos de infección, se añade otro problema en este ámbito como son los productos que llegan al consumidor después de largos procesos de producción, durante los cuales puede contaminarse (BES, 2009).

Aunque la salmonelosis ha disminuido de forma significativa los últimos años en Europa, sigue siendo la segunda zoonosis notificada con mayor frecuencia en humanos, con 95.548 casos en 2011. El descenso continuado de casos (5,4% en relación a 2010 y 38% en relación a 2007) refleja el resultado de los programas de control de *Salmonella* implementados por los Estados Miembros y la Comisión Europea, que han llevado a una disminución de la infección en las poblaciones de aves, principalmente en gallinas ponedoras (y huevos), y en pollos. *Salmonella* se encontró más frecuentemente en carne cruda de pollo, así como en carne picada de pollo y preparaciones a base de esta carne (BES, 2013).

Desde el año 2000 al 2008 se ha notificado al SIM un total de 58.407 infecciones por *Salmonella* no tifoidea procedentes de 43 laboratorios de microbiología clínica de 12 Comunidades Autónomas. En la Comunidad Valenciana se notificaron 1.291 casos, de los cuales la mayoría procedían del año 2005. En 47.078 casos se notificó información sobre

serotipo o serogrupo siendo los más frecuentes *Salmonella* Enteritidis con 29.319 casos (62,28%) y *Salmonella* Typhimurium con 6.784 casos (14,41%) (BES, 2009).

En el BES se notificó durante el periodo transcurrido entre las semanas 40 y 52 del año 2013, diversas toxiinfecciones provocadas por *Salmonella* en 11 comunidades autónomas de España. Hubo 291 casos de *Salmonella* Enteritidis, 356 casos de *Salmonella* Typhimurium, 96 casos de *Salmonella no tifoidea* (Otros), 165 casos de *Salmonella spp* y 7 casos de *Salmonella* Typhi y Paratyphi (Instituto de Salud Carlos III, 2014).

4.3.5. Control de *Salmonella*

Para proteger al hombre de la *salmonelosis* se realizan controles como: inspecciones veterinarias, control de roedores e insectos, evitar la excesiva manipulación de los alimentos, limpieza adecuada, higiene de los operarios, conservar los alimentos en refrigeración, adquisición de productos con garantía sanitaria, evitar el contacto de productos cocinados con productos crudos, cocción correcta de los alimentos o refrigeración rápida de los alimentos (Pascual Anderson, 1989).

4.4. *Arcobacter*

En las últimas tres décadas, se han identificado gran número de enfermedades emergentes que afectan al ser humano. Muchas de éstas son de origen zoonótico, resultado de la transmisión a humanos de patógenos de otras especies animales (Kershenobich, 2008). Este es el caso de *Arcobacter*, un patógeno emergente, asociado a alimentos y de gran importancia en salud pública (Vandamme y De Ley, 1991). El incremento en los datos de prevalencia e incidencia de casos asociados a esta bacteria sugiere que posiblemente la infección en humanos y animales ha sido subestimada, debido a la carencia de conocimientos al respecto y a la inexistencia de un protocolo estándar, universalmente aceptado, para el aislamiento primario de este organismo. El incremento de los porcentajes de aislamientos de *Arcobacter* en alimentos derivados de animales y en muestras tomadas durante el proceso de producción de alimentos, hace que aumente la preocupación en materia de salud pública, ya que aún se conoce muy poco del potencial patogénico de las especies *Arcobacter* y los pocos estudios que se han llevado a cabo, muestran una gran cantidad de especies hospedadoras y rutas de transmisión (Calvo y col., 2013).

En la tabla 2 se describe la taxonomía del género *Arcobacter* (Neill y col., 1985):

Tabla 2: Taxonomía del género *Arcobacter*

Dominio	Bacteria
Phylum BXII	Proteobacteria
Clase V	Epsilonproteobacteria
Orden I	Campylobacterales
Familia I	<i>Campylobacteraceae</i>
Género II	<i>Arcobacter</i>

El género *Arcobacter* está formado por bacilos Gram negativos curvados, en forma de S, en cultivos jóvenes y de forma de cocoide o esférica en cultivos viejos. Es una bacteria no esporulada y su tamaño oscila entre 0,2 y 0,9 µm de ancho, con un largo de 0,5 y 3,0 µm (Vandamme y De Ley, 1991), aunque en aguas se han encontrado *Arcobacters* de mayor tamaño (Taylor y col., 1999). Estos bacilos son móviles gracias a un flagelo polar no envainado que contiene en ambos extremos de la célula permitiendo realizar el movimiento característico en forma de sacacorchos (Ho y col., 2006).

Esta bacteria fue aislada por primera vez a partir de abortos de fetos bovinos de manera espontánea en 1977 y posteriormente fue también aislada a partir de fetos de cerdo (Ellis y col., 1978). La bacteria fue inicialmente nombrada como *Campylobacter aerotolerante* por Neill y col. (Neill y col., 1985), no obstante su nombre fue cambiado luego a *Campylobacter cryaerophila* por Neill y col. en 1985 (Neill y col., 1979) y, finalmente, Vandamme y col. (Vandamme y De Ley, 1991), propusieron la creación del género *Arcobacter*.

Actualmente, el género consta de 17 especies reconocidas: *A. nitrofigilis* que fue aislada de heces, tractos reproductivos y fetos producto de abortos de muchos animales de granja, así como de muestras de leche de vaca que tenían mastitis (Neill y col., 1985); *A. skirrowi* que fue inicialmente aislada de muestras de heces de ovejas con diarrea, productos de abortos en cerdos, fetos bovinos y ovinos, además de encontrarlo en prepucios de toros (Patyal y col., 2011); *A. butzleri* que se aisló de muestras humanas y de animales con diarrea (Kielbauch y col., 1991); *A. cryaerophilus* que es la especie de *Arcobacter* predominantemente asociada a casos de aborto en animales (Lehner y col., 1994); *A. cibarius* que fue aislada de carne de pollos; *A. halophilus* que fue recuperada en una laguna hipersalina (Donachie y col., 2005); *A. mytili* aislada en mejillones y de muestras de agua (Collado y col., 2009); *A. thereius* aislada de hígados y riñones de cerdos con abortos espontáneos y en muestras de las cloacas de patos (Doudah y col., 2010); *A. marinus* aislada de la mezcla de agua marina, estrellas de mar y algas en Corea (Kim y col., 2010); *A. trophiarum* que fue aislada de muestras de heces de cerdos de engorde (Collado y Figueras, 2011); *A. molluscorum* aislada de muestras de ostras y mejillones (Figueras y col., 2011); *A. defluvii* aislada de aguas residuales (Collado y col., 2010); *A. ellisii* que se aisló de mejillones en España (Figueras y col., 2011); *A. bivalviorum* aislada en muestras de bivalvos; *A. venerupis* aislada en muestras moluscos y *A. cloacae sp. nov.* y *A. suis sp. nov.* que se aislaron en muestras de carne de pollo y aguas residuales (Levican y col., 2012). En el año 2002 fue descrita una bacteria autotrófica marina sulfuro-oxidante que produce filamentos hidrofílicos sulfurados como producto metabólico. Los análisis filogenéticos la ubican en el género *Arcobacter* y se le ha asignado el nombre de "*Candidatus Arcobacter sulfidicus*", pero aún no se cuenta con su descripción formal (Wirsen y col., 2002).

Los miembros del género *Arcobacter* no son parte de la microbiota intestinal y el humano se puede infectar por la presencia de este organismo en alimentos de origen animal o en agua, entre otras vías de transmisión, aunque aún no están bien definidas. El género *Arcobacter* ha sido aislado principalmente de carne de pollo, seguida de cerdo y luego por carne de res (Shah y col., 2011).

4.4.1. Parámetros de crecimiento

Pueden crecer en un amplio rango de temperaturas, que abarca desde los 15°C hasta los 42°C aproximadamente. Son microaerófilos pero crecen en aerobiosis a 30°C.

Para las cepas de *Arcobacter* las temperaturas óptimas de crecimiento suelen ser más bajas que para otros patógenos: crecen en aerobiosis a 28-30°C, aunque algunas cepas necesitan temperaturas de incubación de 25°C. También se ha observado que pueden crecer a 15°C y 37°C y, en casos esporádicos, a 42°C (Rice y col., 1999).

4.4.2. Características bioquímicas

Las colonias de *Arcobacter* usualmente carecen de pigmentos, todas las especies tienen actividad oxidasa, presentan reacción negativa con el rojo de metilo y con el Voges-Proskauer y no producen indol, excepto *A. mytili* y *A. molluscorum*. La mayoría de las especies reducen nitratos y no hidrolizan el hipurato. Son quimioorganotróficas y utilizan una gran variedad de fuentes de carbono como ácidos orgánicos y aminoácidos (Collado y col., 2009). Además, las especies de *Arcobacter* no fermentan ni oxidan los carbohidratos, tienen actividad catalasa, y a

excepción de la especie *A. nitrofigilis*, son ureasa negativas. Además hidrolizan el indoxil acetato (Taylor y col., 1999). La mayoría de cepas no son hemolíticas y son sensibles al ácido nalidíxico pero muestran una respuesta variable a las cefalosporinas (Lerner y col., 1994).

4.4.3. Poder patógeno

Este género no era considerado un verdadero patógeno hasta hace relativamente poco. Sin embargo, en la actualidad, a excepción de *A. nitrofigilis*, se consideran patógenos para el hombre y los animales, destacando entre ellos *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* y menor grado *A. skirrowii* (Collado y col., 2010). En humanos, los problemas con los que se asocia a *Arcobacter* son diarreas, dolor abdominal, septicemias, fiebre, náuseas e incluso bacteriemias (Yan y col., 2000).

Aunque las características microbiológicas y clínicas de *Arcobacter* aún no están bien definidas, los estudios iniciales de *A. butzleri* sugieren que dichas bacterias muestran características microbiológicas y clínicas similares a *Campylobacter jejuni*, pero están más asociados con diarrea persistente y acuosa que con la diarrea hemorrágica asociada con *Campylobacter jejuni*.

La especie *A. butzleri* y con menos frecuencia *A. cryaerophilus* han sido relacionadas con enteritis y ocasionalmente bacteriemia. Los síntomas más frecuentes de la infección por *A. butzleri* son la diarrea asociada a dolor abdominal, náuseas y vómitos o fiebre. Los síntomas pueden tener una gran variabilidad en el tiempo, a partir de dos días hasta varias semanas. Normalmente administrar terapias antimicrobianas consigue erradicar la infección en unos pocos días ya que las cepas suelen ser susceptibles a los antibióticos administrados.

Uno de los principales problemas es que las condiciones óptimas de recuperación de *Arcobacter* a partir de muestras clínicas aún no han sido determinadas. Por lo que en ocasiones es confundido con el género *Campylobacter* (Abdelbaqi y col., 2007). Aunque no está del todo claro, al igual que la infección por *Campylobacter*, los niños, sobre todo con alguna enfermedad previa, son los más afectados por *Arcobacter* (Lastovica y Skirrow, 2000). Existe algún caso de contaminación por *Arcobacter* en neonatos por vía transplacentaria (On y col., 1995)

4.4.4. Asociación con alimentos

Arcobacter es un patógeno que se transfiere principalmente por vía alimentaria y por el agua (Gonzalez y Ferrús, 2010). Además, las especies de *Arcobacter* han sido definidas como agentes zoonóticos debido a su patogenicidad en humanos y animales (Cardoen y col., 2009).

Arcobacter es frecuentemente aislado en muestras de origen animal, tales como pollo, cerdo, vaca y ovejas, la mayor incidencia se encuentra en pollos, seguido de cerdos y luego carne de vacuno (Ho y col., 2006). La alta prevalencia de *Arcobacter* en el tracto intestinal y muestras fecales de animales de granja, así como en muchos productos de carne, apoya la hipótesis de que los alimentos son una de sus principales rutas de transmisión (Patyal y col., 2011), planteando que el mal manejo de los alimentos crudos o el consumo de alimentos mal cocidos contaminados (carne, leche, marisco, etc.) son la vía más probable de transmisión de *Arcobacter* (Van Driessche y col., 2003).

Por otro lado, el agua tiene un rol importante en la transmisión de las especies de *Arcobacter*, tanto para los animales como para los humanos. Se ha estimado que cerca del 63% de las infecciones en humanos se debe al consumo o contacto con agua contaminada (Cardoen y col., 2009). Esta bacteria ha sido recuperada de muestras de aguas ambientales como ríos, lagos, aguas subterráneas y aguas marinas, así como en plancton (Fera y col., 2008).

5. Resistencia a antibióticos en bacterias presentes en alimentos

Desde los años 50 hasta la actualidad no han cesado de crecer las descripciones de microorganismos que han adquirido alguna forma de resistencia frente a uno o varios antibióticos (Balsalobre y Hernández, 2004). En los últimos años, diversos estudios destacan la relación existente entre el consumo de antibióticos por animales y el desarrollo de resistencias en microorganismos vinculados a infecciones en humanos (Puig y col, 2007). El uso creciente de antibióticos para la salud humana y animal, así como para la producción ganadera ha ido acompañado del desarrollo de mecanismos de resistencia por parte de microorganismos anteriormente sensibles. El mal uso de estas sustancias ha generado la pérdida de su eficacia (Gimferrer, 2008), provocando en pacientes especialmente vulnerables enfermedades más prolongadas y aumentos de los casos de mortalidad. Además, la actual falta de nuevos antimicrobianos para reemplazar los que se vuelven ineficaces trae mayor urgencia a la necesidad de proteger la eficacia de los fármacos existentes (OMS, 2014).

La administración de antibióticos a los animales permite la aparición y selección de bacterias resistentes en la cadena alimentaria y que ésta sería una de las principales causas del incremento de la incidencia de la resistencia a antimicrobianos en humanos. Sin embargo, también se considera que la resistencia bacteriana a antimicrobianos se debe al excesivo uso de los mismos en humanos (Orden y de la Fuente, 2001).

La correlación existente entre el uso de ciertos antibióticos para suplementar alimentos en animales y el incremento de la resistencia bacteriana a éstos parece ser un hecho comprobado (OMS, 2014), ya que este tipo de sustancias se añaden al pienso animal, especialmente a los cerdos y aves de corral, para el tratamiento masivo de las enfermedades infecciosas y para evitar su aparición. Se añaden también al agua para su tratamiento y se pulverizan sobre los cultivos alimentarios como prevención. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) han estudiado durante años los problemas de salud relacionados con el uso de antimicrobianos en animales productores de alimentos. En la investigación sugieren realizar un uso prudente de los antimicrobianos, una exhaustiva vigilancia de su empleo en animales y una formación adecuada de los agricultores (Gimferrer, 2008).

Todo esto ha provocado que el estudio a la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos sea una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Su realización se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad o antibiograma, cuyo principal objetivo es evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, dando como resultado un factor predictivo de la eficacia clínica (Picazo y col.,2000).

Por todo ello, es fundamental obtener una visión amplia a nivel internacional sobre el problema de la resistencia a antibióticos por parte de los microorganismos. Para lograrlo la OMS obtiene, de 129 países, datos sobre dichas resistencias a determinados antibióticos en nueve bacterias de importancia para la salud pública. La mayoría de los datos recibidos provienen de hospitales, aunque la poca representatividad de éstos causa una limitación para la interpretación y comparación de los resultados. Los datos recopilados hasta este momento indican los escasos conocimientos que se tiene sobre el tema y la falta de capacidad para recopilar datos nacionales. Entre las regiones de la OMS, se obtiene una mayor colaboración por parte de Europa y América, donde se dan desde hace mucho tiempo la vigilancia y la colaboración regional (OMS, 2014).

5.1. Fundamento del método antibiograma disco-placa

El antibiograma disco-placa es uno de los métodos que el CLSI recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. Dicho método está basado en el trabajo de Bauer y Kirby, y consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con diferentes antibióticos. Al incubar las placas, de 18 a 24 horas, los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición del crecimiento. La lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías establecidas por el CLSI.

La concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por el método de dilución. Los métodos disco-placa no permiten una lectura directa del valor de la CMI. Para cuantificarla, hace falta haber contrastado previamente el sistema disco-placa con un gran número de cepas de CMI conocidas que han sido previamente determinadas por otros métodos (como los métodos de dilución). Con esto se habrá conseguido estandarizar, para cada antimicrobiano, unos diámetros de inhibición (expresados en mm).

5.1.1. Indicaciones y limitaciones

El antibiograma se utiliza cuando tenemos una bacteria patógena aislada y no puede predecirse su sensibilidad. Además, es muy eficaz a la hora de realizar estudios epidemiológicos, ya que el resultado del antibiograma puede ser considerado como el primer marcador epidemiológico del que se dispone. El método disco-placa es fácil de realizar, rápido, barato y se puede aplicar a una amplia variedad de bacterias, fundamentalmente bacterias aerobias no exigentes de crecimiento rápido como *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas spp.* Además, con ligeras modificaciones, puede ser aplicado a otras bacterias (CLSI, 2007).

6. Métodos moleculares de detección de patógenos

Las técnicas moleculares están basadas en el análisis del ADN genómico bacteriano, por eso son especialmente interesantes en la detección e identificación de microorganismos muy sensibles a las condiciones ambientales o a la presencia de microbiota competitiva, o de difícil cultivo. En estos casos el procedimiento de aislamiento convencional es largo y tedioso, y en ocasiones pueden proporcionar falsos negativos, debido a que los microorganismos mueren durante el proceso, o no existen técnicas lo suficientemente sensibles para su detección. La existencia de sus ácidos nucleicos en la muestra puede evitar la necesidad del cultivo, haciendo mucho más rápido y sensible el método de detección.

Estas técnicas no dependen de la expresión fenotípica, por lo que los resultados obtenidos son consistentes y reproducibles. Como presentan una gran sensibilidad a variaciones mínimas en las secuencias de nucleótidos, constituyen métodos precisos de identificación de especies y de caracterización de cepas diferentes, pero filogenéticamente muy próximas.

Entre las técnicas moleculares existentes la más utilizada es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Vílchez y Alonso, 2009).

6.1. Fundamento de la PCR

La PCR es un proceso de amplificación enzimática *in vitro* del ADN o ARN. Las bases de este método fueron descritas por Kleppe y col. (1971), sin embargo fue Kary Mullis, premio Nobel en Química en 1993, quién desarrolló un proceso de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos,

apoyándose en la teoría de la síntesis automatizada de oligonucleótidos (Mullis, 1990). La PCR se ha convertido en una técnica muy eficaz para la detección de patógenos (Jiménez, 1998).

La reacción en cadena de la polimerasa se basa en la capacidad de la ADN polimerasa, ADN dependiente y termoestable, para copiar una doble cadena de ADN empleando ADN monocatenario (molde) y una pareja de oligonucleótidos, llamados iniciadores, cebadores o "primers" (Saiki y col, 1988). Es posible la amplificación enzimática de millones de veces el molde de ADN gracias a la repetición de tres ciclos alternos de temperaturas en un termociclador: desnaturalización (separación de la doble cadena de DNA), acoplamiento (unión de los iniciadores) y polimerización (síntesis de la hebra complementaria mediante la adición de dNTPs por la enzima *Taq* polimerasa) (Moreno y col., 2002). Los productos de PCR se detectan normalmente por electroforesis en gel de agarosa y se visualizan bajo la luz ultravioleta (Cha y col., 1993).

En la extracción del material genético de los microorganismos la mayoría de protocolos incorporan la utilización de la proteinasa K y la purificación con fenol-cloroformo, aunque en algunos casos bastaría con el tratamiento de la muestra por ebullición para conseguir la lisis celular (Linton y col. 1996).

En la práctica, la reacción en cadena de la polimerasa se realiza en un vial de reacción en el que se mezclan los reactivos, los cuales serían una muestra del ADN a amplificar, iniciadores, oligonucleótidos, ADN-polimerasa, tampón de reacción, magnesio y otros reactivos opcionales.

Para realizar la PCR es necesario disponer de información sobre la secuencia del ADN diana, con la finalidad de diseñar los oligonucleótidos que van a ser utilizados como iniciadores (Jiménez, 1998). En muchos casos conocer la secuencia completa del organismo que interesa analizar es caro y difícil, de modo que se recurre a información almacenada en bancos de datos. De los tres genes que forman el rRNA, son el 16S y el 23S los que se estudian para establecer diferencias entre los microorganismos. La recopilación de varias secuencias del 16S y del 23S en los bancos de datos es una excelente ayuda a los investigadores en el desarrollo de iniciadores para la detección mediante PCR (Cuesta, 2004).

6.1.1. Ventajas y desventajas

Las ventajas de la PCR se basan en que es una técnica sencilla, rápida, sensible y versátil, ya que un patrón de ADN se puede amplificar millones de veces con relativamente pocos pasos. Además la PCR requiere muy poco material biológico de partida y genera material suficiente para el análisis experimental subsiguiente (Jiménez, 1998). La capacidad de amplificar cantidades muy pequeñas de ADN hace que esta técnica sea muy útil para la detección de bacterias presentes en números bajos en diferentes muestras de alimentos (Waage y col., 1999), agua (Ash y Fricker, 1996; Waage y col., 1999) y clínicas (Stone y col., 1994).

Entre las desventajas o limitaciones de la PCR se encuentra la necesidad de tener conocimientos previos de las secuencias que flanquean dicho segmento, y que actúan como iniciadores de la reacción (Jiménez, 1998). Además, se realiza una gran inversión de tiempo para los procedimientos de optimización, ya que una reacción de PCR eficiente requiere de estrategias de planificación y múltiples intentos. Es esencial obtener la combinación óptima entre las temperaturas utilizadas y los componentes de la reacción para llegar a obtener una alta eficacia en la amplificación de los productos. Igualmente, es necesario el uso de ácidos nucleicos puros para validar la especificidad, así como controles internos y externos para mantener la calidad. Todo este listado de factores tiene influencia importante en los resultados, ya que previene la aparición de problemas que pudieran comprometer la eficiencia del método, como contaminaciones por amplificaciones inespecíficas generando falsos positivos. Por eso es necesario tomar ciertas medidas de control como la realización de cada fase de reacción en ambientes separados, utilización de tubos, pipetas y guantes estériles

distintos en cada una de las áreas y, limpieza y exposición a cada ambiente a radiaciones ultravioletas, alcohol y/o soluciones libres de RNasa. Asimismo, es necesaria una formación especializada del personal que ejecutará el análisis (Bolívar y col., 2014). Por último para este método cabe destacar el elevado coste de los reactivos empleados en la reacción y el equipo de análisis (Gibb y Wong, 1998).

II.OBJETIVOS

Los riesgos microbiológicos y las enfermedades de transmisión alimentaria son un problema de salud pública cada vez mayor. En muchos países se han registrado durante las últimas décadas aumentos significativos de la incidencia de enfermedades provocadas por microorganismos transmitidos principalmente por los alimentos y el agua y existe una preocupación creciente por los riesgos para la salud que plantean los patógenos microbianos en los alimentos.

La OMS y sus Estados Miembros han respondido a estos nuevos desafíos mediante el reconocimiento de que proteger la inocuidad de los alimentos es una función esencial de la salud pública. La inocuidad alimentaria debe encararse a lo largo de toda la cadena alimentaria mediante medidas basadas en información científica sólida (OMS, 2002).

En este trabajo se propone determinar la calidad microbiológica de muestras de alimentos presentes en el mercado. Concretamente, se analizarán muestras de carne picada de ternera y de cerdo. Para ello plantearemos varios objetivos:

1. Realizar un muestreo de comercios para el estudio de la calidad microbiológica de la carne picada.
2. Determinar la contaminación de microorganismos indicadores, así como la posible presencia de patógenos, de acuerdo con la legislación española para este tipo de productos.
3. Analizar la presencia de patógenos emergentes, en concreto del género *Arcobacter*.
4. Analizar las muestras por métodos moleculares mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR.
5. Estudiar las posibles resistencias antimicrobianas de *E. coli* frente a varios antibióticos utilizados habitualmente en clínica.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Origen de las muestras

Se analizaron un total de 7 muestras (tabla 3) de dos tipos de carne picada: carne picada de cerdo y carne picada de ternera. Estas carnes fueron adquiridas entre los meses de Febrero y Marzo de 2014 en pequeños supermercados y carnicerías independientes de la Comunidad Valenciana, concretamente en Valencia, sobre las 9:30 horas de la mañana del mismo día en el que iban a ser realizados los análisis, siendo refrigeradas a 4°C hasta su análisis en el laboratorio de Microbiología de Alimentos del departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia.

Tabla 3: Muestras de carne picada

Número de muestra	Tipo de carne picada	Fecha de la compra	Establecimiento de compra
Muestra 1	Cerdo	10/02/2014	Supermercado A
Muestra 2	Ternera	10/02/2014	Supermercado A
Muestra 3	Ternera	17/02/2014	Charcutería B
Muestra 4	Cerdo	19/02/2014	Supermercado A
Muestra 5	Ternera	24/02/2014	Supermercado A
Muestra 6	Ternera	24/02/2014	Supermercado A
Muestra 7	Cerdo	3/03/2014	Charcutería C

2. Análisis de las muestras

2.1. Toma de muestras

Para el análisis de *Salmonella*, *Escherichia coli* y aerobios mesófilos se tomaron asépticamente en el laboratorio 25 g de muestra en una bolsa estéril de Stomacher, se añadieron 225 ml de Agua de Peptona Tamponada (APT, Merck 1.07228.0500) y se homogeneizó la muestra en un homogenizador de paletas, Stomacher.

Para el análisis de *Arcobacter* se tomaron asépticamente 10 g de muestra en una bolsa estéril de Stomacher, se añadieron 90ml de caldo *Arcobacter* Broth (AB, Oxoid CM0965) y se homogeneizó la muestra en un homogenizador de paletas, Stomacher.

2.2. Análisis microbiológico

2.2.1. Método horizontal para el recuento de microorganismos: Recuento de colonias a 37°C mediante la técnica de siembra en profundidad (según la ISO 4833-1:2013)

Se tomaron 25 g de muestra en una bolsa estéril de Stomacher y se añadieron 225 mL de agua de peptona tamponada. Posteriormente se homogeneizó durante dos minutos. A continuación se realizaron diluciones decimales seriadas en tubos conteniendo 9 mL de agua destilada estéril y se procedió a realizar un recuento en profundidad por duplicado con Agar Plate Count (APC, Scharlau 01-161-500), incubando las placas a una temperatura de 37°C±1°C durante un periodo de 48h. Una vez transcurrido el periodo de incubación se calculó el número de microorganismos por gramo de la muestra analizada a partir del número de colonias obtenidas en las placas que contuvieron menos de 300. Los resultados se calculan mediante la ecuación 1:

$$\frac{\sum C}{(N1 + 0,1) \times d}$$

Ecuación 1

Donde:

ΣC : es la suma de las colonias de todas las placas de la dilución seleccionada para el conteo.

$N1$: número de placas que se cuentan en la dilución seleccionada para realizar el conteo.

d : factor de dilución que corresponde a la dilución seleccionada para realizar el conteo.

En el anejo I se encuentra el esquema de dicho procedimiento.

2.2.2. Recuento de enterobacterias lactosa positivo (coliformes totales) y detección de *Escherichia coli* (Pascual y Calderón, 2000)

Se tomaron 25 g de muestra y se realizó el mismo procedimiento que en el análisis anterior para la toma de muestra. A continuación se realizaron diluciones decimales seriadas en tubos conteniendo 9 mL de agua destilada estéril y se procedió a realizar la inoculación por triplicado en caldo Lactosado Biliado Verde Brillante (BGBL, Difco 274000) con campana Durham de cada una de las diluciones, incubando los tubos a una temperatura de $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante un periodo de 48h. Posteriormente, se procedió a la lectura de los resultados, considerando como positivos aquellos casos en los que se produjo desprendimiento de gas en la campana Durham con enturbiamiento del medio, y se realizó el Número Más Probable de los tubos positivos en cada serie, recurriendo a la Tabla del Número Más Probable (NMP) para obtener el recuento por gramo o mililitro de muestra.

Posteriormente, de los tubos positivos de BGBL se realizó una siembra por la técnica de triple estría en placas con Triptona Bilis X-glucuronido (Agar TBX, Merck 1.16122.0500), que posteriormente fueron incubadas a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, con el fin de obtener colonias aisladas fácilmente identificables. Después del periodo de incubación se procedió a observar los resultados, siendo positivas aquellas colonias de un color azul-verdoso. Para confirmar que se trataban de *E.coli* se inocularon en caldo BGBL y se realizó la prueba del indol (Difco 0123-17), siendo posteriormente incubadas a $44^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

Como pruebas bioquímicas complementarias se realizó la prueba IMViC (Indol, Agar Citrato de Simmons (Merck 1.02501), Rojo Metilo y Voges-Proscauer (Difco 216300)), donde se inocularon las colonias sospechosas y se incubaron posteriormente a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Al transcurrir las 24 horas, se añadieron los reactivos pertinentes y se observaron los resultados sabiendo que para confirmar la presencia de *E.coli* los tubos de Indol y Rojo de Metilo son positivos y los tubos de Voges-Proscauer y Citrato son negativos.

Los aislados de *E.coli* fueron conservados en crioviales a -18°C hasta su posterior utilización.

En el anejo I se encuentra el esquema de dicho procedimiento.

2.2.3. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp (según la norma ISO 6579:2002)

Se tomaron 25 g de muestra y se realizó el mismo procedimiento que en el análisis anterior para la toma de muestra. Del caldo homogeneizado se tomaron 3 alícuotas de 1,5ml en 3 tubos Eppendorf para el análisis de presencia de *Salmonella* mediante PCR. A continuación se incubó el homogeneizado a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Después del tiempo de incubación se transfirió 1ml a un tubo de caldo Rappaport-Vassiliadis R10 Broth (Difco 218581)(10ml) y 1ml a un tubo de caldo Tetrionato Base (Scharlau 02-033) (10ml). Por último se incubaron los tubos a $42^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ y $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, respectivamente, durante 24 horas.

Tras las 24 horas, se tomaron alícuotas de 1,5ml del tubo de Rappaport-Vassiliadis para el análisis mediante PCR y a partir de los medios líquidos selectivos de Rappaport-Vassiliadis y Tetrionato Base se sembraron mediante la técnica de triple estría dos placas de Agar-xilosa-lisina-desoxicolato (XLD, Scharlau 01-211) y dos placas de Hektoen-Entero-Agar (HE, Merck 1.11681.0500) (una placa por cada medio líquido selectivo). Las placas se incubaron a 37°C ±1°C durante 24 horas. Posteriormente se identificaron las colonias sospechosas de *Salmonella* de las placas de XLD (colonias rojas con centros negros) y de las placas de HE (colonias verde azuladas, con centro negro o sin él) y se procedió a realizar la confirmación bioquímica de dichas colonias.

Para la confirmación se seleccionaron varias colonias sospechosas de *Salmonella* de cada placa y se realizaron las pruebas que se muestran a continuación:

Crecimiento en Agar TSI (Agar Hierro Triple Azúcar, Merck 1.03815.0500): se siembra en estría sobre la superficie de agar inclinado y la parte profunda por picadura y se lleva a incubar a 37°C±1°C durante 24h. Pasado el tiempo se interpretarán los resultados sabiendo que los cultivos típicos de *Salmonella* muestran la parte inclinada alcalina roja (no utilización de lactosa y/o sacarosa) y la parte profunda ácida amarilla (utilización de la glucosa) con formación de gas (burbujas) y, normalmente, formación de sulfuro de hidrógeno (ennegrecimiento del agar).

Medio para la reacción Indol: se siembra en un tubo con medio triptófano y se lleva a incubar a 37°C±1°C durante 24h. Pasado el tiempo se añade 1ml del reactivo Kovacs y se interpretan los resultados sabiendo que la aparición de un anillo rojo indica una reacción positiva.

Tira API (batería miniaturizada API 20 E, Biomérieux): se inocula con una suspensión del cultivo y se rellena tal como indican las instrucciones del fabricante. Se incuba a 37°C ± 1°C durante 24h y se examina la utilización de diversos sustratos metabólicos, así como la fermentación de los azúcares mediante la observación de los virajes de color.

En el anexo I se encuentra el esquema de dicho procedimiento.

2.2.4. Identificación de *Arcobacter*

No existe un procedimiento estandarizado de referencia para el aislamiento de *Arcobacter* en alimentos, además los medios ensayados para su aislamiento no son de uso cotidiano ni en los laboratorios clínicos ni en los laboratorios de alimentos, por lo que se dificulta aún más la detección e identificación de esta bacteria. Esto es debido a que se trata de un patógeno emergente que ha pasado a tener relevancia en la salud pública a partir de estos últimos años (Calvo y col., 2013). Por este motivo, el procedimiento realizado para *Arcobacter* tiene como referencia el artículo publicado por González y Ferrús (2011).

Se tomaron 10 g de muestra en una bolsa estéril de Stomacher, se añadieron 90ml de caldo *Arcobacter* Broth (AB, Oxoid CM0965) y se homogeneizó la muestra en un homogenizador Stomacher. Del caldo homogeneizado se tomaron 3 alícuotas en 3 tubos Eppendorf de 1,5ml para el análisis directo de presencia de *Arcobacter* sp. por medio de la técnica PCR.

Posteriormente, se añadieron 20ml de la muestra homogeneizada en otros 20ml de caldo selectivo de enriquecimiento AB-2[CAT] (*Arcobacter* Broth con doble concentración de antibiótico CAT (Oxoid, SR0174E)) (Cefoperazona, anfotericina-B y teicoplanina) y se incubaron a 37°C±1°C durante 48h en condiciones de microaerofilia. Después de la fase de enriquecimiento se tomaron otras 3 alícuotas en 3 tubos Eppendorf para el análisis directo de presencia de *Arcobacter* sp. por medio de la técnica PCR, pero en esta ocasión tras un periodo de enriquecimiento selectivo durante 48h a 37°C±1°C.

Además, del enriquecimiento se tomaron 100µl que fueron depositados sobre un filtro de membrana estéril de 0,45 µm colocado previamente en condiciones estériles sobre una placa de medio de cultivo ASO (Agar Sangre de Oveja), se incubaron durante 45 min a 37°C±1°C en condiciones de aerobiosis, y transcurridos los 45 min los filtros fueron retirados y las placas incubadas a 37°C±1°C en condiciones de microaerofilia durante 48h, ya que *Arcobacter* tiene la capacidad de pasar a través del filtro debido a su reducido tamaño, evitando así la presencia en la placa de otras bacterias (Atabay y Corry, 1997).

Tras la incubación de las placas ASO se seleccionaron 4 colonias con morfología típica de *Arcobacter* sp por placa. Las colonias de *Arcobacter* son muy pequeñas, lisas y traslúcidas, de color beis a amarillento. Se les realizó una Tinción Gram, siendo las características de ésta: bacilos Gram negativos de morfología curvada o en forma de S.

En el anejo I se encuentra el esquema de dicho procedimiento.

3. Estudio de la sensibilidad a antimicrobianas en *E. coli*.

Para el estudio de sensibilidad de *E.coli*, se empleó la técnica del antibiograma disco-placa. Se eligió esta técnica por ser el método más utilizado y aceptado para el estudio de la sensibilidad, además es uno de los métodos recomendados por el CLSI. Para realizar esta determinación es necesario emplear cepas control para supervisar la exactitud y fiabilidad de la metodología. En este trabajo se utilizó como cepa control *E.coli* CECT 3423.

Para el estudio de sensibilidad a antimicrobianos se seleccionaron 12 antibióticos. Éstos se pueden clasificar por grupos según su naturaleza y procedencia, según la tabla 4.

Tabla 4: Antibióticos utilizados en el trabajo y su clasificación

Grupos	Antibióticos
Aminoglucósidos	-Amikacina (AK) -Gentamicina(CN) -Kanamicina(K)
Anfenicoles	-Cloranfenicol(C) -Tetraciclina(TE)
Betalactámicos	-Amoxicilina(AMC) -Ampicilina(AMP) -Cefalotina(KF) -Ceftriaxona(CRO)
Quinolonas	-Ác.Nalidíxico(NAL) -Ciprofloxacino(CIP)
Macrólido	-Eritromicina(E)

En la tabla 5 se muestra la concentración a la que se utilizaron los antibióticos y los valores del diámetro del halo de inhibición que se indican el CLSI, clasificando estos últimos en resistentes, intermedios o sensibles.

Tabla 5: Antimicrobianos y concentración de uso en el ensayo de sensibilidad

Antimicrobiano	Carga del disco(μg)	Diámetro del halo de inhibición (mm)		
		Resistente	Intermedia	sensible
Gentamicina(CN)	10	≤ 12	13-14	≥ 15
Amikacina(AK)	30	≤ 14	15-16	≥ 17
Amoxicilina(AMC)	20/10	≤ 13	14-17	≥ 18
Eritromicina(E)	15	≤ 13	14-22	≥ 23
Ampicilina(AMP)	10	≤ 13	14-16	≥ 17
Ác.nalidíxico(NAL)	30	≤ 13	14-18	≥ 19
Cloranfenicol(C)	30	≤ 12	13-17	≥ 18
Cefalotina(KF)	30	≤ 14	15-17	≥ 18
Ciprofloxacino(CIP)	5	≤ 15	16-20	≥ 21
Ceftriaxona(CRO)	30	≤ 13	14-20	≥ 21
Tetraciclina(TE)	30	≤ 14	15-18	≥ 19
Kanamicina(K)	30	≤ 13	14-17	≥ 18

3.1. Método del antibiograma disco-placa

A partir de una placa de cultivo Plate Count con *E. coli* incubada de 18 a 24 horas se cogieron varias colonias con un asa de siembra y se ajustó el inóculo a una turbidez equivalente al 0,5 de la escala de MacFarland en tubos con suero fisiológico. A continuación se agitó en el "vortex" durante 15-20 segundos y se continuó con la inoculación de las placas. Para ello se introdujo una torunda dentro de la suspensión. Después se inocularon las placas de Agar Mueller-Hinton (Difco 211438) completamente con la torunda. Esto se consiguió deslizándolo por la superficie del agar tres veces, rotando la placa 60° cada vez y pasándola por último por la periferia del agar para conseguir una siembra completa y uniforme. Se dejó secar durante unos minutos y se depositaron los discos de antibióticos en las placas mediante un dispensador. A continuación se incubaron las placas invertidas a 37°C \pm 1°C durante 24h y pasado ese tiempo se leyeron los resultados. La lectura se realiza con una regla, midiendo sobre los halos de inhibición. Los diámetros en mm obtenidos en los ensayos se comparan con los valores de referencia reconocidos por el CLSI.

4. Detección de *Salmonella* y *Arcobacter* mediante métodos moleculares

4.1. Extracción de ADN

Para la realización de la extracción de ADN se utilizó el kit GenElute Bacterial Genomic DNA kit (Sigma 081M6130) siguiendo las instrucciones del fabricante para microorganismos Gram negativos.

- Se realizó la extracción de ADN de *Salmonella* a partir de muestras recogidas a tiempo cero, correspondientes al preenriquecimiento, y a partir del tubo de enriquecimiento de Rappaport-Vassiliadis incubado a 37°C \pm 1°C durante 48 horas.
- Se realizó la extracción de ADN de *Arcobacter* a partir de muestras recogidas a tiempo cero, correspondientes al preenriquecimiento, y a partir del caldo selectivo de enriquecimiento AB-2[CAT] incubado a 37°C \pm 1°C durante 48 horas en microaerofilia.

4.2. Detección de *Salmonella* y *Arcobacter* mediante PCR

4.2.1. PCR *Salmonella*

Para la detección de *Salmonella* en muestras de carne picada de ternera y cerdo se utilizaron los iniciadores específicos descritos por Aabo y col (1993) que amplifican un fragmento de 429 pb de ADN cromosómico cuya secuencia se especifica a continuación:

ST11: 5'-GCC AAC CAT TGC TAA ATT GGC GCA-3'

ST15: 5'-GGT AGA AAT TCC CAG CGG GTA CTG G-3'

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ l, conteniendo 20 μ l de mezcla y 5 μ l de ADN molde. En la reacción se incluyó un control negativo en el que el ADN se reemplazó por agua estéril y como control positivo se utilizó ADN de la cepa *Salmonella* CECT 915. Las concentraciones de los reactivos involucrados en la PCR se describen en la tabla 6.

Tabla 6: Reactivos para la PCR de *Salmonella*

Reactivos	Concentración final
Tampón Buffer (10x)	1x
Desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP)	0,5Mm/cada
Cloruro de Magnesio (MgCl ₂)	1,5mM
Iniciadores	0,4 μ M/cada
Taq-DNA polimerasa	0,05U

El proceso de amplificación se realizó en un termociclador modelo PTC-100 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) según los ciclos y condiciones de temperatura y tiempo descritos en la tabla 7.

Tabla 7: Condiciones de la PCR para la amplificación

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Reacción
1	95 ° C	10 min	desnaturalización
35	95 ° C	30 s	desnaturalización
	57 ° C	30 s	unión del iniciador
	72 ° C	30 s	extensión
1	72 ° C	10 min	extensión

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% (Agarosa, Roche) en tampón TAE con Red Safe al 5%, para teñir con fluorescencia el DNA. Los geles se dejan correr en cubeta de electroforesis a 95V durante una hora aproximadamente y se visualizan mediante un transiluminador Vilber Lourmat (09 200272) con luz UV, en el que se toman imágenes de los geles analizados.

El tamaño molecular de los amplicones fue confirmado mediante comparación con el marcador molecular GeneRuler 100-bp DNA Ladder Plus (MBI, Fermentas, Burlington).

4.2.2. PCR *Arcobacter*

Para la detección de *Arcobacter* en muestras de carne picada de ternera y cerdo se utilizaron los iniciadores ARCO1 y ARCO2, que amplifican un fragmento de 331 pb del gen 23S ARNr (Bastyns y col., 1995). La secuencia de los iniciadores se especifica a continuación:

ARCO1: 5'-GTC GTC CCA AGA AAA GCC A-3'

ARCO2: 5'-TTC GCT TGC GCT GAC AT-3'

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50µl, conteniendo 45µl de mezcla y 5µl de DNA molde. En la reacción se incluyó un control negativo en el que el ADN se reemplazó por agua estéril y como control positivo se utilizó ADN de la cepa *A. butzleri* DSM 8739. Las concentraciones de los reactivos involucrados en la PCR se describen en la tabla 8.

Tabla 8: Reactivos para la PCR de *Arcobacter*

Reactivos	Concentración final
Tampón Buffer (10x)	1x
Desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP)	100µM/cada
Cloruro de Magnesio (MgCl ₂)	2mM
Iniciadores	0,5µM/cada
Taq-DNA polimerasa	2,5U

El proceso de amplificación se realizó en un termociclador modelo Eppendorf, según los ciclos y condiciones de temperatura y tiempo descritos en la tabla 9.

Tabla 9: Condiciones de la PCR para la amplificación

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Reacción
1	94 ° C	5 min	desnaturalización
27	94 ° C	1 min	desnaturalización
	61 ° C	1 min	unión del iniciador
	72 ° C	1 min	extensión
1	72 ° C	5 min	extensión

Los productos de PCR fueron analizados en las mismas condiciones expuestas anteriormente para *Salmonella*.

IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Recuento de aerobios mesófilos

Para valorar el estado higiénico-sanitario de la carne picada de cerdo y de ternera utilizada en el periodo de estudio, se realizó un recuento de microorganismos aerobios mesófilos a las 7 muestras según el método horizontal para el recuento de microorganismos (ISO 4833-1:2013). Los valores obtenidos se muestran en la tabla 10.

Tabla 10: Recuentos de aerobios mesófilos en la carne picada de cerdo y de ternera analizada

Muestra	Mercado	Aerobios mesófilos UFC/g
M1 Cerdo	Mercado A	$3,0 \times 10^5$ UFC/g
M2 Ternera	Mercado A	$3,0 \times 10^5$ UFC/gr
M3 Ternera	Mercado B	$5,2 \times 10^4$ UFC/gr
M4 Cerdo	Mercado A	$2,5 \times 10^5$ UFC/gr
M5 Ternera	Mercado A	$8,8 \times 10^5$ UFC/gr
M6 Ternera	Mercado A	$1,7 \times 10^5$ UFC/gr
M7 Cerdo	Mercado C	$1,2 \times 10^6$ UFC/gr

Las muestras fueron adquiridas de tres mercados diferentes, denominados A, B y C en este trabajo. Los resultados obtenidos en los recuentos de aerobios mesófilos de las muestras 5 (ternera) del mercado A y 7 (cerdo) del mercado C sobrepasan el límite microbiológico establecido para la carne picada (5×10^5 UFC/gr). En cambio, las muestra 1, 2, 3, 4 y 6 de los mercados A y B cumplen el criterio microbiológico para dicha carne, destacando la muestra 3 (ternera) como el resultado más satisfactorio con $5,2 \times 10^4$ UFC/g. Para visualizar los resultados obtenidos se observa la figura 1, donde se muestra las UFC/g para cada muestra.

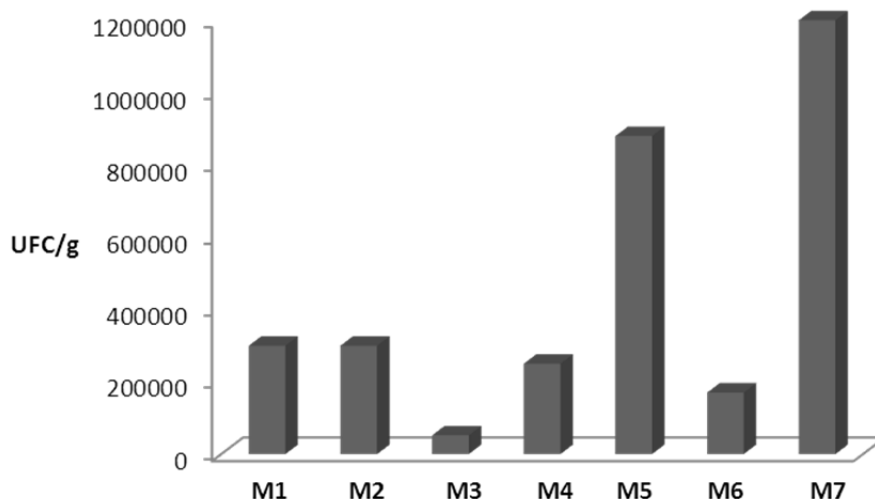


Figura 1: Gráfico del recuento de aerobios mesófilos

En su conjunto, para el mercado A, los resultados obtenidos en el análisis de microorganismos aerobios mesófilos de las muestras detectaron un recuento aceptable dentro de los límites microbiológicos establecidos para la carne picada durante la vida útil del comercio del producto. En cambio, para el mercado B se detectó un recuento satisfactorio y para el mercado C el recuento de aeróbios mesófilos obtuvo el peor resultado, siendo insatisfactoria su valoración, por lo tanto en dicho mercado debe mejorar la higiene de la producción y mejorar la selección y/o el origen de las materias primas. Como conclusión, el mercado B

obtuvo la mejor calificación higiénicamente respecto al recuento de aeróbios mesófilos, el mercado A obtuvo una calificación aceptable dentro de los límites microbiológicos y el mercado C obtuvo la peor calificación, con un elevado recuento de dichos microorganismos suponiendo un riesgo para la Salud Pública.

2. Detección e identificación de *Escherichia coli*

2.1. Mediante método por cultivo

Se analizó la presencia de *Escherichia coli* en las 7 muestras de carne picada. En dos de los casos estudiados, pertenecientes a las muestras 6 (ternera) del mercado A y 7 (cerdo) del mercado C, aparecieron colonias sospechosas de *E.coli*, que tras la realización de la prueba bioquímica de confirmación, prueba IMViC, resultaron ser positivas (figura 2).

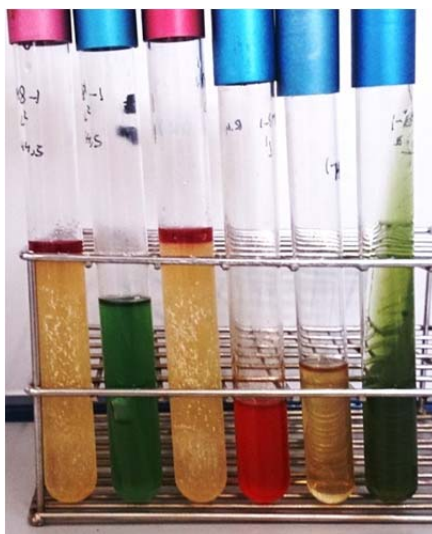


Figura 2: IMViC positivo para *Escherichia Coli*

Por lo tanto se obtuvo un 28,57%, de resultados positivos en dicha determinación, para las 7 muestras analizadas de carne picada, siendo un 33,33% de resultados positivos para las 3 muestras de carne picada de cerdo y un 25% para las 4 muestras de carne picada de ternera. Resultados parecidos se obtuvieron en un estudio realizado en Jeddah, Arabia Saudí, donde apareció un 20% de resultados positivos para *E.coli* en un total de 20 muestras analizadas de carne, en las que se incluye carne de vacuno y de cerdo, adquiridas en hipermercados de dicha ciudad. En ese mismo estudio se obtuvo un 40% de resultados positivos en las muestras tomadas de tiendas de alimentos y un 65% en carnicerías independientes, en ambos casos en un total de 20 muestras analizadas (Iyer y col., 2013). En cambio, un resultado inferior se obtuvo en un estudio realizado en Washington DC, entre junio de 1999 y julio de 2000, ya que el 19,0% de un total de 210 muestras analizadas carne de vacuno y el 16,3% de un total de 209 muestras analizadas de carne de cerdo, fueron positivas para *E.coli* (Zhao y col., 2001).

Una vez comparados los resultados obtenidos con los resultados del recuento de aeróbios mesófilos, se observa que los dos aislados de *E.coli* pertenecen a los mercados A y C, al igual que los valores inaceptables de las muestras 5 y 7 de aeróbios mesófilos. Además, las muestras 5 y 6, pertenecientes al mercado A, fueron compradas el mismo día y a la misma hora, por lo que se observa una clara relación entre los resultados obtenidos y el lugar de la compra, el cual no se encontraba en las condiciones higiénicas adecuadas.

2.2. Número Más Probable (NMP)

Se analizó el NMP en las 7 muestras de carne picada (Pascual y Calderón, 2000) utilizando la tabla para el recuento de *Enterobacteriaceae* lactosa-positivas (coliformes totales).

Tabla 11: Tabla del NMP por gramo o mililitro

Muestras	código			NMP de UFC g o ml
	Tres tubos 1ml 1:10	Tres tubos 1ml 1:100	Tres tubos 1ml 1:1000	
M1 Cerdo	0	0	0	<3
M2 Ternera	0	0	0	<3
M3 Ternera	3	2	2	210
M4 Cerdo	3	3	2	1.100
M5 Ternera	3	0	0	23
M6 Ternera	2	0	0	9
M7 Cerdo	3	3	3	>2.400

Los resultados obtenidos de la muestra 3 (ternera) del mercado B, de la muestra 4 (cerdo) del mercado A y de la muestra 7 (cerdo) del mercado C sobrepasan el límite microbiológico establecido para la carne picada (50 UFC/g). En cambio, las muestra 1, 2, 5 y 6 cumplen el criterio microbiológico para dicha carne, destacando las muestra 1 (cerdo) y 2 (ternera) como los resultados más satisfactorios con <3 UFC/g.

En su conjunto, para el mercado A, los resultados obtenidos en el NMP detectaron un recuento aceptable dentro de los límites microbiológicos establecidos para la carne picada durante la vida útil del comercio del producto. En cambio, en el mercado B se superó el límite microbiológico establecido (50 UFC/g) y en el mercado C se obtuvo el peor resultado, siendo insatisfactoria su valoración, por lo tanto en dicho mercado debe mejorar la higiene de la producción y mejorar la selección y/o el origen de las materias primas.

Una vez comparados los resultados obtenidos mediante la detección por cultivo respecto a los resultados del NMP se puede observar que el valor más elevado e inaceptable del NMP en la muestra 7 corresponde al aislamiento de *E.coli* de la anterior determinación.

2.3. Estudio de la sensibilidad a antimicrobianos en *E.coli* mediante el método del antibiograma disco-placa

Se determinaron los halos de inhibición de los 12 antibióticos estudiados frente a los aislados de *E.coli* de la muestra 6 de ternera y la muestra 7 de cerdo por el método del antibiograma disco-placa descrito en el apartado 3.1 de Material y Métodos, siendo estos los resultados obtenidos, tabla 12.

Tabla 12: Resultados de las resistencias de los aislados frente a los 12 antibióticos

Cepas de <i>E.coli</i>	Muestra	Resistente	Intermedio
Aislado 1	M6 (ternera)	AMC,E,AMP,NAL, KF,CIP,TE	CRO
Aislado 2	M7 (cerdo)	AMC,E, AMP,TE	KF

El aislado 1 obtuvo un 58,33% de resistencia a los antibióticos utilizados, un 25% de sensibilidad y tan solo un 8,33% dieron un resultado intermedio. En cuanto al aislado 2 se

obtuvo un 25% de resistencia, un 58,33% de sensibilidad y tan solo un 8,33 dieron un resultado intermedio (figura 3).

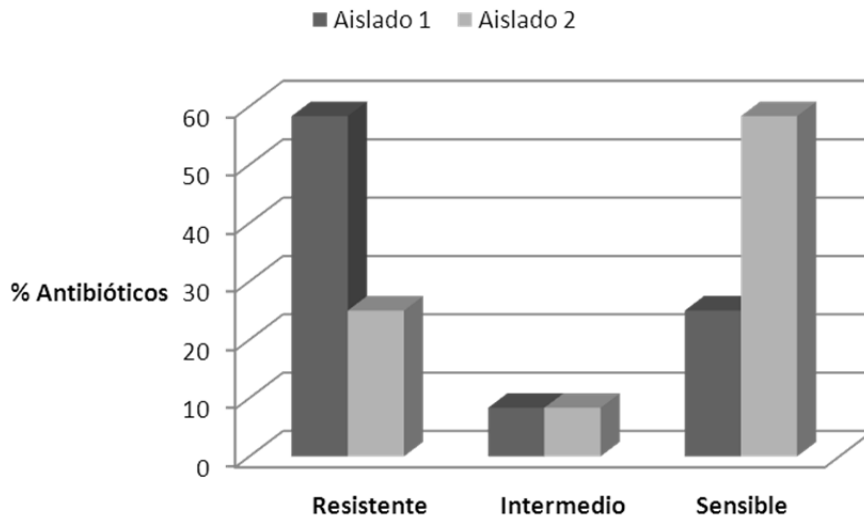


Figura 3: Porcentaje de los antibióticos según su clasificación como resistentes, intermedios o sensibles

Ambos aislados mostraron multiresistencia a varios de los antibióticos utilizados, siendo para el aislado 1 (figura 4) un 25% a antibióticos betalactámicos, un 16,67% al grupo de las quinolonas y un 8,33% de resistencia a los macrólidos y anfenicoles. Respecto al aislado 2, se observó resistencia en un 16,67% a los betalactámicos y un 8,33% de resistencia a los macrólidos y anfenicoles. Por lo tanto, en dichas muestras se detectó mayor resistencia a los antibióticos betalactámicos. Esto puede ser debido al excesivo uso de dichos antibióticos en producción animal, creando una expansión de bacterias resistentes a estos antibióticos que provocan un riesgo para la salud pública. El Panel sobre Riesgos Biológicos de la EFSA (BIOHAZ) publicó en 2011 que la utilización de antimicrobianos en animales productores de alimentos es un factor de riesgo para la diseminación de cepas bacterianas resistentes a betalactámicos de amplio espectro. BIOHAZ indica como una opción que podría resultar muy eficaz eliminar los tratamientos con cefalosporinas en ganadería. Según las conclusiones del panel, dos especies bacterianas que son capaces de desarrollar estas resistencias a betalactámicos con mucha facilidad son *Escherichia coli* y *Salmonella* (Ventura García, 2011).



Figura 4: Resistencia a antibióticos en el aislado 1

La ausencia de resistencia a la Ceftriaxona fue un resultado deseable en ambas cepas, ya que esta cefalosporina de tercera generación constituye uno de los grupos de antimicrobianos de

mayor uso, gracias a su gran actividad frente a Gram negativos como Enterobacterias (Cona, 2002). En cambio, en una de las cepas (aislado 1) se obtuvo resistencia al Ciprofloxacino. En España, la resistencia de la bacteria *E.coli* a ciprofloxacino ha ido en aumento, de un 17,9 % en 2001 a un 35% en 2011, situando a España en uno de los países de la UE con las cifras más altas en resistencia de *E.coli* a dicho antibiótico. Dicha resistencia crea graves problemas a la hora de administrar ciprofloxacino en infecciones intestinales a causa de *E.coli* (GACETA MÉDICA, 2013). La Comisión del Codex Alimentarius elaboró un informe para el uso responsable y prudente de los antimicrobianos en animales productores de alimentos. Estas normas están recogidas en el *Código internacional para el control y la autorización de los medicamentos veterinarios* CAC/RCP 38-1993 y el *Código de Prácticas para Reducir al Mínimo y Contener la Resistencia a los Antimicrobianos* CAC/RCP 61/2005 (OMS, 2008). Ciprofloxacino es una fluoquinolona no autorizada para el uso animal en Europa, tal y como indican Balsalobre y Hernández (2004).

3. Detección e identificación de *Salmonella*

3.1. Mediante método por cultivo

Se analizó la presencia de *Salmonella* en las 7 muestras de carne picada mediante el Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp (según la ISO 6579:2002). En varios de los casos estudiados aparecieron colonias sospechosas de *Salmonella*, que tras la realización de la prueba bioquímica de confirmación, tira API, resultaron no pertenecer al género *Salmonella*, por lo tanto se trataron de muestras negativas. Un resultado bajo también se obtuvo en un estudio realizado en Washington DC, entre junio de 1999 y julio de 2000, ya que sólo el 3,0% de las muestras de carne al por menor analizadas fueron positivas para *Salmonella*, entre un total de 825 muestras de carne, en la que se incluía carne de vacuno y de cerdo. De este bajo porcentaje, el 3,3% fueron positivas para carne de cerdo, de un total de 209 muestras, mientras que el 1,9% fueron positivas para carne de vacuno, en un total de 210 muestras analizadas (Zhao y col., 2001). Asimismo, en un estudio realizado en Reino Unido entre los años 2003 y 2005 se obtuvo también un valor muy bajo en la determinación de *Salmonella* en carne roja con tan sólo un 2,4% de resultados positivos de 3959 muestras totales analizadas. En dicho estudio se obtuvo tan solo un 1,1% de resultados positivos para *Salmonella* en un total de 1563 muestras analizadas de ternera y únicamente un 1,9% en 1440 muestras de carne de cerdo (Little y col., 2008). En cambio, un resultado muy superior fue obtenido para la carne de cerdo en un estudio realizado en el Norte de Vietnam durante el periodo del 2007 al 2009, dando un 39,6% de resultados positivos en *Salmonella* para un total de 318 muestras analizadas (Ha Thai y col., 2012) o en otro estudio realizado en Jeddah, Arabia Saudi, donde apareció un 45% de resultados positivos para *Salmonella* en un total de 20 muestras analizadas de carne, en la que se incluye carne de vacuno y de cerdo, adquiridas en carnicerías independientes de dicha ciudad. En ese mismo estudio se obtuvo un 25% de resultados positivos en las muestras tomadas de tiendas de alimentos y un 5% en hipermercados, en ambos casos en un total de 20 muestras analizadas (Iyer y col., 2013).

La ausencia de resultados positivos de *Salmonella* en dicha determinación puede ser debido a que no estén presentes en las muestras, pero también a la presencia de *Salmonella* en mínimas cantidades en las muestras, por lo que ha sido imposible su detección mediante cultivo. Asimismo *Salmonella* puede haber pasado a formas subletales que no han podido recuperarse a lo largo del procedimiento por diversos motivos: contaminación por otros microorganismos, desajustes en la temperatura, mala conservación en refrigeración, etc. Dichos resultados también ha podido ser causados por el bajo número de muestras analizadas de cada carne, además de haber sido adquiridas solamente de tres comercios diferentes (A, B y C), por lo que puede considerarse un muestreo poco representativo.

3.2. Mediante el método de la PCR

Las muestras fueron analizadas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa, tanto antes como después del enriquecimiento. En 3 de las muestras analizadas, correspondientes a las muestras 1 (cerdo), 5 (ternera) y 6 (cerdo) obtenidas tras la fase de enriquecimiento, se obtuvo resultados positivos (figura 5). Por lo tanto el 42,86% de las 7 muestras analizadas fueron positivas (66,67% para las 3 muestras de carne cerdo y 25% para las 4 muestras de carne de ternera). Para las muestras 1 y 5 las bandas obtenidas mediante la PCR fueron débiles y en el caso de la muestra 6, la banda era fuerte y definida.

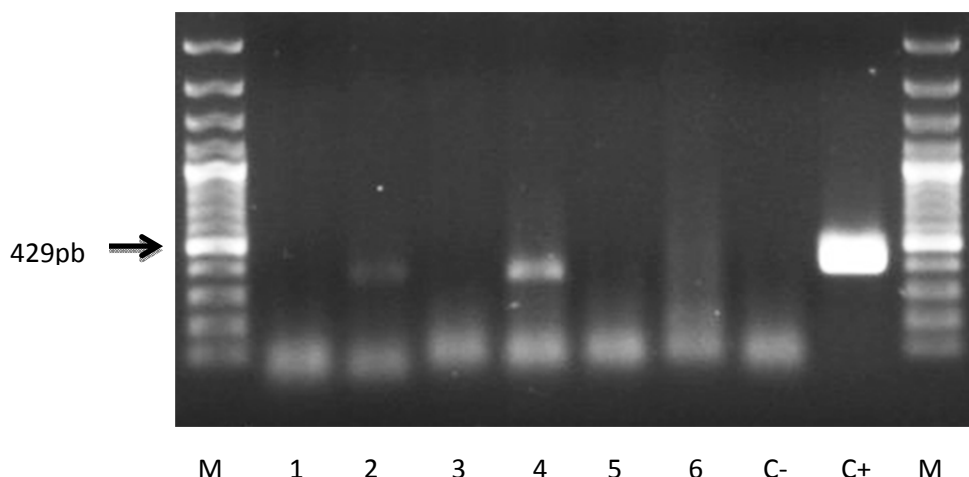


Figura 5: Detección de *Salmonella* mediante PCR: muestra 5 a la 7 a distintos tiempos. Identificación de *Salmonella* por PCR: M: Marcador de 100pb; 1:5S0; 2:5S1; 3:6S0; 4:6S1; 5:7S0; 6:7S1; C-: Control negativo; C+: Control positivo de la cepa *Salmonella* 915; M: Marcador de 100pb

Comparando los resultados obtenidos mediante el método por cultivo y los obtenidos mediante el método de la PCR para *Salmonella*, se observa que los resultados positivos obtenidos mediante la PCR no fueron detectados anteriormente mediante el método por cultivo. Lo mismo ocurrió en un estudio realizado por Adell y col. (2014) en el Centro de Tecnología Animal (CITAIVIA) ubicado en Segorbe (Castellón, España), donde los resultados positivos para la detección de *Salmonella* en aire mediante métodos microbiológicos clásicos fueron inferiores a los obtenidos mediante la PCR. Los métodos de cultivo pueden, en gran medida, subestimar las poblaciones reales de bacterias patógenas y su amenaza para la salud pública (Chi, 2006), ya que bacterias viables han podido perder su capacidad de formar colonias durante dicho procedimiento. Además, han podido aparecer competencias entre *Salmonella* y otros microorganismos presentes en el ambiente, cuando ésta se encuentra en bajas concentraciones, impidiendo así el cultivo de dicho microorganismo (Qasem, 2005). El límite de detección de la PCR es más bajo que el de las técnicas de cultivo (Alvarez, 1995), por lo tanto asegura en mayor medida la fiabilidad de los resultados. Además los métodos moleculares no pueden diferenciar fácilmente entre bacterias viables y no viables, por lo que ADN bacteriano de células muertas de *Salmonella* también podrían ser detectadas mediante la PCR (Keer, 2003). Zhao y col. (Zhao y col, 2011) obtuvieron resultados similares con *Campylobacter* en el aire. Estos autores no detectaron *Campylobacter* en el aire por métodos de cultivo tradicionales, pero sí obtuvieron resultados positivos utilizando la PCR.

Al observar los resultados, destaca la muestra 6, ya que en dicha muestra se detectó la presencia de *E.coli* y posteriormente mediante PCR, la de *Salmonella*. También destaca la muestra 5, donde el recuento de aerobios mesófilos sobrepasa los límites de legislación y mediante PCR se ha detectado *Salmonella*. Además, ambas muestras fueron adquiridas en el

mismo mercado (mercado A), por lo tanto el establecimiento donde se compró la carne de ambas muestras no estaba en las condiciones higiénicas adecuadas.

4. Detección e identificación de *Arcobacter*

4.1. Mediante método por cultivo

Se analizó la presencia de *Arcobacter* en las 7 muestras de carne picada. En varias de las muestras aparecieron colonias sospechosas de pertenecer al género *Arcobacter*, sin embargo tras la realización de la tinción Gram fueron descartadas por mostrar características de bacterias Gram positivas. Finalmente, en ninguna de las muestras fue posible obtener ningún aislado susceptible de pertenecer al género *Arcobacter*.

En cambio, otros estudios muestran altos porcentajes de aislamiento de *Arcobacter* en este tipo de carne. Este es el caso de un estudio realizado en Malasia, en el año 2012, donde se obtuvo un 30,2% de aislamiento de *Arcobacter* en un total de 106 muestras de carne de vacuno (Shah y col., 2012) o en un trabajo, realizado en España entre el año 2006 y 2008 en la *Universitat Rovira i Virgili* en Reus, donde se obtuvieron porcentajes altísimos de resultados positivos para *Arcobacter*, alrededor de un 53% en carne de cerdo trabajando sólo con 17 muestras y un 31,3 % tras analizar únicamente 16 muestras en carne de vacuno. Son varios los factores que pueden afectar a las diferencias entre nuestros resultados y los obtenidos en estos estudios. Estas diferencias pueden deberse a múltiples causas, como es el caso de estudios llevados a cabo en diferentes regiones geográficas, con distintas condiciones higiénicas y utilizando métodos de aislamiento diferentes (Collado y col., 2009).

Por otro lado, en bibliografía también se encuentran otros estudios con porcentajes de aislamiento bajos para *Arcobacter* en este tipo de carne. De hecho, en un estudio llevado a cabo en el País Vasco en el año 2013, únicamente se obtuvieron un 5% de muestras positivas en el caso de carne de vacuno y un 10% en muestras de carne de cerdo (Nieva-Echevarria y col., 2013).

Teniendo en cuenta que en este trabajo tan sólo se analizaron 4 muestras de ternera y 3 muestras de cerdo, es posible llegar a la conclusión de que la ausencia de resultados positivos mediante dicho método pueda ser debido al bajo número de muestras analizadas, ya que en estudios anteriores donde obtuvieron resultados positivos para *Arcobacter* en este tipo de carne analizaron un número de muestras muy superior. Además las 7 muestras analizadas en dicho estudio fueron tomadas de tan sólo tres mercados diferentes (A, B y C), por lo que el muestreo pudo no ser representativo (Collado y col., 2009).

4.2. Mediante el método de la PCR

Las muestras fueron analizadas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa, tanto antes como después del enriquecimiento selectivo en AB con CAT. En ninguna de las muestras analizadas, a excepción del control positivo de la reacción, se obtuvo la banda de 331pb del gen 23S ARNr característica para el género *Arcobacter*, como se puede observar en la figura 6. Dichos resultados concuerdan con los obtenidos anteriormente por el método por cultivo.

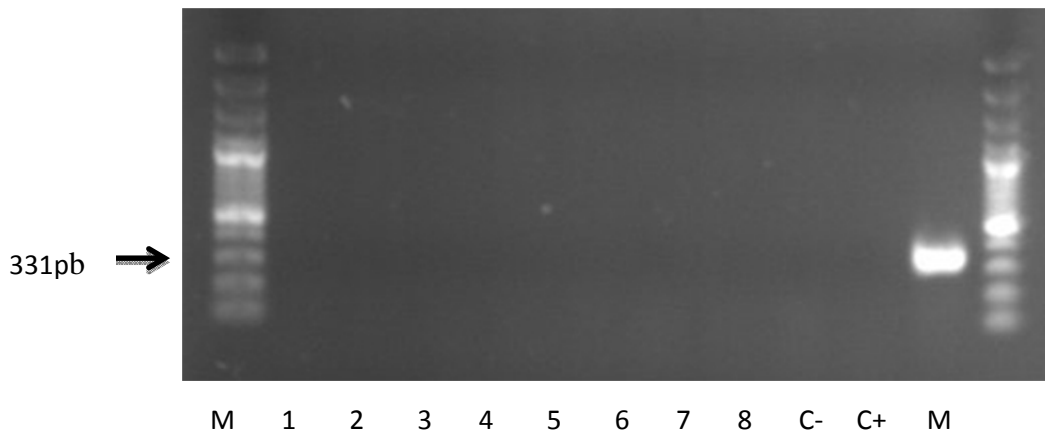


Figura 6: Detección de *Arcobacter* mediante PCR: muestra 1 a la 4 a distintos tiempos.

Identificación de *Arcobacter* por PCR: M: Marcador de 100pb; 1:1S0; 2:1S1; 3:2S0; 4:2S1; 5:3S0; 6:3S1; 7:4S0; 8:4S1; C-: Control negativo; C+: Control positivo de la cepa *Salmonella* 915; M: Marcador de 100pb

Por tanto, podemos decir que las muestras analizadas no estaban contaminadas, y a la vez confirmar la utilidad del protocolo seleccionado en este estudio, porque tanto por el método tradicional de cultivo en placa como por detección directa en muestra por PCR se obtuvieron exactamente los mismos resultados.

Nuestros resultados concuerdan, en parte, con los obtenidos en carne de cerdo en un estudio realizado en Japón, donde también se obtuvieron porcentajes de detección muy bajos para este tipo de muestras, con valores próximos al 7% de un total de 100 muestras (Kabeya y col., 2004). Sin embargo, nuestros resultados son muy bajos teniendo en cuenta la alta prevalencia de *Arcobacter* en carne de cerdo en la mayor parte de la bibliografía consultada. Este es el caso de un estudio realizado en 2004 en Australia, con un 29% de detección de *Arcobacter* en un total de 21 muestras (Rivas y col., 2004) o en el realizado en 2002 en Estados Unidos con un 32% de muestras positivas de las 200 analizadas mediante PCR (Ohlendorf y Murano, 2002).

En el caso de la carne de ternera, los resultados publicados son en general un poco más bajos que los obtenidos para carne de cerdo. En un estudio llevado a cabo con un total de 90 muestras en Japón, tan sólo se obtuvo un 2,2% de resultados positivos para *Arcobacter* (Kabeya y col., 2004). En Turquía, en el año 2004, tan sólo se obtuvo un 5,1% de muestras positivas de un total de 97 (Öngör, 2004). Otros estudios obtuvieron resultados más elevados, como en Australia, con un 22% de resultados positivos en 32 muestras (Rivas y col., 2004) o en Irlanda, con valores próximos al 35% (Scullion y col., 2006).

La ausencia de resultados positivos para *Arcobacter* en este trabajo puede estar relacionada con el poco conocimiento que aún se tiene de dicha bacteria emergente, ya que en la actualidad no existe ningún método que permita la detección e identificación de todas las especies conocidas hasta el momento (Collado y col., 2009). Algunos estudios (Romero y col., 2002; Scullion y col., 2006), indican una diversidad de especies potencialmente nuevas de *Arcobacter* lo que aumentaría todavía más la dificultad para su detección por PCR. De hecho, se han dado casos en los que tras conseguir el aislamiento de *Arcobacter* por cultivo no se han obtenido resultados positivos por PCR en las muestras de las cuales procedían los aislados (Collado y col., 2009).

V. CONCLUSIONES

1. El estudio de la contaminación inicial de aerobios mesófilos en carne picada de cerdo y de ternera de venta al público ha permitido comprobar que el mercado B obtuvo la mejor calificación higiénicamente respecto a los criterios microbiológicos establecidos para dicha carne, mientras que el mercado A obtuvo una calificación aceptable dentro de los límites microbiológicos y el mercado C obtuvo la peor calificación, con un elevado recuento de dichos microorganismos suponiendo un riesgo para la Salud Pública.
2. La detección de *Escherichia coli* en dos de las muestras y de *Salmonella* en tres de las siete muestras, pone de manifiesto la continua necesidad de investigar la presencia de bacterias patógenas que puedan constituir un problema para la Salud Pública.
3. El aislamiento de dos cepas de *Escherichia coli* y los valores más elevados de recuentos de aerobios mesófilos pertenecen a los mercados A y C, lo que pone de manifiesto la necesidad de aumentar la higiene tanto del lugar de venta como de la manipulación de la carne, evitando la posible contaminación por microorganismos que puedan alterar el producto y ser causa de toxiinfecciones.
4. El estudio del NMP para *Escherichia coli* en carne picada de cerdo y de ternera de venta al público, ha permitido comprobar que el mercado A obtuvo la mejor calificación respecto a los criterios microbiológicos establecidos para dicha carne, mientras que el mercado B sobrepasó los límites microbiológicos y el mercado C obtuvo la peor calificación, con un elevado valor en el NMP, suponiendo un riesgo para la Salud Pública.
5. El total de los aislados de *Escherichia coli* mostraron multiresistencia a los agentes antimicrobianos estudiados, siendo uno de ellos resistente a siete de los doce antibióticos estudiados.
6. La resistencia, mayoritariamente a los betalactámicos, de ambos aislados de *Escherichia coli* podría indicar que se realiza un mal uso de dichos antibióticos en producción animal.
7. Uno de los aislados *Escherichia coli* mostró resistencia frente a Ciprofloxacino, lo que supone un claro riesgo para la salud pública.
8. La técnica de la PCR ha demostrado ser mucho más sensible que los métodos culturales convencionales, ya que la presencia de *Salmonella* fue detectada exclusivamente por dicha técnica sin su anterior determinación por cultivo.
9. No se consiguió obtener ningún aislamiento perteneciente al género *Arcobacter*, ni en muestras de cerdo ni en muestras de vacuno. Estos resultados fueron confirmados por PCR.
10. El método de detección por PCR resulta una herramienta útil para la detección de la presencia de microorganismos en muestras de carne picada, por su especificidad, sensibilidad y reproducibilidad, reduciendo considerablemente el tiempo necesario hasta la obtención de resultados frente a las técnicas tradicionales de cultivo.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- AABO, S.; RASMUSSEN, O. F.; ROSSEN, L.; SORENSEN, P. D.; OLSEN, J. E., 1993. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes*, 7: 171-178pp.
- ABDELBAQI, K.; MENARD, A.; PROUZET MAULEON, V.; BRINGAUD, F.; LEHOURS, P.; MEGRAUD, F., 2007. Nucleotide sequence of the *gyrA* gene of *Arcobacter* species and characterization of human ciprofloxacin-resistant clinical isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol* 49, 337-345pp.
- ADAMS, M.R.; MOSS, M.O., 1997. *Microbiología de los alimentos*. Ed. Acribia. Zaragoza. 464pp.
- ADELL, E.; MOSET, V.; ZHAO, Y.; JIMÉNEZ BELENGUER, A.; CERISUELO, A.; CAMBRA LÓPEZ, M^a, 2014. Comparative performance of three sampling techniques to detect airborne *Salmonella* species in poultry farms. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2014, Vol 21, N^o 1, 1–10pp.
- ALVAREZ, A.; BUTTNE, M.; STETZENBACH, L., 1995. PCR for bioaerosol monitoring: sensitivity and environmental interference. *Appl Environ Microbiol*. 1995; 61: 3639–3644pp.
- ASH, C. A.; FRINCKER, C. R., 1996. Detection of viable *Salmonellae* in environmental samples by the polymerase chain reaction (PCR). *Specialized Conference on Health. Related Water Microbiology*, Mallorca 1996.
- ATABAY, H.I.; CORRY, J. E., 1997. The prevalence of campylobacters and *Arcobacters* in broiler chickens. *Journal of Applied Microbiology*, 83 (1997), 619-626pp.
- BALSALOBRE, B.; HERNÁNDEZ, J., 2004. Resistencias a antibióticos en *Listeria Monocytogenes* y *Salmonella entérica* aislados de alimentos de origen animal. *Revista de Salud Ambiental* Vol 4 n^o 1-2/42-46pp.
- BASTYNS, K.; CARTUYVELS, D.; CHAPELLE, S.; VANDAMME, P.; GOOSSENS, H.; DEWACHTER, R., 1995. A variable 23S rDNA region is a useful discriminating target for genus-specific and species-specific PCR amplification in *Arcobacter* species. *Systematic and Applied Microbiology*. 18: 353-356pp.
- BERMÚDEZ POLO, M^a E.; RODRÍGUEZ JOVITA, M^a M., 2001. Microbiología de productos cárnicos, en: *Enciclopedia de la carne y de los productos cárnicos Volumen II*. Ed. Martín & Macías. Madrid. 1.549-1560pp.
- BES, Boletín Epidemiológico Semanal, 2009. *Infecciones por Salmonella no tifoidea de origen humano en España. Sistema de Información Microbiológica. Años 2000-2008*. Vol 17 n^o 17/193-204pp. Visto el 9 de Mayo del 2014.
- BES, Boletín Epidemiológico Semanal, 2013. *Situación de la zoonosis en Europa. Informe de la autoridad europea de seguridad alimentaria (EFSA), 2013*. Vol 21 n^o 7 /70-80pp. Visto el 8 de Mayo del 2014.
- B.O.E, Boletín Oficial del Estado, 1986. Orden, del 14 de Enero de 1986, por la que se aprueba la norma de calidad para carnes picadas de vacuno, ovino y porcino destinadas el mercado interior (B.O.E. 21.01.1986), BOE n^o 18,2935-2937 pp. Visto el 16 de Abril del 2014.
- <http://www.boe.es/boe/dias/1986/01/21/pdfs/A02935-02937.pdf>
- BOLIVAR, A. M.; ROJAS, A.; GARCÍA LUGO, P., 2014. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina*, vol. 3, núm. 1, enero-abril, 2014, pp. 25-33 Universidad de los Andes Mérida, Venezuela.
- BOURGEOIS, C. M.; MESCLE, J.F.; ZUCCA, J., 1994. *Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria*. Ed. Acribia. Zaragoza. 460pp.

CALVO, G.; ARIAS, M^a L.; FERNÁNDEZ, H.; 2013. *Arcobacter*: un patógeno emergente de origen alimentario. Archivos latinoamericanos de nutrición. *Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición* Vol 63 nº 2/164-170pp.

CARDOEN S.; VAN HUFFEL X.; BERKVEN S.; QUOLIN S.; DUCOFFRE G.; SAEGERMAN C.; SPEYBROECK N.; IMBERECHTS H.; HERMAN L.; DUCATELLE R.; DIERICK K., 2009. Evidence based semi-quantitative methodology for prioritization of foodborne zoonosis. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2009. 6: 1-13pp.

CHA CS; LI CM; YANG HX, LIU PF 1993. Powder microelectrodes. *J Electro Chem*, 368: 47-5 pp.

CHI, M.C.; LI, C.H., 2006. Analysis of bioaerosols from chicken houses by culture and non-culture method. *Aerosol Sci Technol*. 2006; 40, 1071–1079pp.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Seventeenth Informational Supplement*. CLSI document M100-S17 (ISBN 1-56238-625-5).

COLLADO L.; FIGUERAS M., 2011. Taxonomy, epidemiology and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2011. 24: 174–192pp.

COLLADO, L.; GUARRO, J.; FIGUERAS, M^a J., 2009. Prevalence of *Arcobacter* in Meat and Shellfish. *Journal of Food Protection*, Vol. 72, Nº 5, 2009, 1102–1106pp.

COLLADO L.; LEVICAN A.; PEREZ J; FIGUERAS M., 2010. *Arcobacter defluvii* sp. nov., isolated from sewage. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 2010. 61; 2155-2161pp.

CONA, E., 2002. Etapas en la evaluación de diferentes cefalosporinas: Un flujograma lógico. *Revista chil.infectol.* V19 Supl. 2.

CUESTA G., 2004. *Tesis doctoral: Detección y caracterización por métodos fenotípicos y moleculares de mycolata formadores de espumas en estaciones depuradoras de aguas residuales*. Universidad Politécnica de Valencia.

DONACHIE S.; BOWMAN J.; ON S.; ALAM M., 2005. *Arcobacter halophilus* sp. nov., the first obligate halophile in the genus *Arcobacter*. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 2005. 55: 1271-1277pp.

DOUIDAH L.; DE ZUTTER L.; VADAMME P.; HOUF K., 2010. Identification of five human and mammal associated *Arcobacter* species by novel Multiplex-PCR assay. *J. Microbiol. Meth.* 2010. 80: 281-286pp.

DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J., 1997. *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. Ed. ASM Press. Washington D.C. 768pp.

ELLIS W.; NEILL S.; O'BRIAN J.; HANNA J., 1978. Isolation of Spirillum like organism from pig fetuses. *Vet. Record*. 1978. 102: 106pp.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2011. *Prevención de E.coli en los alimentos*. 12pp. Visto el 2 de Junio del 2014.

http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecoli_es.pdf

FERA M.; MAUGUERI T.; GUGLIANDOLO C.; LA CAMERA E.; LENTINI V.; FAVALORO A.; BONANNO D.; CARBONE M., 2008. Induction and resuscitation of viable nonculturable *Arcobacter butzleri* cells. *Appl. Environm. Microbiol.* 2008. 74: 3266-3268pp.

FIGUERAS M.; LEVICAN A.; COLLADO L.; INZA I.; YUSTES C., 2011. *Arcobacter ellisii* sp. nov. isolated from mussels. *System. Appl. Microbiol.* 2011. 34: 414-418pp.

FORSYTHE, S.J.; HAYES, P.R., 2002. *Higiene de los alimentos, microbiología y HACCP*. Ed. Acribia. Zaragoza. 512pp.

FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D. C., 1993. *Microbiología de los alimentos*. Ed. Acribia. Zaragoza. 681pp.

GACÉTA MÉDICA, 2013. *La resistencia a antibióticos de E.coli se duplica*. Visto el 18 de Junio del 2014.

<http://www.gacetamedica.com/noticias-medicina/2013-01-25/farmacia-hospitalaria/la-resistencia-a-antibioticos-de-e-coli-se-duplica/pagina.aspx?idart=720795>

GIBB, A. P.; WONG, S., 1998. Inhibition of PCR by agar from bacteriological transport media. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 275-276pp.

GIMFERRER, N., 2008. "Radiaciones ionizantes en alimentos".

GONZALEZ A.; FERRUS M., 2010. Study of *Arcobacter* spp. contamination in fresh lettuces detected by different cultural and molecular methods. *Int. J. Food Microbiol.* 2010. 145: 311-314pp.

HA THAI, T.; HIRAI, T.; THI LAN, N.; YAMAGUCHI, R., 2012. Antibiotic resistance profiles of *Salmonella* serovars isolated from retail pork and chicken meat in North Vietnam. *International Journal of Food Microbiology* 156 (2012) 147–151pp.

HO H.T., LIPMAN L.J.; GAASTRA W., 2006. *Arcobacter*, what is known about a potential foodborne zoonotic agent! *Vet Microbiol* 115:1–13pp.

ICMSF, International Commissions on Microbiological Specifications for Food, 2000. *Microorganismos de los alimentos. Su significado y métodos de enumeración*. Ed. Acribia. Zaragoza.

Instituto de Salud Carlos III, 2014. *Microorganismos declarados al Sistema de Información Microbiológica. Distribución por Comunidad Autónoma. España. Semanas 40 a 52 del año 2013*.3pp. Visto el 8 de Mayo del 2014.

ISPCH, Instituto de Salud Pública de Chile 2011. Visto el 7 de Mayo del 2014. <http://www.ispch.cl/>

IYER, A.; KUMOSANIL T.; YAGHMOOR, S.; BARBOUR, E.; AZHAR, E.; HARAKEH, S., 2013. *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in meat in Jeddah, Saudi Arabia. *J Infect Dev Ctries* 2013; 7(11):812-818pp.

JIMÉNEZ, M. A., 1998. Amplificación de ácidos nucleicos: introducción a la PCR. *Revista Colegio Oficial de Biólogos*, nº 15, Julio.

KABEYA, H.; MARUYAMA, S.; MORITA, Y.; OHSUGA, T.; OZAWA, S.; ABE, M.; KATSUBE, Y.; MIKAMI, T., 2004. Prevalence of *Arcobacter* species in retail meats and antimicrobial susceptibility of the isolates in Japan. *Int. J. Food Microbiol.* 90:303–308pp.

KEER, J. T.; BIRCH, L., 2003. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *J Microbiol Meth.* 2003; 53: 175–183pp.

KERSHENOBICH D., 2008. *Enfermedades Emergentes. El ejercicio actual de la Medicina*. UNAM.

KIENBAUCH J.; PLIKAYTIS B.; SWAMINATHAN B.; CAMERON D.; WACHSMUTH I., 1991. Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal genes for species identification and subtyping of aerotolerant *Campylobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* 1991. 29: 1670-1676pp.

KIM H.; HWANG C.; CHO B., 2010. *Arcobacter marinus* sp. nov., *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 2010. 60: 2172-2178pp.

- KLEPPE, K.; OHTSUKA, E.; KLEPPE, R.; MOLINEUX, R.; KHORANA, 1971. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalysed by DNA polymerases. *Journal of Molecular Biology*. 56: 341-361pp.
- LASTOVICA, A. J.; SKIRROW, M. B., 2000. Clinical significance of *Campylobacter* and related species other than *Campylobacter jejuni* and *C. coli*, p. 89-120pp. In: Nachamkin, I. & Blaser, M. J. (ed.), *Campylobacter 2nd Edition*. ASM Press, Washington, D. C.
- LEHNER A.; BRUMBERGER V.; PREAC MURSIC V., 1994. Severe diarrhea associated with *Arcobacter butzleri*. *Europ. J.Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 1994. 13: 660-662pp.
- LEVICAN A.; COLLADO L.; AGUILAR C.; TUSTES C.; DIEGUEZ A.; ROMALDE J.; FIGUERAS M. J., 2012. *Arcobacter bivalviorum* sp. nov. and *Arcobacter veneriupis* sp. nov., new species isolated from shellfish. *System. Appl. Microbiol*. 2012. 35: 133-138pp.
- LINTON, D.; OWEN, J.; ATANLEY, J., 1996. Rapid identification by PCR of the genus *Campylobacter* and five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals. *Research Microbiology*. 147: 707-718pp.
- LITTLE, C. L.; RICHARDSON, J. F.; OWEN, R. J.; PINNA, E.; THRELFALL, E.F., 2008. *Campylobacter* and *Salmonella* in raw red meats in the United Kingdom: Prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern, 2003–2005. *Food Microbiology* 25 (2008) 538–543pp.
- MAGRAMA, Ministerio De Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2014. *Datos de consumo alimentario en España 2013*, Visto el 16 de Abril del 2014.
<http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/PRESENTACION DATOS CONSUMO 2013 tcm7-321988.pdf>
- MORENO, Y.; FERRÚS, M. A.; VANOOSTENDE, A.; HERNÁNDEZ, M.; MONTES, R. ; HERNÁNDEZ, J., 2002. Comparison of 23S polymerase chain reaction and amplified fragment length polymorphism techniques as typing systems for thermophilic campylobacters. *FEMS Microbiol Lett*. 211, 97-103pp.
- MULLIS, K. B., 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*. 262: 56-65pp.
- NEILL, S. D.; CAMPBELL, J. N.; O'BRIEN, J. J.; WEATHERUP, S. T. C.; ELLIS, W. A., 1985. Taxonomic position of *Campylobacter cryaerophila* sp. nov. *Int. J. System. Bacteriol*. 35, 342-356pp.
- NEILL, S. D.; ELLIS W.; O'BRIAN J., 1979. Designation of aerotolerant *Campylobacter* like organism from porcine and bovine abortion to the genus *Campylobacter*. *Research Vet. Sci*. 1979. 27: 180-186pp.
- NIEVA-ECHEVARRIA, B.; MARTINEZ-MALAXETXEBARRIA, I.; GIRBAU, C.; ALONSO, R.; FERNÁNDEZ-ASTORGA, A., 2013. Prevalence and genetic diversity of arcobacter in food products in the north of Spain. *Journal of Food Protection* 2013 Aug;76(8):1447-5pp.
- SEM, Sociedad de Información Microbiológica. Normas microbiológicas por alimentos, 2014. Canales bovinas, ovinas, caprinas y equinas. Canales porcinas. Carne picada. Visto el 17 de Abril del 2014. http://bscw.rediris.es/pub/bscw.cgi/d311306-3/*/*/*/*normicro.htm
- OHLENDORF, D. S.; MURANO, E. A., 2002. Prevalence of *Arcobacter* spp. in raw ground pork from several geographical regions according to various isolation methods. *J. Food Prot*. 65:1700–1705pp.
- OMS, Organización Mundial de la Salud, 2002. *Estrategia global de la OMS para la inocuidad de los alimentos: alimentos más sanos para una salud mejor*. 28 pp. Visto el 5 de Junio del 2014.

- OMS, Organización Mundial de la Salud, 2008. *Red internaciones de Autoridades en materia de inocuidad de los alimentos (INFOSAN)*. Visto el 4 de Junio del 2014.
- OMS, Organización Mundial de la Salud, 2014. *Antimicrobial resistance. Global Report on surveillance*. 248-256 pp. Visto el 2 de Junio del 2014.
- ÖNGÖR, H.; CETINKAYA, B.; ACIK, M. N.; ATABAY, H. I., 2004. Investigation of *arcobacters* in meat and faecal samples of clinically healthy cattle in Turkey. *Lett. Appl. Microbiol.* 38:339–344pp.
- ON, S. L. W.; STACEY, A.; SMITH, J., 1995. Isolation of *Arcobacter butzleri* from a neonate with bacteriemia. *J. Infect.* 31: 225-227pp.
- ORDEN GUTIERREZ, J. A.; DE LA FUENTE LÓPEZ, R., 2001. Repercusiones en la salud pública de la resistencia a las quinolonas en bacterias de origen animal. *Revista Española de Salud Pública* vol.75 n.4 Madrid.
- PASCUAL ANDERSON, M. R., 1989. *Microbiología alimentaria: detección de bacterias con significado higiénico-sanitario*. Ed. Ministerio de Sanidad y Consumo. España. 440pp.
- PASCUAL ANDERSON, M^a R., 2005. *Enfermedades de origen alimentario. Su prevención*. Ed. Días de Santos, S.A. Madrid. 175pp.
- PASCUAL ANDERSON, M^a R.; CALDERÓN Y PASCUAL, V., 2000. *Microbiología alimentaria, metodología analítica para alimentos y bebidas*. Ed. Días de Santos, Madrid. 2^a Edición. 441pp.
- PARRA, M.; DURANGO, J.; MÁTTAR, S., 2002. *Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por Salmonella*. MVZ-CÓRDOBA 2002. 187-200pp.
- PATYAL A.; RATHONE R.; MOHAN H.; DHAMA K.; KUMAR A., 2011. Prevalence of *Arcobacter* spp. in humans, animals and foods of animal origin including sea food from India. *Transbound. Emerg. Dis.* 2011. 58: 402-410pp.
- PICAZO, J.; GARCÍA, J.; CANTÓN, R.; GARCÍA, J.; GOMEZ-LUS, M^a L.; MARTÍNEZ, L.; RODRIGUEZ-AVIAL, C.; VILA J., 2000. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. *Procedimientos en microbiología clínica*.
- PUIG, Y.; ESPINOSA, M.; LEYVA, V.; KELLY, T.; ZAGOVALOS.; MÉNDEZ D.; SOTO, P.; FERRER, Y., 2007. Susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Salmonella* sp. De origen clínico y alimentario. *Rev. Panam. Infectol* 2007; 9 (3):12.16pp.
- QASEM, J. A.; AL MOUQATI, S.; RAJKUMAR, G., 2005. Comparison of DNA probe, PCR amplification, ELISA and culture methods for the rapid detection of *Salmonella* in poultry. In: Makkar H, Viljoen G, editors. *Applications of Gene-Based Technologies for Improving Animal Production and Health in Developing Countries*. Springer Netherlands; 2005, 529–541pp.
- RICE, E. W.; RODGERS, M. R.; WESLEY, I. V.; JOHNSON, C. H.; TANNER, S. A., 1999. Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water. *Lett Appl Microbiol* 28, 31-35pp.
- RIVAS, L.; FEGAN, N.; VANDERLINDE, P., 2004. Isolation and characterization of *Arcobacter butzleri* from meat. *Int. J. Food Microbiol.* 91:31–41pp.
- ROMERO, J.; GARCIA-VARELA, M.; LACLETTE, J. P.; ESPEJO, R. R., 2002. Bacterial 16S rRNA gene analysis revealed that bacteria related to *Arcobacter* spp. constitute an abundant and common component of the oyster microbiota (*Tiostrea chilensis*). *Microb. Ecol.* 44:365–371pp.
- SAIKI, R. K.; SCHARF, S. ; MULLIS, K. B. ; HORN, G. T. ; ERKICH, H. A.; HIGUCHI, R. ; GELFAND, D.H.; STAFFEL, S., 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491pp.

SCULLION, R., HARRINGTON, C. S.; MADDEN, R. H., 2006. Prevalence of *Arcobacter* spp. in raw milk and retail raw meats in Northern Ireland. *J. Food Prot.* 69:1986–1990pp.

SHAH A.A.; SALEHA Z.; ZUNITA M.;MURUGAIYAH M., 2011. *Arcobacter* an emerging threat to animals and animal origin food products?. *Trends Food Sci. Technol.* 2011. 22: 225-236pp.

SHAH, A.H.; SALEHA, A.A; MURUGAIYAH, M.; ZUNITA, Z.; MEMON, A.A., 2012. Prevalence and Distribution of *Arcobacter* spp. in Raw Milk and Retail Raw Beef. *Journal of Food Protection*, Number 8, August 2012, 1366-1541pp, 1474-1478(5)pp.

STONE, G. G.; OBERTS, R. B.; HAYS, M. P. ; McVEY ,S.; CHENGAPPA, M. M., 1994. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation. PCR procedure, *J. of Clin, Microbiol.* July. 1742-1749pp.

TAYLOR, C. D.; WIRSEN, C. O.; GAILL, F., 1999. Rapid microbial production of filamentous sulfur mats at hydrothermal vents. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2253-2255pp.

VANDAMME P.; DE LEY, J., 1991. Proposal for a New Family, Campylobacteraceae. *Int. J. System. Bacteriol.* 1991.41: 451-455pp.

VAN DRIESSE E.; HOUF K.; VAN HOOFF J.; DE ZUTTER L.; VADAMME P., 2003. Isolation of *Arcobacter* species from animal feces. *FEMS Microbiology Letters.*2003. 229: 243-248pp.

VENTURA GARCÍA, J., 2011. Noticia en ALBÉITAR, PORTAL VETERINARIO. Visto el 1 de Junio del 2014.

<http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/10369/ACTUALIDAD/La-EFSA-afirma-que-reducir-el-uso-de-antibioticos-en-ganaderia-evitara-la-aparicion-de-resistencias-bacterianas.html>

VÍLCHEZ, G.; ALONSO, G., 2009. Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2009; 29:6-12pp.

WAAGE, A. S.; VARDUND, T.; Lund, V.; KAPPERUD, G., 1999. Detection of small numbers of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* cells in environmental water, sewage, and food samples by a seminested PCR assay. *Applied and Environmental Microbiology.* 87: 418-428pp.

WIRSEN C.; SIEVER S.; CAVANAUGH C; MOLYNEAUX C.; MOLYNEAUX S.; AHMAD A.; TAYLOR L., 2002. Characterization of an autotrophic sulfide-oxidizing marine *Arcobacter* species that produces filamentous sulfur. *Appl. Environm. Microbiol.* 2002. 68: 316 -325pp.

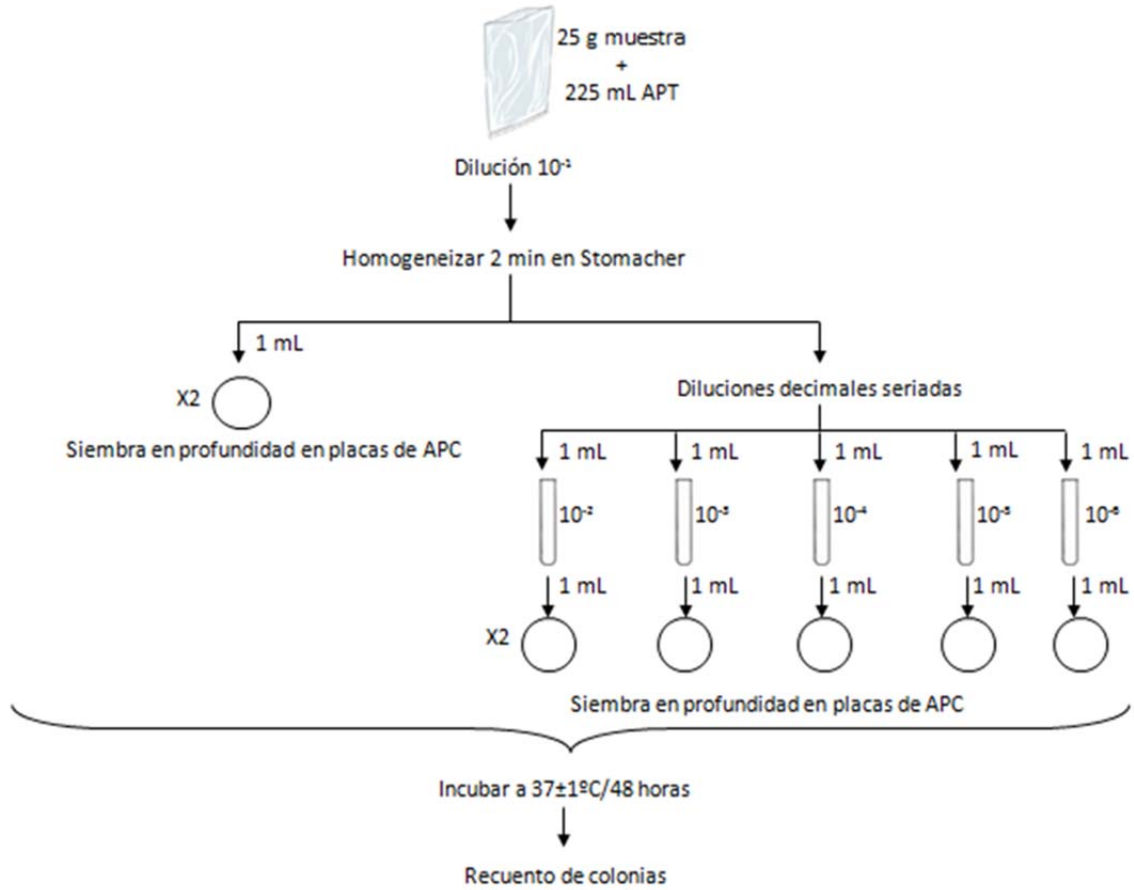
YAN, J.J.; KO W.C.; HUANG, A.H.; CHEN, H.M.; JIN, Y.T; WU, J.J., 2000. *Arcobacter butzleri* bacteremia in a patient with liver cirrhosis. *J Formos Med Assoc* 99, 166-169pp.

ZHAO, C.; GE, B.; VILLENA, J.; SUDLER, R.; YEH, E.; ZHAO, S.; WHITE, D. G.; WAGNER, D.; MENG, J., 2001. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* , and *Salmonella* Serovars in Retail Chicken, Turkey, Pork, and Beef from the Greater Washington, D.C., Area. *Applied and Environmental Microbiology.* 2001, 67(12):5431. DOI: 10.1128/AEM.67.12.5431-5436pp. Vol. 67, Nº. 12.

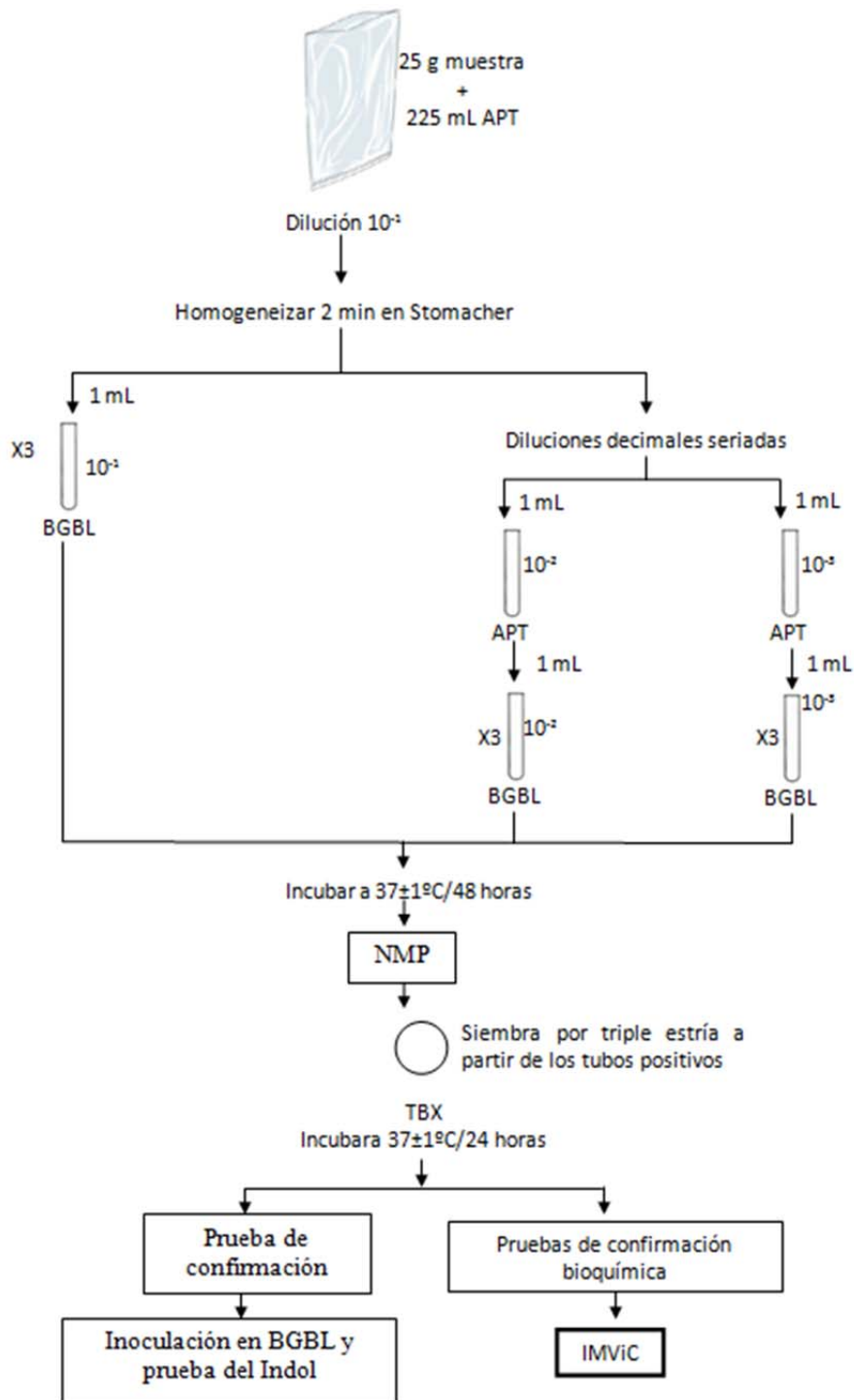
ZHAO, Y.; AARNINK, A.J.A.; GROOT KOERKAMP, P.W.G.; HAGENAARS. T.J., KATSMA, W.E.A.; De Jong, M.C.M., 2011. Detection of airborne *Campylobacter* with three bioaerosol samplers for alarming bacteria transmission in broilers. *Biol eng.* 2011; 3: 177–186pp.

VII. ANEJO I

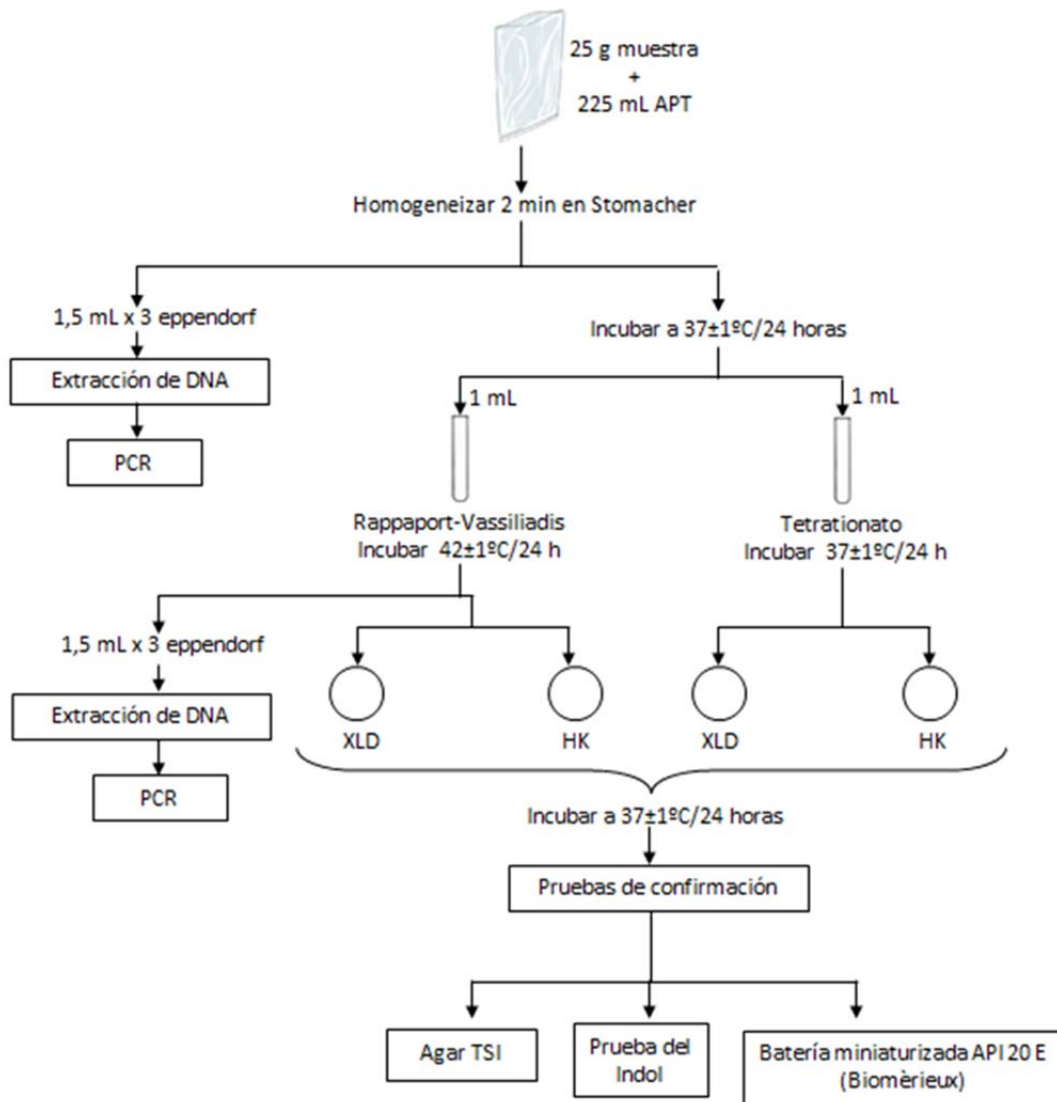
1. Esquema del método horizontal para el recuento de microorganismos: Recuento de colonias a 37°C mediante la técnica de siembra en profundidad (según la ISO 4833-1:2013)



2. Esquema del recuento de enterobacterias lactosa positivo (coliformes) y detección de *Escherichia coli* (Pascual y Calderón, 2000)



3. Esquema del método horizontal para la detección de *Salmonella* spp (según la norma ISO 6579:2002)



4. Esquema de la Identificación de *Arcobacter*

