

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 en alimentos.

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNA: LAURA VALCÁRCEL HERVÁS

TUTORA: MARIA ANTONIA FERRÚS PÉREZ

COTUTORA: ANA ISABEL JIMÉNEZ BELENGUER

Curso Académico: 2013/2014

VALENCIA, 30 DE JUNIO DE 2014

Licencia Creative Commons "Reconocimiento no Comercial –Sin Obra Derivada".



RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por microorganismos presentes en los alimentos son un problema de salud pública importante. Estos presentan toda clase de microorganismos patógenos y no patógenos, entre los que se encuentra las bacterias pertenecientes al género *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Arcobacter*, que se considera un patógeno emergente. Este estudio se centra en la investigación de la presencia de estas bacterias en muestras de carne picada de pollo presentes en el mercado y en la determinación de su calidad microbiológica.

Por otro lado, el abuso de antibióticos en ganadería es uno de los factores para el surgimiento de bacterias resistentes a estos compuestos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que si no se toman medidas, las bacterias resistentes no podrán ser tratadas con los agentes antibióticos comúnmente utilizados.

Esta problemática nos llevó a plantearnos una serie de objetivos en este estudio, entre ellos, realizar un muestreo en comercios de Valencia para determinar la contaminación de microorganismos indicadores, así como la posible presencia de patógenos, de acuerdo con la legislación española para este tipo de productos, estudiando concretamente la presencia de aerobios mesófilos, *Escherichia coli* y *Salmonella*. Se determinó también la presencia de patógenos emergentes del género *Arcobacter*. Los análisis se realizaron mediante el empleo de métodos culturales y, para el caso de *Arcobacter* y *Salmonella*, se emplearon técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), realizándose una comparativa de los resultados por ambas técnicas. Por último, para las cepas aisladas de *Escherichia coli*, se estudiaron las posibles resistencias microbianas frente a varios antibióticos mediante el método del antibiograma disco-placa.

De las 7 muestras analizadas en este trabajo, una de ellas (el 14,29%) dio un recuento inaceptable de aerobios mesófilos y en cuatro de ellas (el 57,14 %) se obtuvieron aislados de *Escherichia coli*. Todos ellos presentaron multiresistencia a antibióticos de uso habitual, observándose los porcentajes de resistencia más altos frente a Amoxicilina, Ampicilina, Ácido Nalidíxico, Ciprofloxacino y a Cefalotina. No se detectó *Salmonella* ni *Arcobacter* mediante métodos culturales. Para los análisis realizados mediante la técnica de PCR (Reacción de la Polimerasa en Cadena) se obtuvieron alícuotas directamente de la muestra homogenizada con un caldo de enriquecimiento selectivo y después de incubar el caldo durante 48 horas. Mediante esta técnica no se consiguió detectar ninguna bacteria del género *Arcobacter*, en cambio se detectó *Salmonella* en dos muestras (el 28,57%), tras la fase de enriquecimiento.

Palabras clave:

Arcobacter, *Salmonella*, Aerobios mesófilos, *Escherichia coli*, carne picada de pollo, métodos culturales, PCR.

Alumna: **Laura Valcárcel Hervás**

Tutora: **María Antonia Ferrús Pérez**

Cotutora: **Ana Isabel Jiménez Belenguer**

Valencia, 30 de Junio de 2014

SUMMARY

Diseases transmitted by microorganisms in food are an important public health problem. These have all kinds of microorganism pathogenic and non-pathogenic, between them include bacteria pertaining to the genus *Salmonella*, *Escherichia coli*, and *Arcobacter*, which is considered an emerging pathogen. This study is centred in the investigation of the presence of these bacteria in samples of minced meat of chicken in the market and the determination of its microbiological quality.

On the other hand, the antibiotic abuse in animal husbandry is a one of the factors for the sprouting of resistant bacteria to these compounds. The World Health Organization (WHO) estimates that if measures are not taken, resistant bacteria could not be treat with the antibiotic agents commonly used.

This problematic led us to raise a series of objectives in this study, among them, make a sampling in stores of Valencia to determine the contamination of indicator microorganisms, as well as the possible presence of pathogens, in agreement with the Spanish legislation for this type of products, studying concretely the presence of mesophilic aerobes, *Escherichia coli* and *Salmonella*. Also, was determined the presence of emergent pathogens of genus *Arcobacter*. The analyses were made by means of the use of cultural methods and, for the case of *Arcobacter* and *Salmonella*, was used molecular techniques like the Chain reaction of Polymerase (PCR), being made a comparative one of the results by both techniques. Finally, for the isolated of *Escherichia coli*, was studied the possible microbial resistance forehead to several antibiotics by means of the method of antibiogram dial-plate.

Of the 7 samples analyzed in this work, one of them (14.29%) gave an unacceptable count of mesófilos aerobes and in four of them (57.14%) they obtained isolated from *Escherichia coli*. All of them presented multiresistance to antibiotics commonly used, being observed the higher percentage of resistance front Amoxicilina, Ampicilina, Nalidíxico Acid, Ciprofloxacino and to Cefalotina. Was not detected *Salmonella* or *Arcobacter* by means of cultural methods. For the analyses made by PCR technique (Reaction of the Polymerase in Chain) they were obtained directly aliquot from the sample homogenised with a broth of selective enrichment and after incubating the broth during 48 hours. By means of this technique one was not able to detect no bacterium of the *Arcobacter* genus, however *Salmonella* was detected in two samples (28.57%), after the phase of enrichment.

Keywords:

Arcobacter, *Salmonella*, mesophilic aerobes, *Escherichia coli*, minced meat of chicken, cultural methods, PCR.

Alumna: **Laura Valcárcel Hervás**

Tutora: **María Antonia Ferrús Pérez**

Cotutora: **Ana Isabel Jiménez Belenguer**

Valencia, 30 de Junio de 2014

AUTORIZACIÓN

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por los esfuerzos que han hecho siempre por entregarme lo mejor, por haberme apoyado en todo momento y haber tenido paciencia conmigo en este tiempo en el que he sido difícil de tratar. A mi madre por haberse preocupado por mí, animarme y tranquilizarme cuando estaba bloqueada y haberme hecho las cosas más fáciles en casa durante este tiempo. A mi padre por tener confianza ciega en mi y en mis capacidades siempre y hacerme sentir especial en todo momento. A David por estar a mi lado siempre, por su ayuda, ánimo, cariño, por escucharme y por su apoyo incondicional, ¡Muchas gracias!

A todas las personas pertenecientes al laboratorio de Microbiología por haberme hecho sentir cómoda y a gusto desde el primer momento y por entregarme las herramientas necesarias para llevar a cabo este trabajo.

A María Antonia por brindarme la oportunidad para realizar este trabajo, haberme recibido siempre con una sonrisa, por guiarme y ayudarme. A Ana González porque pese a no ser tutora o cotutora mía, siempre me recibió y ayudo cuando la necesite y puso mucha dedicación y cariño en mi trabajo. A Ana Jiménez por su apoyo, preocupación, dedicación y por haber hecho siempre un hueco para mí aún teniendo muchas cosas más que hacer. Ellas tres son parte de este trabajo el cuál no sería lo que es si no me hubieran ayudado y me hubieran exigido, cuando me tenían que exigir, para sacar lo mejor de mí.

A Lara por compartir conmigo esta experiencia, por compartir las emociones y las alegrías, y por ser mi amiga y compañera incondicional, no solo durante este proceso, sino durante toda la carrera.

A todos, muchísimas gracias porque de alguna u otra manera fuisteis importantes para mí durante todo este tiempo.

¡Muchas gracias!

ÍNDICES

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1. CARNE DE POLLO | 1 |
| - 1.1.MICROBIOTA CARÁCTERÍSTICA..... | 1 |
| - 1.2 PROBLEMAS MICROBIOLÓGICOS | 2 |
| - 1.3. CARNE PICADA DE POLLO | 3 |
| - 1.4 NORMAS MICROBIOLÓGICAS | 3 |
| 2. MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS..... | 4 |
| 3. <i>Escherichia coli</i>..... | 5 |
| - 3. 1. ANTECEDENTES Y SITUACIÓN TAXONÓMICA ACTUAL..... | 5 |
| - 3.2 ESTRUCTURA ANTIGÉNICA. | 5 |
| - 3. 3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS..... | 6 |
| - 3.4. PARÁMETROS DE CRECIMIENTO | 6 |
| - 3.5. PATOGENIA Y SIGNOS CLÍNICOS..... | 6 |
| - 3.6. <i>Escherichia coli</i> EN ALIMENTOS..... | 8 |
| 4. <i>Salmonella</i>..... | 8 |
| - 4.1. ANTECEDENTES Y SITUACIÓN TAXONÓMICA ACTUAL..... | 8 |
| - 4. 2. ESTRUCTURA ANTIGÉNICA. LOS SEROTIPOS | 8 |
| - 4.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS..... | 9 |
| - 4.4. PARÁMETROS DE CRECIMIENTO | 9 |
| - 4. 5. PATOGENIA Y SIGNOS CLÍNICOS..... | 9 |
| - 4.6. <i>Salmonella</i> EN ALIMENTOS..... | 11 |
| 5. <i>Arcobacter</i> | 11 |
| - 5. 1. ANTECEDENTES Y SITUACIÓN TAXONÓMICA ACTUAL..... | 11 |
| - 5. 2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS..... | 12 |
| - 5.3. PATOGENIA Y SIGNOS CLÍNICOS..... | 13 |
| - 5.4. <i>Arcobacter</i> EN ALIMENTOS..... | 13 |
| 6. RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS | 14 |
| 7. TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS | 15 |
| - 7.1. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) | 15 |
| II.OBJETIVOS | 17 |
| III. MATERIAL Y METODOS | 18 |
| 1. ORIGEN DE LAS MUESTRAS | 18 |

| | |
|--|-----------|
| 2. ESTUDIO DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA | 18 |
| - 2.1. Toma de muestras | 18 |
| - 2.2. Análisis microbiológico de aerobios mesófilos | 18 |
| - 2.3. Recuento de enterobacterias lactosa positivo (coliformes totales) y detección de <i>Escherichia coli</i> | 19 |
| - 2.3.1. Conservación de los aislados de <i>E.coli</i> | 19 |
| - 2.4. Análisis microbiológico de <i>Salmonella spp.</i> | 19 |
| - 2.5. Análisis microbiológico de <i>Arcobacter spp.</i> | 20 |
| 3. ESTUDIO DE LAS RESISTENCIAS ANTIMICROBIANAS DE <i>Escherichia coli</i>..... | 21 |
| - 3.1. Método del antibiograma disco- placa..... | 22 |
| 4. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN MEDIANTE PCR | 23 |
| - 4.1 Aislamiento del DNA cromosómico..... | 23 |
| - 4.2 Detección e identificación de <i>Salmonella spp.</i> | 23 |
| - 4.3 Detección e identificación de <i>Arcobacter spp.</i> | 24 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 25 |
| 1. RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS..... | 25 |
| 2. <i>Escherichia coli</i>..... | 25 |
| - 2.1 Recuento de enterobacterias mediante la técnica del Número Más Probable..... | 25 |
| - 2.2 .Detección de <i>E.coli</i> | 26 |
| - 2.3. Estudio de la resistencia a antimicrobianos. | 27 |
| 3. <i>Salmonellas spp.</i> | 30 |
| - 3.1. Detección por cultivo..... | 30 |
| - 3. 2. Detección por PCR | 31 |
| 4. <i>Arcobacter spp.</i>..... | 32 |
| - 4.1. Detección por cultivo..... | 32 |
| - 4.2. Detección por PCR | 33 |
| V. CONCLUSIONES..... | 35 |
| VI. BIBLIOGRAFÍA | 36 |
| ANEJOS | 41 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Criterios microbiológicos para carne picada | 4 |
| Tabla 2: Clasificación taxonómica del género <i>Arcobacter</i> | 12 |
| Tabla 3. Origen de las muestras de carne de pollo | 18 |
| Tabla 4. Antibióticos utilizados en el trabajo y su clasificación | 22 |
| Tabla 5. Antimicrobianos y concentración de uso en el estudio de sensibilidad. | 22 |
| Tabla 6. Reactivos empleados en la PCR de <i>Salmonella spp.</i> | 23 |
| Tabla 7: Programa de temperaturas utilizadas en la PCR de <i>Salmonella spp.</i> | 23 |
| Tabla 8. Reactivos empleados en la PCR de <i>Arcobacter spp.</i> | 24 |
| Tabla 9: Programa de temperaturas utilizadas en la PCR de <i>Arcobacter</i> | 24 |
| Tabla 10. Resultados del recuento de aerobios mesófilos en las muestras. | 25 |
| Tabla 11. Resultados del recuento de enterobacterias mediante la técnica del Número Más Probable. | 26 |
| Tabla 12. Detección por cultivo de <i>Escherichia coli</i> | 26 |
| Tabla 13. Diámetro de los halos de inhibición a los 12 antibióticos de estudio por aislado..... | 28 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Resultado positivo en prueba IMViC para <i>Escherichia coli</i> | 27 |
| Figura 2. Aislados de <i>Escherichia coli</i> agrupadas según el nivel de resistencia frente a los antibióticos de estudio..... | 28 |
| Figura 3. Halos de sensibilidad frente a los distintos antibióticos ensayados en la Cepa D..... | 29 |
| Figura 4. Detección de <i>Salmonella</i> mediante PCR: muestra 1 a la muestra 4 a distintos tiempos. | 31 |
| Figura 5. Detección de <i>Arcobacter</i> mediante PCR: muestra 4 a la muestra 7 a distintos tiempos. | 33 |

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

UE : Unión Europea
MAGRAMA : Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio ambiente
BES: Boletín Epidemiológico Semanal
OMS: Organización Mundial de la Salud
EFSA: European Food Safety Authority
CLSI: Clinical Laboratory Standards
a_w : Actividad del agua
UFC: Unidades Formadoras de Colonias
EPEC: *E. coli* enteropatógeno
EIEC: *E. coli* enteroinvasivo
ETEC: *E. coli* enterotoxigénico
EHEC: *E. coli* enterohemorrágico
BLEE: “espectro extendido beta-lactamasas”
ADN: ácido desoxirribonucleico
PCR: Reacción de la Polimerasa en Cadena
CN: Gentamicina
AK: Amikacina
AMC: Amoxicilina
E: Eritromicina
AMP: Ampicilina
NAL: Ác.nalidíxico
C: Cloranfenicol
KF: Cefalotina
CIP: Ciprofloxacino
CRO: Ceftriaxona
TE: Tetraciclina
K: Kanamicina
APT: Agua de peptona tamponada
AB: *Arcobacter* Broth
CAT: Cefoperazona, Anfotericina-B, teicoplanina
PCA: Plate Count Agar
NMP: Número más Probable
BGBL: Caldo lactosado verde brillante
TBX: Triptona bilis X-glucurónido
XLD: Agar Xilosa-Lisina Desoxicolato
HK: Agar Hektoen
TSI: Agar hierro tres azúcares
IMViC: Indol, Rojo de metilo, Vogler Proskauer, Citrato de Simmons
pb: pares de bases
µg: microgramo
µM: micromolar
mM: milimolar

ÍNTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. CARNE DE POLLO

El sector avícola es uno de los principales motores económicos de la ganadería española con una producción de 1.369.628 toneladas en el año 2013 (un 1,06% por debajo del año anterior), de las cuales un 82 por ciento corresponde a la producción de carne de pollo.

La importancia de la carne de pollo radica en su condición de alimento básico y fuente económica y sana de proteína. Es la segunda carne más consumida, sólo por detrás de la carne de cerdo, y la primera si se considera el consumo en fresco. España se mantiene como el tercer productor comunitario de pollo, con una producción que asciende al 11,6% del total producido en la UE, y como el cuarto productor de carne de ave, con una producción del 11,1% del total producido en la UE (MAGRAMA, 2014)

Sin embargo, la presencia de los patógenos y microorganismos alterantes en la carne de volatería y sus subproductos genera una preocupación significativa para proveedores, consumidores e inspectores de Sanidad Pública por todo el mundo. La contaminación microbiológica de estos productos es indeseable, pero inevitable, y depende del nivel microbiológico de la materia prima, las prácticas higiénicas durante la manipulación y el tiempo y la temperatura de almacenaje (Alvaréz y col., 2002).

La composición química de la carne de ave también influye notablemente en el crecimiento de toda clase de bacterias y muy especialmente de las productoras de alteración. Es un medio inmejorable para el crecimiento microbiano debido a que es una buena fuente de proteínas (21-25%), vitaminas (tiamina, niacina y riboflavina) y sales minerales. Es debido a este motivo por el que la microbiota de alteración de la carne es sobretodo proteolítica. El pH de 6,2-6,4 tras el sacrificio del animal y la actividad de agua de este producto de 0,98-0,99 también favorecen el crecimiento de microbiota alterante (Pascual y Calderón y, 2000).

1.1. MICROBIOTA CARÁCTERÍSTICA

En el matadero la contaminación tiende a propagarse debido a la contaminación cruzada entre aves vivas y canales, una temperatura insuficiente en el tanque de escaldado, los dedos de goma de la máquina desplumadora, la forma de evisceración, la conservación de la piel y un inadecuado enfriamiento final (Pascual y Calderón, 2000). La microbiota característica se divide en microbiota psicrótrófa, susceptible de intervenir negativamente en la conservación y en la microbiota patógena, capaz de ocasionar problemas de salud pública (Bourgeois y col., 1994).

La carne de pollo se considera un tipo de carne enfriada debido a que la última etapa de su procesado en el matadero es el enfriamiento, por este motivo la microbiota que predomina es la psicotrófica, como las *Pseudomonas* que pueden ser observadas por medio de fluorescencias que se dan en fases avanzadas de alteración, en comparación a otras bacterias como *Acinetobacter sp.* (presente en la piel de las aves), *Alteromonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes* y *Moraxella* (presente en las plumas). Las *Pseudomonas* representan más del 70% de la microbiota contaminante que causa alteraciones en la carne de pollo, es por esto por lo que son los microorganismos indicadores responsables de su deterioro. Producen un olor

putrefacto y característico con niveles superiores de 10^7 UFC/cm² y aparece un limo viscoso “slime” en la superficie de las canales cuando los niveles son superiores a 10^8 UFC/cm².

El alimento puede durar hasta 12 días cuando la carga inicial es de 10^3 microorganismos por gramo, no obstante cuando la carga inicial es de 10^5 microorganismos por gramo, el alimento comienza a mostrar signos de alteración a los 6 días aproximadamente. Cuando la canal se mantiene en refrigeración a 0°C y tiene una carga microbiana inicial baja podría mantenerse sin mostrar alteración durante 14-16 días; a 5° C se altera a los 6-7 días y a 10°C presenta mal olor y limo en la superficie en 3 días (Pascual y Calderón, 2000).

En cuanto a la microbiota patógena, la carne de pollo es una de las mayores fuentes de toxiinfección en el hombre. Esta carne ha sido la principal alimento implicada en brotes producidos por *Salmonella* (BES, 2013). También se han aislado cepas de *Clostridium perfringens* y *St. Aureus* enterotoxigénico; algunas enfermedades entéricas están provocadas por cepas de *E.coli* enteropatógeno, *Yersinia* enterocolítica y *Campylobacter jejuni/coli*.

Salmonella procedente de la carne de pollo es en algunos países la causa predominante entre las toxifecciones alimentarias, con 91.034 casos confirmados de salmonelosis en 2012 en Europa (BES, 2014). Estas bacterias parecen proceder del ambiente donde viven, de los piensos o de sus condiciones de vida cuando se crían de forma intensiva. Así mismo, *Clostridium perfringens* una bacteria muy extendida en la naturaleza que se encuentra en el ambiente, en la microbiota intestinal de mamíferos y aves y en la piel. *St. Aureus* enterotoxigénico se introduce en el matadero a través de las aves vivas que llevan la portan en sus plumas, fosas nasales, patas, etc., sin embargo, la probabilidad de intoxicación por esta bacteria es inferior a la producida por *Salmonella* y *Clostridium perfringens*. (Pascual y Calderón, 2000).

1.2 PROBLEMAS MICROBIOLÓGICOS

Para comprender mejor los problemas microbiológicos que pueden darse en estos productos es conveniente considerar por separado las canales enteras y los productos transformados.

1.2.1 Canales enteras

El crecimiento microbiano se produce siempre a partir de la piel ya que actúa de barrera a la penetración de microorganismos. Sólo después de un cierto tiempo de almacenamiento los microorganismos invaden el músculo. Es por esta razón por la que las muestras para el análisis microbiológico se suelen tomar normalmente de la superficie de la piel.

Los factores que intervienen de forma directa en el desarrollo de un tipo u otro de microorganismo son la estructura de la piel y su grado de madurez. Así se demostró que las *Pseudomonas* sp. se desarrollan mejor en pieles de aves que han sufrido escaldado a 59°C que las que no y que las bacterias del género *Achromobacter* lo hacían mejor sobre pieles no escaldadas. También interviene el descenso de pH que se produce para que crezcan unos u otros microorganismos. Las aves enteras suelen dar recuentos microbianos más bajos que las troceadas (Adams y Moss, 1997).

1.2.2 Productos transformados

En estos productos la responsable al menos en parte de su estado microbiológico es la evolución microbiológica de las canales. Por otra parte, también van a intervenir en la

microbiología de estos productos, además de las técnicas de transformación, la higiene de los manipuladores, el acondicionamiento o envasado y las condiciones de almacenamiento.

Las reglas de higiene y el mantenimiento de la cadena de frío deberá de ser más estricto cuanto más dividido sea el producto ya que será menos estable (Adams y Moss, 1997).

1.3. CARNE PICADA DE POLLO

Según el REGLAMENTO (CE) Nº 853/2004 la “carne picada” se definiría como la carne deshuesada que ha sido sometida a una operación de picado en trozos y que contiene menos de 1% de sal (BOE, 2004).

Durante el picado de la carne, se liberan los constituyentes y líquidos celulares que contiene resultando ser una fuente nutritiva óptima para los microorganismos; es por este motivo por el que la contaminación microbiana producida en la carne picada es mucho mayor. Además, con el picado, se incrementa 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.

El tipo de microorganismo varía en función de los tratamientos y de las condiciones que recibe el producto, así, los microorganismos psicrótrofos como *Pseudomonas* crecerán sobre todo en productos que no contienen 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 cambio, en los demás productos aparecerán microorganismos capaces de crecer a valores más bajos de a_w como los micrococcos y las bacterias lácticas. Si la carga inicial bacteriana del producto es alta, el alimento se deteriorará más rápidamente durante su almacenamiento, lo que provocará un recuento que supere las 10^8 UFC/g a las 24 horas, dando olores desagradables.

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 que se vaya a realizar 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).

1.4 NORMAS MICROBIOLÓGICAS

Las normas microbiológicas para la carne picada de pollo se encuentran en el REGLAMENTO (CE) Nº 1441/2007. Habría que distinguir entre los criterios de seguridad alimentaria y los criterios de higiene de procesos (Tabla 1)

Tabla 1. Criterios microbiológicos para carne picada

| | Criterios de seguridad alimentaria | Criterios de higiene de los procesos | |
|---|---|--|-----------------------------------|
| Parámetro | <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 carne de aves de corral destinada a ser consumida cocinada | Carne picada | Carne picada |
| Criterio microbiológico | Desde 1.1.2010: n=5, c=0, m=Ausencia en 25 g, M=Ausencia en 25 g | 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 |
| <p>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.</p> | | | |

La norma establecida para el análisis de *Salmonella* se aplicaría en los productos comercializados durante su vida útil considerándose un resultado satisfactorio si todos los valores observados indican ausencia de la bacteria e insatisfactorio, si se detecta la presencia de la bacteria en cualquiera de las muestras.

Por otro lado, la norma establecida para el análisis de aerobios mesófilos y *Escherichia coli* se aplicaría en la fase final del proceso de fabricación de estos productos considerándose un resultado satisfactorio si todos los valores observados son $\leq m$, aceptable si un máximos de c/n valores se encuentran entre m y M y el resto de los valores observados son $\leq m$ e insatisfactorio si uno o varios valores son $> M$ o más de c/n valores se encuentran entre m y M. En caso de que el resultado fuera insatisfactorio se aplicarían mejoras en la higiene de la producción y mejoras en la selección y/o el origen de las materias primas (BOE, 2007).

2. MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS

Los microorganismos aerobios mesófilos son los que pueden formar colonias visibles (o enturbiamiento) a temperaturas entre 20°C a 45°C en aerobiosis con un óptimo de crecimiento a 31±1°C (Pascual Anderson, 1989). Estos microorganismos tienen unas tasas de crecimiento elevadas y su duración de proliferación es relativamente corta (de 1 a varios días para alcanzar la fase estacionaria). Su determinación permite conocer la calidad sanitaria de los productos analizados, las condiciones higiénicas de la materia prima y la forma de cómo fueron manipulados estos alimentos durante su elaboración. En general, el recuento de la microbiota aerobio mesófila es una prueba para conocer las condiciones de salubridad de algunos alimentos.

Cuando se realiza un recuento de dichos microorganismos en un determinado alimento se estima la microbiota total contenida en él sin especificar los tipos de microorganismos que contiene (Pascual y Calderón, 2000), pudiendo ser especies saprofitas o patógenas para el hombre y los animales, aunque la mayor parte de ellas son saprofitas (Bourgeois y col., 1994). Es por esto por lo que este método tiene un valor limitado como indicador de la presencia de

patógenos o sus toxinas ya que un recuento total de aerobios mesófilos bajo no asegura que un alimento esté exento de patógenos o sus toxinas; tampoco un recuento total alto significa por tanto que haya presencia de microbiota patógena (Pascual y Calderón, 2000), aun que habitualmente si se dan cifras altas pueden dar lugar a enfermedades y por tanto este alimento se consideraría impropio para el consumo humano (Pascual Anderson, 1989).

En general para la mayor parte de los alimentos, a excepción de los productos que se elaboran por fermentación, recuentos microbianos altos se consideran poco aconsejables debido a la gran variedad de significados que esto puede conllevar:

- Materia prima excesivamente contaminada
- Deficientes métodos de manipulación durante la elaboración de los productos.
- La posibilidad, por tratarse de microorganismos mesófilos, de que entre ellos pueda haber patógenos dado que esta microbiota suele ser mesófila.
- Altos recuentos suelen ser signo de inmediata alteración del producto. Tasas superiores a 10^6 – 10^7 microorganismos por gramo suelen ser ya inicio de descomposición (Pascual y Calderón, 2000).

3. *Escherichia coli*

3. 1. ANTECEDENTES Y SITUACIÓN TAXONÓMICA ACTUAL

En 1885, el bacteriólogo alemán Theodor Escherich aisló por primera vez en heces de niños con enteritis la bacteria *Escherichia coli* (Pascual Anderson, 1989). Este microorganismo es un anaerobio facultativo el cual es un habitante casi universal de la microbiota del intestino de los animales de sangre caliente y las personas. Debido a su presencia habitual en heces, a sus características de supervivencia, a su facilidad para ser cultivado y a su carácter generalmente no patógeno, *Escherichia coli* fue considerado como indicador de contaminación fecal y de posible presencia de patógenos entéricos en agua.

A principios de la década de los 40 en Inglaterra se identificaron por primera vez algunas cepas de *E. coli* como causantes de gastroenteritis en niños. Hasta 1982, las cepas productoras de diarrea fueron clasificadas en tres tipos según su grado de virulencia: *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* enteroinvasor (EIEC) y *E. coli* enterotoxigénico (ETEC). Esas cepas no suelen representar un peligro en los países desarrollados pero en los países menos desarrollados son una causa importante de diarrea en niños. No obstante en 1982 se identificó al serotipo O157:H7 de *E.coli* enterohemorrágico (EHEC) como el causante de algunos brotes de colitis hemorrágica y del síndrome urémico hemolítico como consecuencia de la ingesta de carne picada insuficientemente cocinada y leche fresca. Se ha descrito un quinto tipo de *E. coli* enteroadherente el cual se adhiere a las células Hep-2, no obstante su implicación como causa de diarrea es dudosa. (Adams y Moss, 1997)

E.coli, según la clasificación de Bergey pertenece a la familia de las *Enterobacteriaceae*, al género *Escherichia* y a la especie *Escherichia coli* (Pascual Anderson, 1989).

3.2 ESTRUCTURA ANTIGÉNICA.

En 1945, Kauffmann propuso un esquema de serotipado para *E.coli* basado en los antígenos somático (O) de naturaleza polisacárida, flagelar (H) y capsular (K). En la actualidad estos antígenos son de aplicación en el sistema O:H, 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.

3. 3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS

Esta especie bacteriana está integrada por microorganismos de forma bacilar, Gram-negativo, catalasa positivo, oxidasa negativo, no esporógeno, raramente capsulados y casi siempre móviles.

E.coli fermenta la lactosa con producción de ácido y gas en el transcurso de 24 a 48 horas, aunque, hay cepas que fermentan la lactosa lentamente o que no la fermentan y que además son inmóviles y bioquímicamente inertes. (Adams y Moss, 1997). Esta bacteria es normalmente ureasa negativo, sin embargo, algunas cepas aisladas de enteritis infantil se han manifestado como ureasa-positivas. También se han encontrado cepas SH₂ positivas cuando la mayoría son SH₂ negativas. Otro tanto ocurre con la β-galactosidasa, que siendo reacción normalmente positiva, han aparecido algunas cepas responsables de enteritis que han dado esta reacción negativa (Pascual Anderson, 1989). El perfil IMViC de *Escherichia coli* es Indol positivo, rojo de metilo positivo, Vogler Proskauer negativo, citrato de Simmons negativo (Pascual y Calderón, 2000).

3.4. PARÁMETROS DE CRECIMIENTO

E. coli es un organismo mesófilo que crece a temperaturas entre 7-10 °C hasta 50°C, con una temperatura óptima en torno a 37 °C, no obstante ocurre que muchas de sus reacciones bioquímicas funcionan mejor a 44°C que a 37°C (Pascual Anderson, 1989). El calor los destruye a 60°C en 15 minutos y a 55 °C en 1 hora (Adams y Moss, 1997), aunque ha habido referencias de algunas cepas ETEC que crecieron a temperaturas en torno a los 4°C (Pascual Anderson, 1989). Un pH casi neutro sería óptimo para su crecimiento aunque puede crecer a pH inferior a 4,4 si las demás condiciones del medio están en las condiciones óptimas. Su actividad del agua (a_w) mínima para su crecimiento es de 0,95 (Adams y Moss, 1997).

3.5. PATOGENIA Y SIGNOS CLÍNICOS

E.coli forma parte de la microbiota habitual del intestino grueso de los mamíferos, entre ellos el hombre por lo que se puede encontrar en heces. De este hecho se dedujo que podían existir cepas patógenas y no patógenas de *E.coli*. Las cepas patógenas se han asociado con diarreas infantiles, aunque no son infrecuentes las diarreas ocasionadas por estas cepas en adultos (Pascual Anderson, 1989).

Las cepas de *E.coli* productoras de diarrea se agrupan basándose en las diferentes propiedades de virulencia codificadas por plásmidos:

3.5.1. *E.coli* enterotoxigénico (ETEC)

La enfermedad causada por ETEC se suele presentar transcurridas de 12 a 36 horas después de la ingestión de la bacteria y los síntomas que se producen pueden variar desde una ligera diarrea afebril hasta un síndrome grave parecido al cólera, con heces acuosas sin sangre ni

moco, dolores de estómago y vómitos. La enfermedad suele ser autolimitante, no durando más de 2 a 3 días, aunque en los países subdesarrollados es causa corriente de diarrea en niños los que les puede causar una deshidratación grave (Adams y Moss, 1997). Produce una diarrea profusa con pérdida excesiva de líquido y electrolitos en el intestino.

3.5.2. *E.coli* enteropatógeno (EPEC)

Originan una enfermedad semejante a la producida por las cepas de *E.coli* enterotoxigénico. La enfermedad es más corriente en países tropicales con medios de vida y prácticas de higiene más limitadas (Pascual Anderson, 1989). Los síntomas de la infección causada por EPEC son malestar, vómitos y diarrea con deposiciones que contienen moco pero rara vez sangre. Estos síntomas aparecen a las 12-36 horas después de la ingestión del organismo y en niños la infección es más grave que otras infecciones diarreicas pudiendo persistir hasta dos semanas (Adams y Moss, 1997).

3.5.3. *E.coli* enteroinvasivo (EIEC)

La infección por EIEC origina los síntomas clásicos relacionados con una disentería bacilar invasora normalmente asociada con *Shigella*. EIEC invade las células epiteliales del colon y se multiplica en su interior causando ulceración e inflamación. Los signos clínicos son fiebre, dolores abdominales intensos, malestar y con frecuencia una diarrea acuosa con heces con sangre, moco y leucocitos fecales (Adams y Moss, 1997). La enfermedad afecta tanto a niños como a adultos y su periodo de incubación oscila entre 12 a 72 horas (Pascual Anderson, 1989).

3.5.4. *E.coli* enterohemorrágico (EHEC)

Estas cepas son capaces de provocar diarreas, sin embargo, el serotipo O157:H7 es el que se aísla con mayor frecuencia en personas. Este serotipo ha llamado la atención puesto que la enfermedad que produce es más corriente que en el caso de otras cepas productoras de diarrea y también porque es capaz de producir enfermedades que ponen en riesgo la vida como son la colitis hemorrágica, el síndrome urémico hemolítico y la púrpura trombótica-trombocitopénica. La colitis hemorrágica es una diarrea aguda, sanguinolenta y autolimitante que empieza con retortijones de estómago y diarrea acuosa después de un periodo de incubación de 3 a 8 días. Se puede diferenciar de la colitis inflamatoria por la falta de fiebre y por la ausencia de leucocitos en las heces. Afecta principalmente a personas adultas. El síndrome urémico hemolítico se caracteriza por una insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica (reducción del número de glóbulos rojos) y trombocitopenia (descenso del número de plaquetas sanguíneas) en ocasiones precedida de una diarrea sanguinolenta. Es más corriente en niños. La púrpura trombótica trombocitopénica está relacionada con el síndrome urémico hemolítico pero incluye fiebre y síntomas nerviosos (Adams y Moss, 1997).

Durante el año 2012 se notificaron 5.671 casos de enfermedades producidas por este serotipo, un 40% menos con respecto al año anterior (9.485 casos en 2011). El número de casos tan elevado en el año 2011 se debió a un gran brote que se produjo en Alemania y Francia asociado al consumo de semillas germinadas, por la cepa O104:H4. Sin embargo, aun eliminando los datos de 2011, la tendencia para el periodo 2008-2012 es creciente. En relación a los alimentos en los que se encuentra esta bacteria, está mayoritariamente asociada a la carne y al ganado vacuno. España notificó 31 casos confirmados en 2012; tasa de 0,07 frente a

1,15 de la UE. La tendencia en España, al igual que en la UE, es de aumento los últimos años (BES, 2014).

3.6. *Escherichia coli* EN ALIMENTOS

Actualmente la investigación de los *E.coli* patógenos en alimentos es un problema ya que no existen medios selectivos capaces de diferenciar entre las distintas cepas (Pascual Anderson, 1989).

La contaminación fecal de las redes de abastecimiento de las aguas y la contaminación de los alimentos por parte de sus manipuladores, han sido muy frecuentemente implicados en diversos brotes de enfermedad causados por EPEC, EIEC y ETEC. Han sido implicados varios alimentos entre los que se incluyen un sustitutivo del café en Rumania en 1961, las hortalizas, las ensaladas de patata y el sushi. En 1971, en Estados Unidos, aparecieron brotes de enfermedad de EIEC y ETEC en quesos blandos madurados por mohos. Los brotes causados por el serotipo O157:H7 han implicado principalmente a la carne picada insuficientemente cocinada y a la leche fresca (Adams y Moss, 1997).

4. *Salmonella*

4.1. ANTECEDENTES Y SITUACIÓN TAXONÓMICA ACTUAL

Este género bacteriano pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. La mayoría de estas bacterias son consideradas patógenas para el hombre, no obstante la enfermedad causada por la especie del género *Salmonella* tifoidea es la más grave y fue la primera infección por *Salmonella* descrita de un modo fiable. Lignières en 1900 propuso el género *Salmonella* denominándolo así en honor de D.E. Salmon, el patólogo veterinario americano que describió por primera vez *Salmonella cholerae-suis* (Adams y Moss, 1997).

Se conocen 2.523 serotipos diferentes de *Salmonella*, todos ellos identificados hasta el año 2008 (BES, 2009) y en el año 2013 la OMS informa de que existen más de 2500 serotipos confirmados, que en su gran mayoría no muestran una asociación específica con algún huésped en particular. Están muy distribuidos en la naturaleza a través de materias fecales. Las enfermedades producidas por las distintas especies de *Salmonella* se denominan salmonelosis y afectan tanto a hombres como a animales. Los serotipos más frecuentes en la salmonelosis humana son *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. agona*, *S. infantis*, *S. heidelberg*, *S. panamá* y *S. newport*. (Pascual Anderson, 1989)

4. 2. ESTRUCTURA ANTIGÉNICA. LOS SEROTIPOS

Salmonella puede diferenciarse en serotipos en función de las estructuras antigénicas de sus cepas. Se distinguen (C.M. Bourgeois y col., 1994):

- **Antígeno somático (O)**. Se encuentra situado en la pared bacteriana y es de naturaleza glúcido-lípida-polipeptídica. Es termoestable ya que es capaz de resistir a 100°C durante 2 horas y también es estable al alcohol (Pascual Anderson, 1989). Su aglutinabilidad con sus anticuerpos homólogos es lenta, granular y difícil de disociar (C.M. Bourgeois y col., 1994). Interviene en el poder patógeno del germen.
- **Antígeno flagelar (H)**. Se encuentra situado en los flagelos de las formas móviles (Pascual Anderson, 1989). Son antígenos constituidos por una proteína, la flagelina

(C.M. Bourgeois y col., 1994). Es termolábil ya que no es capaz de resistir a 100°C durante 2 horas y también es inestable al alcohol. Su aglutinabilidad con sus anticuerpos correspondientes es rápida dando lugar a flóculos que se disgregan fácilmente (Pascual Anderson, 1989).

- **Antígenos “de la cubierta” (K).** El único de este tipo que se reconoce en *Salmonella* es el antígeno Vi (de virulencia) que existe en la *S.typhi*, *S.paratyphi C* y *S.dublin* (C.M. Bourgeois y col., 1994). Este antígeno rodea a la pared bacteriana más o menos completamente. Este antígeno hace imposible la aglutinación de los antígenos somáticos (O) que se encuentran por debajo por lo que para poder determinar la presencia de los antígenos (O) es necesario destruir previamente los antígenos Vi por calentamiento. El antígeno Vi aglutina lentamente y la aglutinación que produce es fina y granular (Pascual Anderson, 1989).

4.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS

El género *Salmonella* está constituido por bacilos Gram negativos no esporulados, de 1-3 x 0,4-0,6 micras. Con la excepción de especies mutantes inmóviles y otras como *S. pullorum* y *S. gallinarum*, son móviles gracias a sus flagelos peritricos (Pascual Anderson, 1989). Son aerobios y anaerobios facultativos, catalasa-positivos, citocromo-oxidasa-negativos, reducen los nitritos a nitratos y, a menudo, producen gas durante la fermentación de la D-glucosa o de otros hidratos de carbono (C.M. Bourgeois y col., 1994). No fermentan la lactosa, excepto *Salmonella choleraesuis* subespecie *arizonae* y *Salmonella choleraesuis* subespecie *diarizonae* (Aguilar Y Escolástica, 2003). No fermentan la sacarosa ni el manitol, no producen indol, no degradan la urea, descarboxilan los aminoácidos Lisina y Ornitina. No crecen en presencia de kanamicina (C.M. Bourgeois y col., 1994).

4.4. PARÁMETROS DE CRECIMIENTO

Los parámetros de crecimiento condicionarán el crecimiento de *Salmonella*. Estos son principalmente temperatura, pH, la actividad del agua o el nivel de nutrientes.

Esta bacteria crece a una temperatura ambiente pero su desarrollo óptimo se produce en un rango de temperaturas comprendido entre 35-37°C. Sin embargo puede crecer desde los 5°C hasta los 45°C, teniendo en cuenta que por debajo de los 10°C sufre una disminución considerable (Pascual, 2005). Una temperatura de 60°C durante el almacenamiento ofrecerá un amplio margen de seguridad por la inhibición efectiva de esta bacteria (D'Aoust, 1989). El pH óptimo para el crecimiento de *Salmonella* está entre 4,5 y 9 con un pH óptimo de 6,5 a 7,5 (Pascual, 2005). *Salmonella* se desarrolla bien a valores de a_w de 0,945 a 0,999. La actividad de agua mínima para que se produzca crecimiento es de 0,93 a 0,95 aproximadamente (Frazier y Westhoff, 1993).

4. 5. PATOGENIA Y SIGNOS CLÍNICOS

La salmonelosis implica varios tipos de infección y de acuerdo a sus propiedades patógenas se podría clasificar en *Salmonella* patógenas para el hombre productoras de fiebre tifoidea y fiebres paratíficas, *Salmonella* patógenas para los animales y *Salmonella* sin huésped específico. Estas últimas representan a la mayoría y existen tanto en el hombre como en animales.

Este microorganismo tiene varias vías de transmisión, una de ellas sería la producida por zoonosis como consecuencia del consumo de alimentos de origen animal, vegetal y otros alimentos que estén contaminados. Estos alimentos a su vez han podido contaminarse mediante el contacto con un animal infectado. El hombre también puede actuar como vector, normalmente debido a la contaminación cruzada teniendo como vehículo los alimentos, ya que la transmisión directa de salmonelosis no tifoidea es rara. Por último se puede transmitir por vía ambiental debido a aerosoles (en laboratorios), contaminación de la carne en los mataderos, en el transporte o por el contacto entre canales.

No obstante, la presencia de este microorganismo en un alimento no implica que se vayan a desarrollar efectos patológicos ya que su aparición depende de la ingestión de células vivas en una tasa adecuada. Para las *Salmonella* responsables de gastroenteritis la dosis mínima infectante es de 1×10^5 - 1×10^9 microorganismos por gramo de alimento (Pascual Anderson, 1989).

El periodo de incubación de esta forma de salmonelosis dura de 12 a 24 horas de media (C.M. Bourgeois y col., 1994), aunque se puede establecer antes (6 horas) y después (72 horas) (Pascual Anderson, 1989). Los signos clínicos principales son los de una gastroenteritis febril con vómitos, náuseas, diarreas, a veces sanguinolentas, dolores abdominales y fiebre elevada. También pueden aparecer mialgias, postración y debilidad, espasmos, cefalalgias, somnolencia, anorexia y deshidratación.

Los síntomas desaparecen espontáneamente y una terapia sintomática suele ser generalmente suficiente para tratarla. Después de la desaparición de los síntomas el enfermo se encuentra débil y postrado. La duración y la gravedad de la enfermedad dependen del número de microorganismos ingeridos, el serotipo y la virulencia del germen, la resistencia individual y la naturaleza del alimento consumido (Pascual Anderson, 1989). El recurso a los antibióticos, a veces útil, tiende a aumentar la frecuencia de portadores crónicos. Esta enfermedad puede llegar a causar la muerte en sujetos inmunodeprimidos, en bebés y en ancianos, no obstante la tasa de mortalidad es algo menos de un 1 por 100. Los enfermos de salmonelosis eliminan gran cantidad de *Salmonella* por las heces tanto en la fase clínica como incluso semanas después de la curación lo que provoca una abundante difusión del germen productor de la enfermedad en el ambiente con la capacidad de infectar a otras personas (C.M. Bourgeois y col., 1994).

Durante el año 2012 se notificaron 91.034 casos confirmados de salmonelosis en Europa, un 4,7% menos que el año anterior. En el periodo 2008-2012 se observó una tendencia significativamente descendente, lo que puede deberse a los programas de control de *Salmonella* en aves aplicados en los países europeos. Dentro de los productos alimenticios, la carne de pollo fue el principal alimento implicado; también se observó su presencia en alimentos preparados a base de carne picada y moluscos bivalvos vivos. España notificó 4.181 casos confirmados de *Salmonella* en 2012, procedentes del SIM (tasa de 36,2 casos por 100.000 habitantes). Aunque nuestra tasa fue superior a la media europea (22,2%), ocupamos una posición intermedia entre los países de la UE, y la tendencia en los últimos años también fue descendente. Los serotipos predominantes, al igual que en Europa, son *S. typhimurium* y *S. enteritidis* (BES, 2014).

4.6. *Salmonella* EN ALIMENTOS

Las *Salmonella*, muy extendidas en la naturaleza, pueden contaminar locales, materiales de industria, lugares de restauración colectiva, etc. Tienen su origen en el tracto intestinal y su reservorio es la población animal. Fuera del tracto intestinal pueden sobrevivir largos periodos de tiempo e incluso durante años. El ambiente de los mataderos (suelos, mesas, utensilios,...) está habitualmente muy contaminado con *Salmonella* (Pascual Anderson, 1989). Este microorganismo es excretado por las heces por lo que su transmisión tiene lugar por vía fecal-oral.

La carne, la leche, las aves de corral y los huevos son los vehículos principales de transmisión debido a que pueden estar insuficientemente cocinados o pueden contaminar de modo cruzado otros alimentos que son consumidos sin cocción posterior (Adams y Moss, 1997). La carne se puede contaminar a partir de los animales en cualquiera de las fases de carnización encontrándose con frecuencia en pezuñas, piel y pelo de los animales sacrificados así como en las instalaciones del matadero o en los cuchillos y útiles de carnicería. Algo especial son las canales de las aves, donde la incidencia de esta bacteria es aún mayor (Pascual Anderson, 1989).

Los portadores humanos son generalmente menos importantes que los animales en la transmisión de la salmonelosis pudiendo producirse contaminación por ejemplo si un manipulador de alimentos con las manos contaminadas fecalmente manipulara un alimento que luego un consumidor comprase y no cocinara lo suficiente (Adams y Moss, 1997).

5. *Arcobacter*

5. 1. ANTECEDENTES Y SITUACIÓN TAXONÓMICA ACTUAL

La microbiología de alimentos ha avanzado mucho durante los últimos años, y recientemente han aparecido nuevos microorganismos patógenos relacionados con el consumo de alimentos, de los cuales se tenía poco conocimiento hasta hace relativamente poco tiempo. Estos microorganismos reciben el nombre de patógenos emergentes y algunos son causantes de enteritis, diarrea aguda, bacteriemia y peritonitis, entre otros. Dentro de estos patógenos emergentes destaca el género *Arcobacter*, de carácter zoonótico, asociado con aguas y alimentos, y de gran importancia en salud pública (Kereshenobich, 2008).

El incremento en los datos de prevalencia e incidencia de casos asociados a este microorganismo sugiere que la infección en humanos y animales ha sido probablemente subestimada, debido a la falta de un protocolo estandarizado para el aislamiento de este organismo, así como de detección (Calvo y col., 2013).

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 W y col, 1977).

La bacteria fue inicialmente nombrada como *Campylobacter* aerotolerante por Neill y colaboradores, no obstante su nombre fue cambiado luego a *Campylobacter cryaerophila* por Neill y colaboradores en 1985 y, finalmente, Vandamme y colaboradores en 1991, propusieron la creación del género *Arcobacter*.

Actualmente, el género consta de 17 especies: *Arcobacter butzleri* (aislada de muestras humanas y de animales con diarrea) , *A. cryaerophilus* (aislada por primera vez en casos de abortos de animales), *A. skirrowii* (aislada de muestras de heces de ovejas con diarrea, productos de abortos en cerdos, fetos bovinos y ovinos), *A. nitrofigilis* (aislada por primera vez en las raíces de *Spartina alterniflora*, una planta acuática), *A. cibarius* (aislada en carne de pollo), *A. halophilus* (aislada en una laguna hipersalina), y las especies recientemente descritas, *A. molluscorum* (aislada por primera vez de muestras de ostras y mejillones), *A. defluvii* (muestras de aguas residuales), *A. marinus* (aislada en una mezcla de agua marina, estrellas de mar y algas), *A. trophiarum* (muestras de heces de cerdos), *A. mytili* (muestras de mejillones y agua salobre), *A. thereius* (muestras de hígados y riñones de cerdos), *A. ellisii* (muestras de mejillones), *A. bivalviorum* (aislada a partir de muestras de bivalvos), *A. venerupis* (aislada de muestras de moluscos), *A. cloacae* y *A. suis* (muestras de ostiones, carne de pollo y aguas residuales) (Calvo y col., 2013).

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). La clasificación taxonómica del género *Arcobacter* se expone en la Tabla 2.

Tabla 2: Clasificación taxonómica del género *Arcobacter*.

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

5. 2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS

El género *Arcobacter* está formado por bacilos Gram-negativos, no formadores de esporas, de morfología curvada o en forma de S con un tamaño de 1 a 3 µm de largo y una anchura de 0,2 a 0,9 µm (Taylor y col. 1999). Estos microorganismos son móviles debido a que poseen un único flagelo polar en ambos extremos de la célula que les permite realizar el movimiento característico en forma de sacacorchos (Mansfield y Forsythe, 2000). Las colonias son pequeñas, traslúcidas, de color beige o blanco. Tras tres días de incubación alcanzan un diámetro de 2 a 4 mm (Collins y col., 1996).

El género *Arcobacter* es capaz de crecer en un amplio rango de temperaturas comprendidas entre 15 y 39° C en condiciones de aerobiosis (de Boer y col., 1996). Aunque las cepas de *Arcobacter* crecen en aerobiosis con unas temperaturas óptimas de crecimiento comprendidas normalmente entre los 28 y los 30°C, inicialmente estos microorganismos se aíslan mejor en condiciones de microaerofilia a 37 °C (Mansfield Y Forsythe, 2000).

Las especies de *Arcobacter* son poco activas metabólicamente (Vandamme y col., 1992). No fermentan ni oxidan los carbohidratos, tienen actividad catalasa y oxidasa, y salvo la especie *A. nitrofigilis*, las demás especies del género son ureasa negativas. Hidrolizan el indoxil acetato pero no el hipurato, reducen los nitratos y los nitritos a excepción *A. mytili*, producen indol y

sulfuro de hidrógeno, incluso pueden excretar azufre al medio (Taylor y col., 1999). La mayoría de cepas no son hemolíticas, aunque *A. skirrowii* puede ser α -hemolítico. Son sensibles al ácido nalidíxico pero muestran una respuesta variable a las cefalosporinas (Lerner y col., 1994).

5.3. PATOGENIA Y SIGNOS CLÍNICOS

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).

La especie *A. butzleri* y con menos frecuencia *A. cryaerophilus* han sido relacionadas con enteritis y ocasionalmente bacteriemia. Los síntomas más frecuentes de *A. butzleri* son la diarrea asociada con dolor abdominal, náuseas, vómitos y fiebre. Los síntomas pueden tener una gran variabilidad de 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.

Según estudios recientes la virulencia de *A. butzleri* parece tener dos fases. Primero se observó un efecto inicial sobre uniones estrechas, seguido por un efecto tardío sobre la citotoxicidad debido a necrosis y la inducción de la apoptosis.

Una tercera especie *A. skirrowii* también ha sido recientemente aislado de un paciente con diarrea crónica. 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*.

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).

La transmisión de estas bacterias al ser humano normalmente se realiza por vía fecal oral a través del consumo de agua o alimentos de origen animal contaminados, o bien, por contacto con animales reservorios.

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* de neonatos por vía transplacentaria (On y col., 1995)

5.4. *Arcobacter* EN ALIMENTOS

Aunque no se ha establecido una conexión directa entre el consumo de alimentos o agua contaminada y las enfermedades humanas, es probable que la transmisión de *Arcobacter* se produzca a través de estas rutas (Miller y col., 2009). Varios autores han sugerido que el agua contaminada es una posible vía de transmisión a los animales y los seres humanos (Ho y col.,

2006). *A. butzleri* ha sido aislado de aguas urbanas, agua de río, heces y fangos (Jacob y col., 1998), y parece que puede sobrevivir en aguas a la temperatura habitual de las aguas subterráneas. De hecho, algunos brotes aparecidos en agua potable, han dado como resultado el aislamiento de bacterias del género *Arcobacter* tanto en los pacientes como en el agua contaminada (Rice y col., 1999).

Los alimentos de origen animal también han sido sugeridos como una posible vía de transmisión de *Arcobacter* (Ho y col., 2006). Esta idea está basada en su elevada prevalencia tanto en el tracto intestinal como en heces de animales de granja sanos y en muchos de los productos de carne destinados a venta al público (Van Driessche y col., 2005).

La mayoría de estudios sobre la prevalencia de *Arcobacter* en alimentos, han sido realizados en productos derivados de aves de corral (con la prevalencia más alta) seguida por carne de cerdo, carne de vacuno (Collado y col., 2009), y leche cruda (Scullion y col., 2006). Aunque todavía no existen muchos estudios, los mariscos son otra fuente potencial de infección (Fernández y col., 2001).

6. RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

El uso de antibióticos para la salud humana y animal, así como para la producción ganadera, ha ido en aumento en los últimos años. Desde los años 50 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). 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 mal uso de estas sustancias ha dado lugar a la pérdida de su eficacia. El abuso, la administración incorrecta, un tratamiento incorrecto, dosis insuficientes o excesivas o una prescripción inadecuada son los principales causantes (Gimferrer, 2008). La administración de antimicrobianos a los animales permite la aparición de bacterias resistentes en la cadena alimentaria, lo cual sería una causa 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 principalmente 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 parece un hecho comprobado (OMS, 2014), ya que este tipo de sustancias se añaden al pienso animal, especialmente en cerdos y en aves de corral para el tratamiento masivo de enfermedades infecciosas y para evitar su desarrollo (Gimferrer, 2008).

Debido a la preocupación que esto generó, en 1970 se decidió utilizar únicamente aquellos antibióticos que tuvieran efecto sobre el crecimiento del animal, es decir, que fueran activos frente a las bacterias y que no presentaran absorción intestinal para prevenir la presencia de residuos en la carne. Por lo tanto se decidió eliminar como promotores aquellos que se utilizaran en medicina humana y animal. (Torres y Zaragaza, 2002).

El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores es uno de los métodos que el Clinical Laboratory Standards (CLSI) recomienda para la determinación de la

sensibilidad bacteriana a los antibióticos. Está indicado cuando se aísla una bacteria responsable de un proceso infeccioso y no se puede predecir su sensibilidad, especialmente si se sabe que esta bacteria puede presentar resistencia a los antimicrobianos habituales. Estas pruebas también pueden ser útiles en estudios epidemiológicos ya que el resultado del antibiograma puede servir como el primer marcador epidemiológico del que se dispone. El método disco-placa es fácil de realizar, rápido y barato. Es una metodología útil para gran variedad de bacterias, especialmente para bacterias aerobias no exigentes de crecimiento rápido como *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.*, etc. (CLSI, 2007).

7. TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS

Las técnicas están basadas en el análisis del ADN genómico bacteriano. 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 resulta ser largo y tedioso y en ocasiones proporciona falsos negativos debido a que la técnica no resulta lo suficientemente sensible o a que el microorganismo ha muerto durante el proceso de aislamiento. La presencia de ácidos nucleicos en la muestra, puede evitarla 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 bacteriana. Entre los métodos moleculares existentes estarían las sondas de ácidos nucleicos y la PCR. Recientemente se han desarrollado modificaciones de la técnica PCR, de las cuales, las principales adaptaciones al protocolo básico de PCR serían RT-PCR, Nested PCR, Multiplex PCR, PCR cuantitativa y PCR in situ (Vílchez y Alonso, 2009).

7.1. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La PCR es un proceso de amplificación enzimático in vitro del DNA o RNA (Mullis, 1990). Esta técnica fue desarrollada a mediados de los 80 por 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). Desde su aparición la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha probado ser un método inestimable para la detección de patógenos (Bolívar y col., 2014).

Esta técnica está basada en la complementación de las bases que componen las cadenas de ADN, amplificando millones de veces la secuencia flanqueada por secuencias homólogas a dos iniciadores sintéticos. Este proceso se lleva a cabo cíclicamente en un termociclador, aparato que permite variar la temperatura de incubación a lo largo del tiempo de forma programada. Cada ciclo está dividido en tres fases térmicas: desnaturalización (separación de las dos hebras de ADN), acoplamiento (unión de los nucleótidos, iniciadores o “primers”), y polimerización (síntesis de la hebra complementaria mediante la adición de dNTPs por el enzima Taq polimerasa). Los productos de PCR se detectan normalmente por electroforesis en gel de agarosa y se visualizan bajo la luz ultravioleta (Linton y col., 1996).

Para su realización es necesario conocer la secuencia del fragmento o gen del DNA o RNA que se va a amplificar para poder diseñar los iniciadores. En muchos casos resulta caro y difícil conocer la secuencia completa del organismo de interés, de modo que se recurre a información almacenada en bancos de datos. Teóricamente el rendimiento que puede obtenerse en n ciclos de amplificación es de 2^n veces el número de secuencias diana inicialmente presentes, no obstante, nunca se alcanza dicha cifra debido al denominado “efecto plateau” ocasionado al final de la reacción por la escasez de sustratos, estabilidad de los reactivos, inhibición por producto final, aparición de productos inespecíficos, etc. (Bolívar y col., 2014).

Entre las ventajas de esta técnica destacan su sencillez, rapidez y sensibilidad, (Gibb y Wong, 1998) además, mientras que la mayoría de los análisis bioquímicos requieren partir de cantidades relativamente altas de material biológico, la PCR requiere muy poco material de partida y genera material suficiente para cualquier análisis posterior (Bolívar y col., 2014). Esta ventaja hace que se trate de una técnica muy adecuada para la detección de bacterias presentes en bajos números en diferentes muestras de alimentos, agua y clínicas (Waage y col., 1999).

En cuanto a las limitaciones, destaca la necesidad de algún conocimiento previo de las secuencias que flanquean el segmento a amplificar (que actúan de iniciadores de la reacción) y las precauciones que se deben de tomar en las condiciones de la reacción para evitar las amplificaciones no deseadas, lo que daría lugar a, dada la elevada sensibilidad de la PCR, la aparición de falsos positivos procedentes de ácidos nucleicos ajenos a nuestra muestra (Bolívar y col., 2014).

OBJETIVOS

II.OBJETIVOS

Las enfermedades transmitidas por los alimentos provocadas por microorganismos son un problema de salud pública cada vez más importante. La mayoría de los países con sistemas de notificación de enfermedad transmitida por los alimentos han documentado aumentos significativos durante las últimas décadas en la incidencia de estas enfermedades, incluyendo patógenos como *Salmonella* y *Escherichia coli* enterohemorrágica.

La globalización del comercio de alimentos y la formulación de normas alimentarias internacionales han sensibilizado al público sobre la interacción entre la inocuidad de los alimentos y el potencial exportador.

Estas enfermedades no sólo afectan de manera significativa la salud y el bienestar de las poblaciones, sino que también tienen consecuencias económicas para los individuos, las familias, las comunidades, los negocios, y los países.

Por este motivo y debido a que la meta de la estrategia global de Inocuidad de los Alimentos para la OMS es reducir el impacto social y de salud de las enfermedades de transmisión alimentaria (OMS, 2002), se propone la determinación de la calidad microbiológica de muestras de alimentos presentes en el mercado. Concretamente, se analizarán muestras procedentes de carne picada de pollo. Los objetivos son:

1. Realizar un muestreo en comercios de Valencia para el estudio de la calidad microbiológica de la carne picada de pollo.
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. Concretamente se estudiará la presencia de aerobios mesófilos, *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*
3. Determinar la presencia de patógenos emergentes del género *Arcobacter spp.*
4. Realizar una detección mediante métodos moleculares de *Salmonella spp.* y *Arcobacter spp.* mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR.
5. Estudiar las posibles resistencias microbianas frente a varios antibióticos mediante el método del antibiograma disco-placa para las cepas aisladas de *Escherichia coli*

MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y METODOS

1. ORIGEN DE LAS MUESTRAS

Se han analizado un total de 7 muestras de carne picada de pollo (Tabla 3). Estos alimentos se obtuvieron entre los meses de Febrero y Marzo del 2004 en comercios y supermercados de la Comunidad Valenciana. Las muestras se obtuvieron en puestos de venta sobre las 9:30 horas de la mañana, manteniéndose en refrigeración a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis en el laboratorio de Microbiología del departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia. Las muestras se analizaron de inmediato una vez llegaron al laboratorio.

Tabla 3. Origen de las muestras de carne de pollo

| | Fecha de compra | Tipo de comercio |
|-----------|-----------------|------------------|
| Muestra 1 | 10/02/2014 | Supermercado A |
| Muestra 2 | 10/02/2014 | Supermercado A |
| Muestra 3 | 17/02/2014 | Comercio B |
| Muestra 4 | 19/02/2014 | Supermercado A |
| Muestra 5 | 24/02/2014 | Supermercado A |
| Muestra 6 | 24/02/2014 | Supermercado A |
| Muestra 7 | 03/03/2014 | Comercio C |

2. ESTUDIO DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA

2.1. Toma de muestras

Para realizar el recuento de aerobios mesófilos en las muestras y estudiar la presencia de Salmonella y Escherichia coli, se tomó en el laboratorio una muestra representativa de 25 gramos 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 Stomacher. Todo este proceso se realizó en asepsia.

Para el análisis de Arcobacter se tomó en el laboratorio una muestra representativa de 10 gramos en una bolsa estéril de Stomacher, se añadieron 90mL de caldo Arcobacter Broth (AB, Oxoid CM0965) y se homogeneizó la muestra. Todo este proceso se realizó en asepsia.

2.2. Análisis microbiológico de aerobios mesófilos

El análisis de las muestras se realizó en base al protocolo establecido para el recuento de colonias a 30°C mediante la técnica de siembra en profundidad basado en la Norma ISO 4833-1 [Método horizontal para el recuento de microorganismos (UNE-EN ISO 4833-1:2013)] (AENOR, 2014).

Se tomaron 25 g de muestra en una bolsa estéril de Stomacher y se añadieron 225 mL de agua de peptona tamponada y se homogeneizó. Posteriormente se realizaron diluciones decimales seriadas en tubos con un contenido de 9 mL de agua destilada estéril y se procedió al recuento en profundidad en placas sembradas por duplicado de agar fundido de recuento en placa (Plate Count Agar (PCA, Scharlau 01-161-500)).

Las placas se incubaron a 37±1°C durante 48 h y se calculó el número de microorganismos por gramo de la muestra para análisis a partir del número de colonias obtenidas en las placas que contuvieron menos de 300 colonias. Los resultados se calcularon mediante la ecuación:

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

Donde:

∑C: es la suma de las colonias de las placas de la dilución seleccionada para realizar 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.

Gráficamente este procedo queda representado en el esquema del anejo 1.

2.3. Recuento de enterobacterias lactosa positivo (coliformes totales) y detección de *Escherichia coli*

Para el recuento de enterobacterias lactosa positivo (coliformes totales) y detección de *Escherichia coli* se siguió el procedimiento indicado en el libro de “Microbiología Alimentaria” de M^a del Rosario Pascual Anderson y Vicente Calderón y Pascual (2000).

Se tomaron 25 g de muestra en una bolsa estéril de Stomacher y se añadieron 225 mL de agua de peptona tamponada y se homogeneizó. Posteriormente se realizaron diluciones decimales seriadas a partir del homogeneizado y se realizó el inóculo por triplicado en tubos con 10 mL de caldo lactosado verde brillante 2% (BGBL, Difco 274000) y campana Durham, procediendo al recuento de coliformes mediante la técnica del número más probable. Los tubos se incubaron a 37±1°C durante 48 horas.

Tras las 48 horas, a partir de los tubos positivos (gas en la campana Durham y enturbiamiento del medio) se realizaron siembras por la técnica de triple estría en placas con agar Triptona bilis X-glucurónido (TBX, Merck 1.16122.0500) incubándolas a 37±1°C durante 24 horas. De las colonias sospechosas del agar TBX (colonias verde-azuladas) se realizó la prueba de confirmación IMViC [Indol (Tryptone Peptone: Difco 0123-17), rojo de metilo y Voger Proskauer (Difco 216300) y Citrato de Simmons agar (Merck 1.02501)] para confirmar la presencia de *E.coli*. Los tubos fueron incubados a 37±1°C durante 24 horas. También se realizó la prueba del Indol y se inoculó un tubo de caldo lactosado verde brillante (BGBL) incubando ambos tubos a 44±1°C durante 24 horas. El perfil positivo de *E.coli* en la prueba IMViC es Indol positivo, rojo de metilo positivo, Voger Proskauer negativo y citrato negativo.

Gráficamente se puede observar el esquema del procedimiento anterior en el anejo 2.

2.3.1. Conservación de los aislados de *E.coli*

Los aislados de *Escherichia coli* se conservaron en viales con un contenido de 0,5% de glicerol y una pequeña cantidad de cuentas de plástico. Los viales se almacenaron a -20°C hasta su posterior utilización.

2.4. Análisis microbiológico de *Salmonella spp.*

El análisis de las muestras se realizó en base al protocolo establecido para el método horizontal para la detección de *Salmonella spp* basado en la Norma ISO 6579 [Método horizontal para la detección de *Salmonella spp* (UNE-EN ISO 6579:2002)] (AENOR, 2003).

Se tomaron 25 g de muestra en una bolsa estéril de Stomacher y se añadieron 225 mL de agua de peptona tamponada y se homogeneizó. Del homogeneizado se tomó una alícuota de 1,5ml en un tubo eppendorf para el análisis directo de presencia de *Salmonella* spp. mediante la técnica PCR. El homogeneizado se incubó a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

Tras el periodo de incubación se inocularon a partir del homogeneizado un tubo de Rappaport-Vassiliadis R10 Broth (Difco 218581) incubándolo a $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas y un tubo de Muller-Kauffmann tetrionato/novobiocina (caldo MKKTn, Scharlau 02-033) incubándolo a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

Tras las 24 horas, se tomaron 3 alícuotas de 1,5ml del tubo de Rappaport-Vassiliadis con soja (RVS) en 3 tubos eppendorf para el análisis mediante la técnica PCR. A partir de los medios líquidos selectivos de Rappaport-Vassiliadis R10 Broth y Muller-Kauffmann tetrionato/novobiocina (caldo MKKTn) se sembraron mediante la técnica de triple estría dos placas de agar-xilosa lisina desoxicolato (XLD, Scharlau 01-211) y dos placas de agar Hektoen (HE, Merck 1.11681.0500) (una placa por cada medio líquido selectivo). Las placas se incubaron a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

Posteriormente se aislaron las colonias sospechosas de pertenecer al género *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) en agar hierro tres azúcares (TSI, Merck 1.03815.0500). Se incubaron los tubos de TSI a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

A partir de las colonias sospechosas en los tubos de TSI (color rojo en la superficie inclinada, amarillo en el fondo con o sin ennegrecimiento del medio) se realizaron las pruebas de confirmación.

En primer lugar se les realizó la prueba del Indol, para ello se inoculó un tubo con medio triptófano y se llevó a incubar a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Pasado el tiempo se añadió el reactivo Kovacs y se interpretaron los resultados (la aparición de un anillo rojo indica una reacción positiva).

También se procedió a la confirmación mediante la batería miniaturizada API 20 E (Biomèrieux) siguiendo las indicaciones del fabricante para su realización. Se incubó a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Se examinaron los virajes de color producidos y se interpretaron los resultados. Gráficamente la detección de *Salmonella* spp. queda representada en el Anejo 3.

2.5. Análisis microbiológico de *Arcobacter* spp.

Dado que no existe ningún procedimiento estandarizado de referencia para el aislamiento de *Arcobacter* (Collado y Figueras, 2011) y los medios ensayados para su aislamiento no son de uso cotidiano en los laboratorios de alimentos, resulta complicada la detección e identificación de esta bacteria (Houf K y col., 2001).

Por esta razón, el análisis de *Arcobacter* spp. se basó en el procedimiento descrito un artículo desarrollado por Collado y Figueras en el 2011.

En primer lugar se tomaron 10 g de muestra en una bolsa estéril de stomacher y se añadieron 90ml de caldo *Arcobacter Broth* y se homogeneizó en un Stomacher. Del caldo homogeneizado

se tomaron 3 alícuotas de 1,5ml en 3 tubos eppendorf para el análisis directo de la presencia de *Arcobacter* spp. 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) [(Cefoperazona, anfotericina-B y teicoplanina) OXOID, SR0174E] y se incubaron a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas en condiciones de microaerofilia.

Posteriormente, se tomaron otras 3 alícuotas en 3 tubos eppendorf para el análisis directo de presencia de *Arcobacter* spp. por medio de la técnica PCR tras 48 horas de enriquecimiento selectivo a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ en condiciones de microaerofilia. Se tomaron también 100 μl 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 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ en condiciones de microaerobiosis. Esta técnica se basa en la capacidad de *Arcobacter*, pero no de la microbiota competitiva, de pasar por un filtro de la membrana debido a su reducido tamaño (Atabay y Corry, 1997). Transcurridos 45 minutos los filtros fueron retirados y las placas fueron incubadas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ en condiciones de microaerobiosis durante 48 horas.

Tras la incubación de las placas, se seleccionaron de 1 a 4 colonias con morfología típica de *Arcobacter* spp. (colonias muy pequeñas lisas y traslúcidas de color beis a amarillento) por placa y se sembraron en placas con medio de cultivo ASO incubándose en condiciones de microaerobiosis a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 horas. Posteriormente se procedió a la confirmación de las colonias sospechosas mediante Tinción Gram (bacilos Gram negativos de morfología curvada o en forma de S). Gráficamente la detección de *Arcobacter* spp. queda representado en el Anejo 4.

3. ESTUDIO DE LAS RESISTENCIAS ANTIMICROBIANAS DE *Escherichia coli*

Para el estudio de sensibilidad de *Escherichia coli* se empleó la técnica del antibiograma disco-placa (CLSI, 2007). Se eligió este método por ser uno de los métodos recomendados por el CLSI.

Para el control de calidad del antibiograma, se utilizó la cepa de *Escherichia coli* CECT 3423. Se seleccionaron 12 antibióticos, los cuales se pueden clasificar por grupos según su naturaleza y procedencia (Tabla 4.)

Tabla 4. Antibióticos utilizados en el trabajo y su clasificación

| Grupo | Antimicrobianos |
|-----------------|---|
| Aminoglucósidos | Amikacina(AK) Gentamicina(CN) Kanamicina (K) |
| Anfenicoles | Cloranfenicol(C) Tetraciclina(TE) |
| Betalactámicos | Amoxicilina(AMC) Ampicilina(AMP) Cefalotina(KF) Ceftriaxona(CRO) |
| Macrólidos | Eritromicina(E) |
| Quinolonas | Ác.Nalidíxico(NA) Ciprofloxacino(CIP) |

La carga del disco y los patrones estándar de los halos de inhibición de los antibióticos con los que se ha trabajado se muestran en la tabla 5. El resultado de los halos de determinó mediante los valores del CLSI y se clasificaron en resistente, sensible e intermedio.

Tabla 5. Antimicrobianos y concentración de uso en el estudio 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) | 10/10 | ≤ 13 | 14-16 | ≥ 17 |
| Ác.nalidíxico(NA) | 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 de 24 horas se cogieron varias colonias con el asa de siembra y se ajustó el inóculo a una turbidez equivalente a 0,5 de la escala MacFarland. Se agitó durante un agitador “vortex” durante 15-20 segundos aproximadamente.

Tras ajustar el inóculo se introdujo un escobillón dentro de la suspensión y al retirarlo se rotó varias veces contra la pared del tubo (por encima del nivel del líquido) con el fin de eliminar el exceso de inóculo. Para inocular las placas de Mueller Hilton II Agar (MH,Difco 211438) sin

dejar ninguna zona libre se deslizo el escobillón por la superficie del agar tres veces, rotando la placa unos 120° cada vez y pasándolo por ultimo por la periferia del agar para conseguir una siembra uniforme. Los discos de los antibióticos se colocaron mediante dispensadores automáticos. Las placas se incubaron invertidas en grupos no superiores a 5 placas a 37±1°C durante 24 horas. Tras el periodo de incubación se procedió a la lectura del diámetro de las zonas de inhibición con una regla.

4. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN MEDIANTE PCR

4.1 Aislamiento del DNA cromosómico

Para la extracción de DNA se procedió usando el kit Gen Elute Bacterial Genomic© DNA kit (SIGMA, 081M6130). Se siguieron las instrucciones del fabricante para microorganismos Gram negativos.

4.2 Detección e identificación de *Salmonella spp.*

Para la detección de *Salmonella* se utilizaron los iniciadores ST11 (5'-GCC AAC CAT TGC TAA ATT GGC GCA-3') y ST15 (5'-GGT AGA AAT TCC CAG CGG GTA CTG G-3') que amplifican el fragmento 429 pb de ADN cromosómico (Aabo y col., 1993). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25µl, conteniendo 20 µl de mezcla y 5 µl de DNA molde. (Tabla 6)

Tabla6.Reactivos empleados en la PCR de *Salmonella spp.*

| Reactivos | Concentración final |
|-----------------------|----------------------------|
| Tampón | 1x |
| dNTPs | 0,5µM |
| MgCl2 | 1,5 mM |
| ST11 | 0,4µM |
| ST15 | 0,4µM |
| <i>Taq</i> polimerasa | 0,05 U |

El proceso de amplificación se llevó a cabo en un termociclador modelo PTC-100 Peltier Thermal Cycler (MJ Research), según los ciclos de temperatura descritos en la Tabla 7.

Tabla 7: Programa de temperaturas utilizadas en la PCR de *Salmonella spp.*

| Nº de ciclos | Temperatura | Tiempo | Fases |
|---------------------|--------------------|---------------|----------------------|
| 1 | 95°C | 10 min | Desnaturalización |
| 35 | 95°C | 30 seg | Desnaturalización |
| | 57°C | 30 seg | Unión de iniciadores |
| | 72°C | 30 seg | 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%. Los geles se desarrollan en cubeta de electroforesis a 95V durante una hora y, finalmente, se visualizan mediante un transiluminador (Vilber Lourmat 09 200272) con luz UV.

Se usó como control positivo el DNA de la cepa *Salmonella 915*, y una muestra en la que el DNA se reemplazaba por agua libre de nucleasas se incluyó como control negativo en todos los ensayos.

4.3 Detección e identificación de *Arcobacter spp.*

Para la detección de *Arcobacter* se utilizaron los iniciadores ARCO1 (5'-GTCGTGCCAAGAAAAGCCA-3') y ARCO2 (5'-TTCGCTTGCCTGACAT-3') que amplifican un fragmento de 331pb del gen 23S rRNA (Bastyns y col., 1995). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50µl, conteniendo 45µl de mezcla y 5µl de DNA molde. (Tabla 8)

Tabla 8. Reactivos empleados en la PCR de *Arcobacter spp.*

| Reactivos | Concentración final |
|-----------------------|----------------------------|
| Tampón | 1x |
| dNTPs | 100µM |
| MgCl ₂ | 2 mM |
| ARCO 1 | 0,5µM |
| ARCO 2 | 0,5µM |
| <i>Taq</i> polimerasa | 2,5 U |

El proceso de amplificación se llevó a cabo en un termociclador modelo Eppendorf AG, según los ciclos de temperatura descritos en la Tabla 9.

Tabla 9: Programa de temperaturas utilizadas en la PCR de *Arcobacter*.

| Nº de ciclos | Temperatura | Tiempo | Fases |
|---------------------|--------------------|---------------|----------------------|
| 1 | 94°C | 5 min | Desnaturalización |
| 27 | 94°C | 1min | Desnaturalización |
| | 61°C | 1min | Unión de iniciadores |
| | 72°C | 1min | Extensión |
| 1 | 72°C | 5 min | Extensión |

Los productos de PCR fueron analizados en las mismas condiciones descritas previamente para *Salmonella spp.*

Se usó como control positivo el DNA de una cepa de *Arcobacter butzleri* DSM 8739, y una muestra en la que el DNA se reemplazaba por agua libre de nucleasas se incluyó como control negativo en todos los ensayos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. RECUESTO DE AEROBIOS MESÓFILOS

Para evaluar el estado sanitario de la carne picada de pollo empleada durante el periodo de este estudio se realizó un recuento de microorganismos aerobios mesófilos siguiendo el método horizontal para el recuento de microorganismos (UNE-EN ISO 4833-1:2013) descrito en el apartado 2.2 de Material y Métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 10

Tabla 10. Resultados del recuento de aerobios mesófilos en las muestras.

| Muestra | Aerobios mesófilos UFC /g |
|----------------|----------------------------------|
| Muestra 1 | $3,00 \times 10^5$ |
| Muestra 2 | $3,00 \times 10^5$ |
| Muestra 3 | $2,12 \times 10^4$ |
| Muestra 4 | $1,10 \times 10^5$ |
| Muestra 5 | $2,10 \times 10^5$ |
| Muestra 6 | $6,80 \times 10^4$ |
| Muestra 7 | $6,60 \times 10^5$ |

Los resultados obtenidos en el análisis de microorganismos aerobios mesófilos de nuestras muestras detectaron un recuento aceptable dentro de los límites establecidos para carne picada (5×10^5 ufc/g), tras la fase final del proceso de fabricación del producto para todas las muestras a excepción de la muestra 7. La muestra 7 provenía del Comercio C, en la cual se detectó un recuento inaceptable (BOE, 2007), por lo que se concluye que este comercio no cumple con la normativa en cuanto a este análisis. Este resultado nos muestra que la calidad sanitaria y las condiciones higiénicas de la muestra 7 no eran las correctas, posiblemente por una mala manipulación en el comercio, que en este caso, es el Comercio C.

El porcentaje de resultados inaceptables para el recuento de aerobios mesófilo, para las 7 muestras analizadas, fue del 14,29 %.

2. Escherichia coli

2.1 Recuento de enterobacterias lactosa positivo (coliformes totales) mediante la técnica del Número Más Probable

Para evaluar la calidad higiénica del proceso mediante el cual se obtuvieron las muestras de carne picada de pollo durante el periodo de este estudio se realizó un recuento mediante la técnica del número más probable descrita en el apartado 2.3 de Material y Métodos utilizando la tabla para el recuento de *Enterobacteriaceae* lactosa-positivas (coliformes totales). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 11:

Tabla 11. Resultados del recuento de enterobacterias mediante la técnica del Número Más Probable.

| Muestra | Tres tubos 1mL 1:10 | Tres tubos 1mL 1:100 | Tres tubos 1mL 1:1000 | NMP/g |
|-----------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|--------|
| Muestra 1 | 0 | 0 | 0 | <3 |
| Muestra 2 | 0 | 0 | 0 | <3 |
| Muestra 3 | 3 | 0 | 1 | 39 |
| Muestra 4 | 3 | 2 | 1 | 150 |
| Muestra 5 | 3 | 2 | 0 | 93 |
| Muestra 6 | 3 | 0 | 0 | 23 |
| Muestra 7 | 3 | 3 | 3 | >2.400 |

Los valores más altos corresponden a la muestra 4, la muestra 5 y la muestra 7, los cuales superan el límite establecido para carne picada (50 UFC/g). La muestra 4 y la muestra 5 provienen del Supermercado A, las dos compradas en dos días diferentes. Esto pone de manifiesto que en el Supermercado A no se realizaron buenas prácticas de manipulación e higiene de los alimentos, al menos en las dos fechas en las que se compraron las muestras.

Se observa que hay una correlación entre el resultado obtenido para el recuento de aerobios mesófilos en el Comercio C (del cual proviene la muestra 7) el cual era inaceptable y no cumplía con la normativa y el resultado obtenido mediante esta técnica, resultando ser el valor más elevado de las 7 muestras analizadas. Esto hace ver que, efectivamente, el proceso de obtención y manipulación en este comercio, no se realizó en las condiciones higiénicas adecuadas.

2.2 .Detección de *E.coli*

Los resultados obtenidos en la tabla 12 corresponden a los obtenidos por el método explicado en el libro de “Microbiología Alimentaria” de M^a del Rosario Pascual Anderson y Vicente Calderón y Pascual (2000) descrito en el apartado 2.3 de Material y Métodos. La prueba de confirmación para la detección por cultivo de *Escherichia coli* se realizó mediante la prueba IMViC.

Tabla 12. Detección por cultivo de *Escherichia coli*

| Muestra | Detección por Cultivo | Nomenclatura de los aislados |
|-----------|-----------------------|------------------------------|
| Muestra 1 | - | |
| Muestra 2 | - | |
| Muestra 3 | - | |
| Muestra 4 | + | Aislado A |
| Muestra 5 | + | Aislado B |
| Muestra 6 | + | Aislado C |
| Muestra 7 | + | Aislado D |

En el caso de *Escherichia coli*, para las 7 muestras analizadas, el porcentaje de resultados positivos por métodos microbiológicos clásicos fue del 57,14%, obteniéndose aislados en cuatro de las siete muestras analizadas. Los aislados fueron conservados en viales a -20° C para la posterior realización del estudio de resistencia a antimicrobianos mediante el método de antibiograma disco-placa.

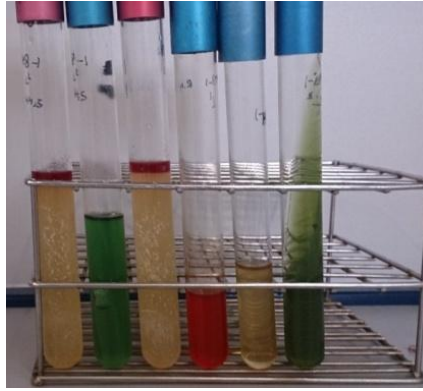


Figura 1. Resultado positivo en prueba IMViC para *Escherichia coli*

Las muestras 4, 5 y 6 procedían del supermercado A (obteniendo las muestras 5 y 6 el mismo día) y la muestra 7 procedía del Comercio C. Se puede observar como la muestra 4 y la muestra 5 obtuvieron unos de los valores más altos para el recuento de aerobios mesófilos y enterobacterias. Por otro lado, la muestra 7 obtuvo los resultados más altos en cuanto al recuento de aerobios mesófilos y enterobacterias, los cuales eran sumamente elevados e inaceptables. De estos datos se concluye que en el Supermercado A y, en especial, en el Comercio C, no realizaron buenas prácticas de manipulación e higiene de los alimentos.

E. coli estuvo presente en la mayoría de las muestras de estudio, lo cual no es raro puesto que como ya se ha dicho anteriormente, esta bacteria forma parte de la biota intestinal de humanos y animales (Adams y Moss, 1997), siendo su presencia en carne picada considerada como indicador de contaminación fecal directa o indirectamente (BOE, 2007). Es posible que las aves se contaminaran con microorganismos transportados en los intestinos, plumas o en la piel en la cadena de sacrificio o que no se realizaran buenas prácticas de manipulación de estos alimentos a la hora de comercializarlos.

Resultados similares de esta bacteria en pollo también se han obtenido en otros estudios, un ejemplo sería en el estudio de Zhao y colaboradores (2001) en el cual de las 212 muestras analizadas de pollo se encontró *Escherichia coli* en 82 (el 38,7% de las muestras).

2.3. Estudio de la resistencia a antimicrobianos.

Se determinaron los halos de inhibición de los 12 antibióticos estudiados en los 4 aislados de *Escherichia coli*, por el método del antibiograma disco-placa descrito en el apartado 3.1 de Material y métodos.

Los resultados obtenidos experimentalmente para los halos de inhibición de los 12 antibióticos por aislado se muestran en la Tabla 13:

Tabla 13. Diámetro de los halos de inhibición a los 12 antibióticos de estudio por aislado

| Antibióticos | Diámetro del halo de la aislado A (mm) | Diámetro del halo de la aislado B (mm) | Diámetro del halo de la aislado C (mm) | Diámetro del halo de la aislado D(mm) |
|---------------------|--|--|--|---------------------------------------|
| Gentamicina(CN) | 27 | 26 | 24 | 26 |
| Amikacina(AK) | 25 | 24 | 22 | 25 |
| Amoxicilina(AMC) | 7 | 7 | 7 | 7 |
| Eritromicina(E) | 14 | 13 | 16 | 12 |
| Ampicilina(AMP) | 7 | 7 | 7 | 8 |
| Ác.nalidíxico(NAL) | 7 | 7 | 7 | 29 |
| Cloranfenicol(C) | 32 | 29 | 32 | 30 |
| Cefalotina(KF) | 7 | 9 | 7 | 7 |
| Ciprofloxacino(CIP) | 14 | 11 | 12 | 41 |
| Ceftriaxona(CRO) | 30 | 16 | 15 | 29 |
| Tetraciclina(TE) | 8 | 25 | 25 | 24 |
| Kanamicina (K) | 26 | 24 | 23 | 24 |

Se observó una gran sensibilidad por parte de todos los aislados a la Gentamicina (CN), la Amikacina (AK), Cloranfenicol (C) y a la Kanamicina (K). También se observó una gran sensibilidad a la Tetraciclina para el aislado A, el aislado B y el aislado C. Todas las cepas fueron resistentes a los betalactámicos Amoxicilina (AMC), Ampicilina (AMP), Cefalotina (KF) y presentaron un 50% de sensibilidad a la Ceftriaxona (CRO) y un 75% de sensibilidad a la Tetraciclina (TE).

Hay que tener en cuenta que el diámetro del disco del antimicrobiano se encuentra incluido en la medida del diámetro del halo de la muestra, el cual es de 7 mm. Todos los resultados están dentro del rango considerado para el *E.coli* CECT 3423 de referencia.

Los resultados mostraron distintos porcentajes de resistencia frente a los antibióticos testados los cuales se muestran en la Figura 6.

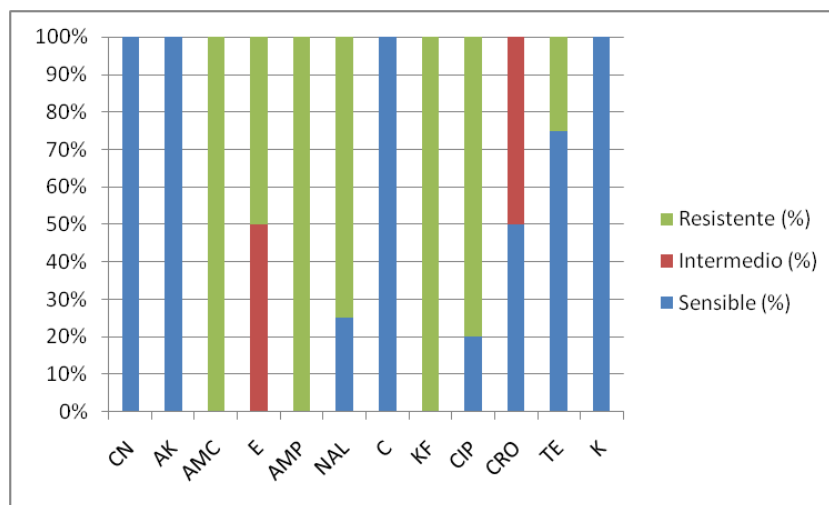


Figura 2. Aislados de *Escherichia coli* agrupadas según el nivel de resistencia frente a los antibióticos de estudio.

Cabe destacar la resistencia que mostraron todos los aislados estudiados frente a Amoxicilina, Ampicilina, Cefalotina y Criptofloxacino. El Ácido Nalidíxico obtuvo una tasa de resistencia más baja, siendo resistentes 3 de los cuatro aislados (el 75 % de los aislados). Resultados parecidos en cuanto a la alta resistencia de *Escherichia coli* frente a estos antibióticos se han observado en un estudio de Abreu y colaboradores (2013), en el cual de las de las 78 cepas de *E. coli* BLEE estudiados, el 100% presentó resistencia a Amoxicilina y Ampicilina, el 92,4% presentó resistencia al Acido Nalidíxico y el 73,4% presentó resistencia al Ciprofloxacino.

Por otro lado, en el año 2012 la EFSA publicó un artículo en el que informaba que en los aislamientos de *E. coli* en aves de corral y en sus carnes se había observado una resistencia alta a las tetraciclinas, la ampicilina y las sulfonamidas, una resistencia baja a las cefalosporinas de tercera generación y resistencias moderadas a altas a las fluoroquinolonas (como el Ciprofloxacino (EFSA, 2014).

Los aislados que presentaron mayor resistencia fueron el Aislado A y el Aislado B con una resistencia a 6 de los 12 antibióticos estudiados (el 50%), frente al Aislado D (Figura 7) que fue el que menor resistencia presento con un 33,33%.

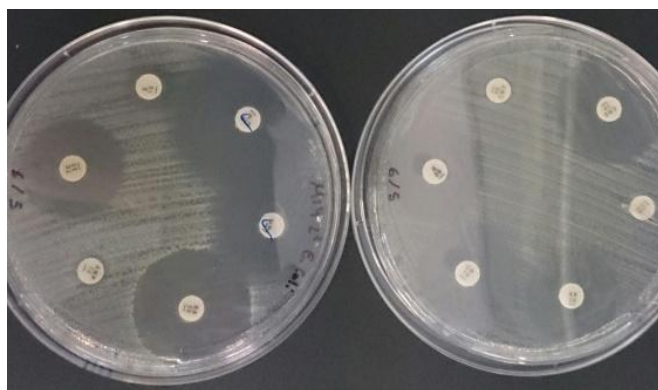


Figura 3. Halos de sensibilidad frente a los distintos antibióticos ensayados en la Cepa D.

El total de los aislados analizados presentaron multiresistencia (resistencia a tres o más antibióticos)(Tabla 14). Esto supone un peligro potencial y un motivo de preocupación mundial, debido a que las infecciones por microorganismos resistentes no responden a los tratamientos habituales, lo cual prolonga la duración de la enfermedad y aumenta el riesgo de muerte. La multiresistencia supone también un encarecimiento de la asistencia médica y hace peligrar los adelantos de la medicina moderna, ya que en ausencia de antimicrobianos eficaces para el tratamiento y la prevención se pondría en peligro el éxito de tratamientos como el trasplante de órganos, la quimioterapia antineoplásica o las grandes intervenciones quirúrgicas (OMS, 2012).

Tabla 14. Patrones de multiresistencia a antimicrobianos de los aislados de *E.coli*

| AISLADO | ANTIBIOTICOS A LOS QUE PRESENTAMOS RESISTENCIA |
|-----------|--|
| Aislado A | AMC, AMP, NAL, KF, CIP, TE |
| Aislado B | AMC, E, AMP, NAL, KF, CIP |
| Aislado C | AMC, AMP, NAL, KF, CIP |
| Aislado D | AMC, E, AMP, KF |

Los cuatro aislados presentaron resistencia a la Ampicilina y a Amoxicilina, lo cual puede deberse al incremento de su uso en animales desarrollándose resistencias, especialmente en

Escherichia coli, debido a la producción de betalactamasas (capaces de destruir muchos fármacos antibacterianos como los betalactámicos.)(Burch, 2011).El empleo de cefalosporinas de amplio espectro (como la Cefalotina) en animales es considerado como la causa de la aparición bacterias productoras de betalactamasas (Torres y Zarazaga, 2007).Dado que el uso de las cefalosporinas no está permitido en pollos en España (Burch, 2011), el que haya aparecido resistencias a este antibiótico en todos los aislados resulta un hecho alarmante y pone de manifiesto que no se ha cumplido con la normativa.

La resistencia a la Ampicilina y a la Amoxicilina también puede haberse dado por la adquisición de elementos móviles genéticos, el cual ha sido el caso para un amplio espectro de penicilinas (OMS, 2014).

Únicamente el Aislado A presentó resistencia a Tetraciclina, posiblemente porque los alimentos para consumo animal son comúnmente suplementados con calcio y cationes divalentes que podrían disminuir la concentración biodisponible de las tetraciclinas siendo más difícil la posibilidad de crear resistencias frente a ellas (Palm y col., 2008).

Sin duda, la resistencia más preocupante fue al Ciprofloxacino en los Aislados A, B y C debido a que es una fluoroquinolona cuyo uso no está autorizado para uso animal en Europa. El uso generalizado de la enrofloxacin, antibiótico autorizado para uso animal con estructura y funcionalidad similar al Ciprofloxacino, podría ser la causa por la que inducen esta resistencia algunas bacterias en Europa (Balsalobre y Hernández, 2004), como consecuencia de mutaciones en la estructura de las proteínas PBP's, lo cual impide al antibiótico anclarse. Estas mutaciones se originan por el uso inadecuado del antibiótico (OMS, 2014).

Las resistencias que han generado los aislados a los antibióticos, podrían ser también causa del sistema de cría intensiva y el hacinamiento al que se ven sometidos con frecuencia los animales, lo que facilita enormemente, tanto el intercambio de bacterias entre individuos como el intercambio de genes de resistencia entre bacterias. (Torres y Zarazaga, 2007).

3. Salmonellas spp.

3.1. Detección por cultivo

Salmonella se analizó siguiendo el método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. (UNE-EN ISO 6579:2002) descrito en el apartado 2.4 de Material y Métodos. Aunque se observaron posibles colonias sospechosas en las placas de XLD y HK, finalmente no se consiguieron obtener aislados pertenecientes a este género mediante esta técnica y todos los análisis de confirmación resultaron ser negativos. Posiblemente no se consiguieron detectar bacterias pertenecientes al género *Salmonella* debido a la poca cantidad de muestras que fueron analizadas y a que procedían únicamente de tres comercios diferentes.

Los resultados obtenidos, por tanto, detectaron un recuento aceptable dentro de los límites establecidos para carne picada (ausencia en 25 gramos) en los productos comercializados durante su vida útil (OMS, 2007). Esto indica que todas las muestras y, por consiguiente, todos los comercios cumplían con la norma establecida para este microorganismos en carne picada de pollo.

Resultados bajos de esta bacteria en pollo, obtenida mediante métodos culturales, se han obtenido también en otros estudios, un ejemplo sería en el estudio de Zhao y colaboradores

(2001) en el cual de las 212 muestras analizadas de pollo se encontró *Salmonella* en 9 (el 4,2% de las muestras).

3. 2. Detección por PCR

Los resultados obtenidos mediante la técnica de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) mostraron dos resultados positivos, en la muestra 1 y la muestra 2, procedentes del Supermercado A (compradas el mismo día) obtenidas tras la fase de enriquecimiento a partir del tubo incubado 24 horas a 42°C de Rappaport-Vassiliadis (RVS). Las muestras se procesaron según el método de detección e identificación de *Salmonella* spp. descrito en el apartado 4.2 de Material y Métodos.

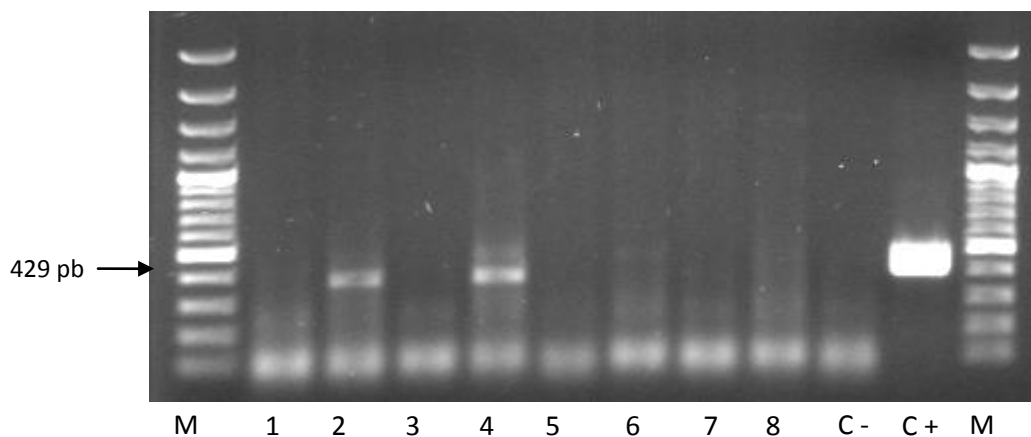


Figura 4. Detección de *Salmonella* mediante PCR: muestra 1 a la muestra 4 a distintos tiempo. Identificación de *Salmonella* por PCR: M: Marcador de 100 pb; 1: 1S0; 2: 1S1; 3: 2S0; 4: 2S1; 5: 3S0; 6: 3S1; 7: 4S0; 8: 4S1; C-: Control negativo; C+: control positivo de la cepa *Salmonella* 915; M: Marcador de 100 pb.

Mediante la técnica de detección por PCR se obtuvieron por tanto, un total de 2 muestras positivas de las 7 analizadas (un 28,57%), a diferencia de la técnica de detección por cultivo en la que no hubo ningún resultado positivo, seguramente porque la técnica no resultó lo suficientemente sensible o a que el microorganismo estaba subletal y no pudo ser cultivado durante el proceso de aislamiento.

En otros estudios en los que se analizó la presencia de *Salmonella* en carne de pollo mediante la técnica de PCR también se han observado porcentajes de detección parecidos, uno de ellos sería el estudio realizado por Ha y colaboradores (2012) en el cuál de las 268 muestras de carne de pollo se detectó *Salmonella* en 126 muestras (el 39,6%).

Debido a que las muestras positivas procedían del Supermercado A y comparando con los resultados obtenidos anteriormente para aerobios mesófilos y *E.coli* se puede concluir que el Supermercado A es el que peores métodos de manipulación e higiene de los alimentos emplea, sin embargo, hay que tener en cuenta que posiblemente, el mayor porcentaje de resultados positivos en este supermercado se deba a que la mayoría de las muestras proceden de allí, por lo que es más probable que aparezcan mayor número de resultados insatisfactorios.

4. Arcobacter spp.

4.1. Detección por cultivo

Para la detección por cultivo de *Arcobacter*, a partir de muestras de carne picada de pollo, se siguió el método descrito en el apartado 2.5 de Material y Métodos. No se consiguieron obtener aislados pertenecientes a este género mediante esta técnica y aunque se observaron colonias sospechosas de pertenecer al género *Arcobacter* en las placas de agar sangre, finalmente, tras realizar la correspondiente tinción Gram, todas ellas fueron descartadas por ser Gram positivas.

Arcobacter suele estar presente normalmente en carne de pollo por lo que resulta extraño no haber obtenido ningún aislado en este tipo de muestras, no obstante, posiblemente se deba a la poca cantidad de muestras analizadas y a que procedían únicamente de tres comercios diferentes. Diversos estudios sugieren que la contaminación por *Arcobacter* se debe probablemente al contacto de las heces de los animales con el alimento, cuando está siendo procesado en el matadero (Aydin y col., 2007). Este dato hace pensar que posiblemente no se aislara *Arcobacter* debido a que se llevaron a cabo buenas prácticas de manipulación de alimentos durante su procesado.

El aislamiento de *Arcobacter* spp. por métodos convencionales se encuentra limitada debido a los exigentes requerimientos nutritivos de estas bacterias y a su baja actividad metabólica. Las diferencias respecto a la menor o mayor prevalencia de estos microorganismos es atribuida principalmente al medio de cultivo empleado y al procedimiento elegido para el aislamiento, ya que actualmente no existe un método óptimo para todas las especies del género. Recientemente, Merga y colaboradores (2011) compararon 5 métodos diferentes de aislamiento, y observaron distintos porcentajes de sensibilidad y especificidad de los medios usados, obteniendo distintos resultados en función del método seleccionado para el aislamiento.

Los procedimientos más comunes para el aislamiento de *Arcobacter* constan de una etapa previa de enriquecimiento en un medio selectivo y posterior siembra del caldo de enriquecimiento sobre agar sangre por filtración. Sin embargo se ha planteado que en ocasiones esta etapa de enriquecimiento reduce la diversidad de especies de *Arcobacter* y favorece la detección de especies de crecimiento más rápido como es el caso de *A. butzleri* (Collado y Figueras, 2011). Otras causas que también pueden influir en el aislamiento de *Arcobacter*, son las condiciones climatológicas, la época del año, el lugar geográfico en el que se toma la muestra, la alimentación del animal estudiado y el estado de la muestra (fresca, congelada, etc.) (Van Driessche y col., 2005). La edad de los animales también se ha asociado con la prevalencia de *Arcobacter*. Wesley y Miller (2010), observaron mayores prevalencias en pollos de 56 semanas de edad (57%) con respecto a los pollos de 8 y 16 semanas (1% y 3% respectivamente).

Con respecto a los estudios que han utilizado un procedimiento similar al nuestro (un enriquecimiento en caldo AB suplementado con antibiótico CAT, y una posterior filtración en agar sangre), podemos decir que las tasas de aislamiento para *Arcobacter* han sido elevadas, ejemplo de ello sería el estudio realizado por Collado y colaboradores (2009), en el cual, de las 14 muestras de pollo analizadas se detectó *Arcobacter* en 9 (el 64,3%).

Sin embargo, también se han encontrado en la bibliografía consultada, bajos porcentajes de aislamiento, como es el caso de un estudio elaborado en Iran (Rahimi, 2013), en el cual usando técnicas de cultivo, únicamente 71 de 540 muestras de carne de volatería (13.1 %) eran positivas para *Arcobacter* spp., lo que podría considerarse un valor bajo teniendo en cuenta el elevado número de muestras analizadas.

4.2. Detección por PCR

Todas las muestras, tras ser analizadas por PCR, tanto antes como después de la fase de enriquecimiento selectivo a 37°C en microaerofilia, resultaron ser negativas, lo cual confirma los resultados obtenidos previamente mediante la técnica por cultivo. En ninguna de las 7 muestras se observó la banda característica correspondiente a la amplificación del fragmento de 331pb del gen 23S rDNA. Sin embargo, si se observó la banda correspondiente al DNA de la cepa de *Arcobacter butzleri* DSM 8739 empleada como control positivo de la reacción, como se puede ver en la figura 9, lo cual confirma que la PCR se desarrolló correctamente.

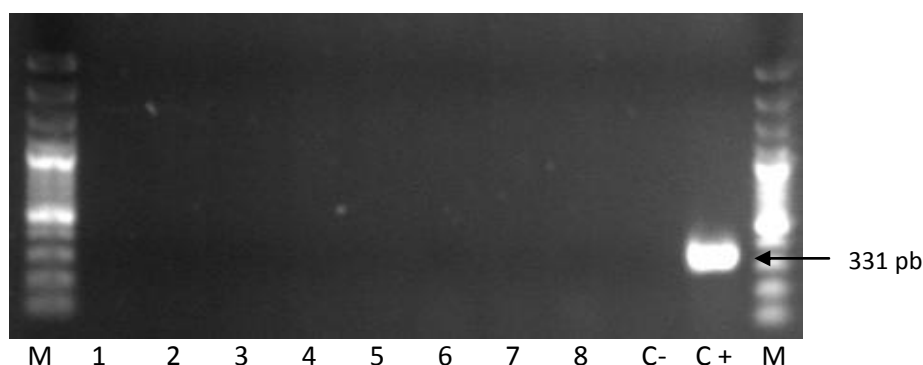


Figura 5. Detección de *Arcobacter* mediante PCR: muestra 4 a la muestra 7 a distintos tiempo. Identificación de *Arcobacter* por PCR: M: Marcador de 100 pb; 1: 4S0; 2: 4S1; 3: 5S0; 4: 5S1; 5: 6S0; 6: 6S1; 7: 7S0; 8: 7S1; C-: Control negativo; C+: control positivo *A. butzleri* DSM 8739; M: Marcador de 100 pb.

Este resultado confirma los resultados obtenidos previamente por cultivo, y a la vez corrobora 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.

Aunque en la mayoría de estudios realizados para la detección de bacterias del género *Arcobacter* en muestras de carne de pollo mediante técnicas moleculares (concretamente mediante la técnica PCR que fue la empleada en este estudio) se observan porcentajes altos de detección, como es el caso del estudio realizado por Pentimalli y colaboradores (2008) en el cual de las 42 muestras de pollo analizadas se detectó *Arcobacter* en 36 (un 85,7%), también existen otros estudios en los que se observan porcentajes bajos de detección (como ha sido nuestro caso). De hecho, en un trabajo realizado en Dinamarca en 2013 (Hesselbjerg y colaboradores, 2013), en el cual se empleó la PCR para estudiar la presencia de *Arcobacter* en 235 muestras de pollo, sólo resultaron positivas 36 muestras, lo que podría considerarse un número bajo a priori dado el volumen de muestras analizadas.

Estas discrepancias en cuanto a los niveles de detección de *Arcobacter* en carne de pollo, como ya se ha comentado anteriormente, podrían deberse a muchas causas, entre ellas destacar la poca cantidad de muestras analizadas y la poca variabilidad de comercios de donde procedían las muestras trabajadas en este estudio. Sin olvidar, los diferentes protocolos llevados a cabo por los distintos autores, así como las distintas condiciones climatológicas, época del año, lugar geográfico, etc. de los trabajos publicados en bibliografía.

Además, también hay que tener en cuenta que aunque han sido desarrollados varios métodos moleculares para la identificación a nivel de género de esta bacteria, aunque ninguno de estos permite la identificación de las 17 especies actualmente aceptadas dentro del género (Collado y col., 2008).

CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

1. El estudio de la contaminación inicial de aerobios mesófilos en carne picada de pollo de venta al público, ha permitido comprobar que todas las muestras procedentes del Supermercado A y del Comercio B cumplían con las normas vigentes para este grupo de microorganismos. La muestra procedente del Comercio C obtuvo un recuento inaceptable, incumpliendo la normativa.

2. El valor alto en el recuento mediante el número más probable para enterobacterias en cuatro muestras, procedentes del Supermercado A y el Comercio C, y la obtención de cuatro aislados de *Escherichia coli* pone de manifiesto que no se han llevado a cabo buenas prácticas de manipulación e higiene de los alimentos en estos comercios.

3. El total de los aislados analizados de *Escherichia coli* presentaron multiresistencia a los agentes antimicrobianos estudiados. Estos resultados indican que se deberían mejorar los programas de concienciación y vigilancia de la resistencia a los antibióticos y que se deberían diseñar políticas adecuadas para asegurar el cumplimiento de la normativa.

4. Las resistencias a Amoxicilina, Ampicilina y Cefalotina han sido las más altas encontradas de entre todos los antimicrobianos ensayados, seguido de la resistencia al Ácido Nalidíxico y Ciprofloxacino, lo que supone un riesgo para la salud pública. La resistencia a Cefalotina y Ciprofloxacino viene a confirmar el incumplimiento de las normas de uso de antibióticos que indica la prohibición para su uso animal en Europa.

5. Mediante los métodos culturales no se consiguieron obtener aislados pertenecientes a los géneros *Arcobacter* y *Salmonella*, lo cual indica que las muestras cumplían con la normativa establecida para el caso de *Salmonella*, y que presentaban una buena calidad microbiológica para el caso de *Arcobacter*.

6. En los análisis realizados para *Salmonella* por PCR tras el enriquecimiento, dos de las muestras resultaron positivas. Este resultado confirma la necesidad de un enriquecimiento previo al análisis del alimento para la detección del *Salmonella spp.*

7. En los análisis realizados para *Arcobacter* por PCR, a tiempo 0 y tras una etapa previa de enriquecimiento selectivo, no se obtuvieron resultados positivos. Este dato confirma los resultados obtenidos previamente por cultivo, y a la vez corrobora 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.

8. En este trabajo se confirma la utilidad de los análisis por PCR para la detección rápida e inequívoca de patógenos en alimentos, como método más sensible e inequívoco que los métodos culturales, siendo la combinación de enriquecimiento más PCR la que ofrece el mayor número de resultados positivos.

BIBLIOGRAFÍA

VI. BIBLIOGRAFÍA

- AABO S., RASMUSSEN O., ROSEEN L., SØRENSEN P., OLSEN J.** (1993). *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*. Volume 7, Issue 3, June 1993, Pages 171–178
- 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 Immunology & Medical Microbiology* Volumen 49, Issue 3, pages 337–345, April 2007
- ABREU R.;CASTRO B.;MADUEÑO A.;ESPIGARES E.;MORENO E.; MORENO P.; SANCHEZ JM.; ARIAS A.** (2013). Prevalencia de cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas en pollos de granjas avícolas de la isla de Tenerife (España). *Higiene y Sanidad Ambiental*, 13 (4): 1091-1096 (2013).
- ADAMS M.R.; M.O. MOSS** (1997). *Microbiología de los alimentos*. Ed. ACRIBIA S.A.; Zaragoza.
- AENOR, Asociación Española de Normalización y Certificación** (2003). UNE-EN ISO 6579. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. Visto el 4 de Febrero de 2014.
- www.aenor.es
- AENOR, Asociación Española de Normalización y Certificación** (2014). UNE-EN ISO 4833-1. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Parte 1: Recuento de colonias a 30°C mediante la técnica de siembra en profundidad. Visto el 4 de Febrero de 2014.
- www.aenor.es
- AGUILAR F.; ESCOLÁSTICA L.** (2003). Tesis. Caracterización fenotípica y genotípica de Estirpes de *Salmonella choleraesuis* aisladas en ambientes marinos. Visto el 18 de Mayo del 2014.
- http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/basic/flores_al/contenido.htm
- ALVAREZ ASTORGA M.;CAPITA R;CALLEJA C. A. ;MORENO B; GARCIA FERNANDEZM. C.** (2002). Microbiological quality of retail chicken by-products in Spain. *Meat Science* 62: 45–50 pages
- ATABAY H.I.; CORRY J.E.,** (1997). The prevalence of *campylobacters* and *arcobacters* in broiler chickens. *Journal of Applied Microbiology* 83, 619–626 pages.
- AYDIN F., GUMUSSOY K. S., ATABAY H. I., ICA T. and ABAY S.** (2007). Prevalence and distribution of *Arcobacter* species in various sources in Turkey and molecular analysis of isolated strains by ERIC-PCR. *Journal of Applied Microbiology* 103:27–35 pages.
- BALSALOBRE B.; HERNANDEZ J.,** (2004). Resistencias a antibióticos en *Listeria Monocytogenes* y *Salmonella* entérica en aislados de alimentos de origen animal. *Revista salud ambiental*: 4 (1-2):42-46 pages.
- BASTYNS K., CARTUYVELS D., CHAPPELLE S., VANDAMME P., GOOSSENS H. and 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, 353-356 pages.
- BERMUDEZ POLO; RODRIGUEZ JOVITA** (2001). *Cápítulo 71: Microbiología de productos cárnicos. En: Enciclopedia de la carne y de los productos cárnicos, Volumen II*. Ed: Ediciones Martin y Macías; Madrid : 1550-1560.
- BES, Boletín Epidemiológico Semanal (2013)**. Situación de las zoonosis en Europa. Informe de la Autoridad Europea de seguridad alimentaria (EFSA), 2013. Vol. 21 n.º 7 / 70-80 pp. Visto el 29 de Mayo del 2014.
- <http://revista.isciii.es/index.php/bes/article/viewFile/801/919>
- BES, Boletín Epidemiológico Semanal (2014)**. Situación de las zoonosis en Europa. Informe de la Autoridad Europea de seguridad alimentaria (EFSA), 2014. Vol. 22 n.º 5 / 43-55 pp. Visto el 29 de Mayo del 2014.

- http://www.google.es/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCIQFjAA&url=http%3A%2F%2Frevista.isciii.es%2Findex.php%2Fbes%2Farticle%2Fdownload%2F866%2F1016&ei=F4OwU_OTMqmV0AX4uoHQCQ&v6u=https%3A%2F%2Fs-v6exp1-ds.metric.gstatic.com%2Fgen_204%3Fip%3D84.126.220.135%26ts%3D1404076824352924%26auth%3Dwlfcap7h56yrr6h6t5lb3iiq3dmapsp6%26rndm%3D0.5757825756970241&v6s=2&v6t=2262&usg=AFQjCNFCqVD-XFPrzIDZUz6AJZg8mjWvIw

BES, Boletín Epidemiológico Semanal (2009). Infecciones por Salmonella no tifoidea de origen humano en España. Sistema de Información Microbiológica. Años 2000-2008. Vol. 17 nº 17/193-204 pp. Visto el 29 de Mayo del 2014.

- <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-sistema-informacion-microbiologica/BES20002008.pdf>

BOE, Agencia Estatal Boletín Oficial del Estado (2004). Reglamento (CE) nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. Referencia: DOUE-L-2004-81036. Visto el 16 de Mayo del 2014.

- <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2004-81036>

BOE, Agencia Estatal Boletín Oficial del Estado (2004). Reglamento (CE) nº 1441/2007 de la Comisión, de 5 de diciembre de 2007, que modifica el Reglamento (CE) nº 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Referencia: DOUE-L-2007-82244. Visto el 16 de Mayo del 2014.

- <http://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2007-82244>

BOLIVAR A.M.; ROJAS A.; GARCÍA L. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina*, vol. 3, núm. 1, enero-abril, 2014, 25-33 pages.

BOURGOIS C.M. ; J.F. MESCLE; J. ZUCCA (1994). MICROBIOLOGÍA ALIMENTARIA, Volumen I: Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria. Ed. ACRIBIA S.A.; Zaragoza.

BURCH D. (2011). RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS: IMPLICACIONES EN EUROPA SOBRE LA SALUD PÚBLICA Y LA VETERINARIA (II). *SUIS* Nº 82: 10-12 pages.

CALVO G., ARIAS M. A., FERNÁNDEZH. (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- 172 pages.

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)* USA, 2007.

COLLADO L. y FIGUERAS M.J. (2011). Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clinical Microbiology reviews* 24 (1):174-192 pages.

COLLADO L.; GUARRO J.; FIGUERAS M. (2009). Prevalence of *Arcobacter* in meat and shellfish. *Journal of Food Protection*. 72:1102-1106 pages.

COLLADO L; LEVICAN A; PEREZ J; FIGUERAS M.J. (2010) *Arcobacter defluvii* sp. Nov., isolated from sewage samples. *IJSEM (International Journal of Systematic and evolutionary microbiology)*. Visto el 12 de Mayo del 2014.

- <http://iis.sgmjournals.org/content/61/9/2155.long>

COLLINS C. I.; WESLEY I. V.; MURANO E. A. (1996). Detection of *Arcobacter* spp. in ground pork by modified plating methods. *Journal of Food Protection*. 59: 448- 452 pages.

D'AOUST J. Y. (1989). Salmonella spp. 327-445 In Michael P. Doyle. Ed. Foodborne Bacterial Patagens. Marcel Dekker, Inc., New York.

De BOER E.; TILBURG J. J.; WOODWARD D. L.; LIOR H.; JOHNSON W. M. (1996). A selective medium for the isolation of *Arcobacter* from meats. *Letters in Applied Microbiology*. 23: 64-66 pages.

EFSA, European Food Safety Authority (2014). The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2012. EFSA-Q-2013-00214. Visto el 8 de Mayo de 2014.

- <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3590.htm>

FERNANDEZ H; OTTH L; WILSON M; RODRIGUEZ R; PROBOSTE B; SALDIVIA C; BARRIA P, (2001) Occurrence of *Arcobacter* sp. in river water, mussels and commercial chicken livers in southern Chile. *International Journal of Medical Microbiology* -291,140 pages.

FRAZIER W.C.; WESTHOFF D.C. (1993, 4ª edición). Microbiología de los alimentos. Ed. Acribia S.A., Zaragoza.

GIBB A. P. y WONG S. (1998). Inhibition of PCR by agar from bacteriological transport media. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 275-276 pages.

GIMFERRER, N. (2008). "Uso de antibióticos en animales". Visto el 2 de Junio del 2014.

- <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2008/04/23/176394.php>

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

HESELBJERG, KJELDGAARD, CHRISTENSEN, INGMER (2013). Multilocus sequence typing and biocide tolerance of *Arcobacter butzleri* from Danish broiler carcasses. *BMC Research notes* 6: 322 pages.

HO HT, LIPMAL LJ, GAASTRA W (2006) *Arcobacter*, what is known about a potential foodborne zoonotic agent. *Veterinary Microbiology* 115:1–13 pages.

HOUF K, DEVRIESE L, De ZUTTER L, VAN HOOF J, y VANDAMME P. (2001) Susceptibility of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii* to Antimicrobial Agents Used in Selective Media. *Journal Clinical Microbiology* 2001. 39: 1654–1656.

JACOB J.;WOODWARD D., FEUERPFEL I. ; JOHNSON M. W.(1998). Isolation of *Arcobacter butzleri* in raw water and drinking water treatment plants in Germany. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin*. 201: 189-198 pages.

KERSHENOBICH D (2008). Enfermedades Emergentes. El ejercicio actual de la Medicina. Ed. UNAM.

LASTOVICA A. J.; SKIROW M. B.(2000). Clinical significance of *Campylobacter* and related species other than *Campylobacter jejuni* and *C. coli*, pages 89-120. In: Nachamkin, I. & Blaser, M. J. (ed.), *Campylobacter* 2nd Edition. ASM Press, Washington, D. C.

LERNER J.; BRUMBERGUER V.; PREAC M. (1994). Severe diarrhea associated with *Arcobacter butzleri*. *European Journal of Clinical Microbiology* 13, 660-662 pages.

LINTON D., OWEN J. y STANLEY J. (1996). Rapid identification by PCR of the genus *Campylobacter* and five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals. *Research Microbiology*. 147: 707-718 pages.

MAGRAMA, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio ambiente (2014). Indicadores económicos del sector vacuno, ovino, caprino y aves. Visto el 30 de Mayo del 2014.

- <http://www.magrama.gob.es/es/prensa/noticias/espa%C3%B1a-se-sit%C3%B1a-como-tercer-pa%C3%ADs-de-la-ue-en-producci%C3%B3n-de-carne-de-pollo-y-en-quinto-lugar-en-censo-y-producci%C3%B3n-de-carne-de-vacuno-/tcm7-328405-16>

MANSFIELD L. P.; FORSYTHE S. J.(2000). *Arcobacter butzleri*, *A. skirrowii* and *A. cryaerophilus* - potential emerging human pathogens. *Reviews in Medical Microbiology*. 11: 161-170 pages.

MARINESCU M.;COLLIGNON A.;SQUINAZI F.; WOODWARD D.;LIOR H.(1996). Biotypes and serogroups of poultry strains of *Arcobacter spp.* isolated in France. In: *Newell, D. G., Ketley, J. M. & Feldman, R. A. (ed.), Campylobacters, Helicobacters, and Related Organisms*. Plenum Press, New York.

MERGA J.Y., LEATHERBARROW A.J., WINSTANLEY C., BENNETT M., HART C.A., MILLER W.G. and WILLIAMS N.J. (2011). Comparison of *Arcobacter* isolation methods, and diversity of *Arcobacter spp.* in Cheshire, United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(5): 1646-50 pages

MULLIS, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*. 262: 56-65 pages.

NEILL S; CAMPBELL J; O'BRIAN J; WEATHERUP S; ELLIS W (1985). Taxonomic position of *Campylobacter cryoaerophila* species. *International journal of systematic and evolutionary microbiology (IJSEM)*,1985. 35:342-356 pages

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. Visto el 9 de Junio del 2014.

- http://www.who.int/foodsafety/publications/general/en/strategy_es.pdf

OMS, World Health Organization (2012). Resistencia a los antimicrobianos (RAM). Nota descriptiva N°194. Visto el 1 de Junio del 2014.

- <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>

OMS, World Health Organization (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Visto el 2 de Junio del 2014.

- <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>

ON S. L. W.; STACEY, A.; SMITH J.(1995). Isolation of *Arcobacter butzleri* from a neonate with bacteriemia. *Journal of infection*. 31: 225-227. Visto el 13 de Mayo del 2014.

ORDEN GUITIERREZ J.A.; DE LA FUENTE LÓPEZ R., (2001). Repercusiones en la salud pública de la resistencia a quinolonas en bacterias de origen animal. *Revista española de salud pública*. Visto el 2 de Junio del 2014

- http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-57272001000400005

PALM G., LEDERER T., ORTH P., SAENGER W., TAKAHASHI M., HILLN W., HINRICHS W. (2008). Specific binding of divalent metal ions to tetracycline and to the Tet repressor/tetracycline complex. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 13:1097–1110 pages.

PASCUAL ANDERSON M. R. (1989). MICROBIOLOGÍA ALIMENTARIA: Detección de bacterias con significado higiénico sanitario. Ed. Centro Nacional de Alimentación, Majadahonda. Instituto de Salud Carlos III.

PASCUAL ANDERSON M. R. (2005). Enfermedades de origen Alimentario. Su prevención. Ed. Díaz de Santos S.A.; Madrid.

PASCUAL ANDERSON M. R.; CALDERÓN Y PASCUAL V. (2000; segunda edición). MICROBIOLOGÍA ALIMENTARIA: Metodología analítica para alimentos y bebidas. Ed. Díaz de Santos S.A.; Madrid.

PENTINALLI, DE SANTOS, GONZALEZ (2008). Detección específica de *Arcobacter Butzleri* en carne de pollo mediante una técnica de PCR. ISSN: 1988-2688; RCCV Vol. 2 (2). 2008.

PUIG Y.; ESPINOSA M.; LEYVA V.; KELY T.; ZAGOVALOS; MENDEZ D.; SOTO P.; FERRER Y. (2007). Susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Salmonella spp.* de origen clínico y alimentario. *Revista Panamericana de Infectología* 9(3):12-16 pages.

RAHIMI (2013). Prevalence and antimicrobial resistance of *Arcobacter* species isolated from poultry meat in Iran. Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK.

RICE E. W.; RODGERS M. R.; WESLEY I. V.; JOHNSON C. H. ; TANNER S. A.(1999). Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water. *Letters in Applied Microbiology* 28, 31-35 pages.

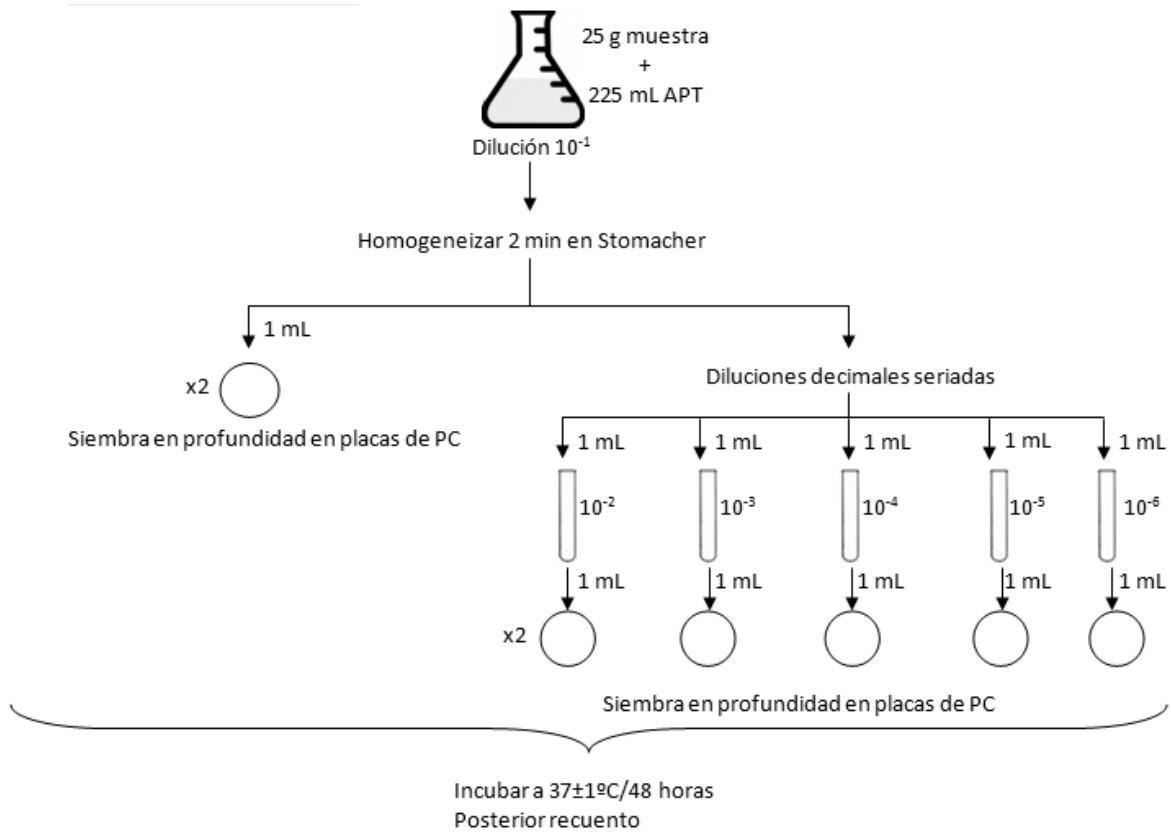
SCULLION R.; C. S. HARRINGTON; R. H. MADDEN (2006). Prevalence of *Arcobacter spp.* in raw milk and retail raw meats in Northern Ireland. *Journal of Food Protection* 69, 1986–1990 pages.

TAYLOR C.D.; WIRSEN C.O. and GAILL F. (1999). Rapid microbial production of filamentous sulfur mats at hydrothermal vents. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2253-2255 pages.

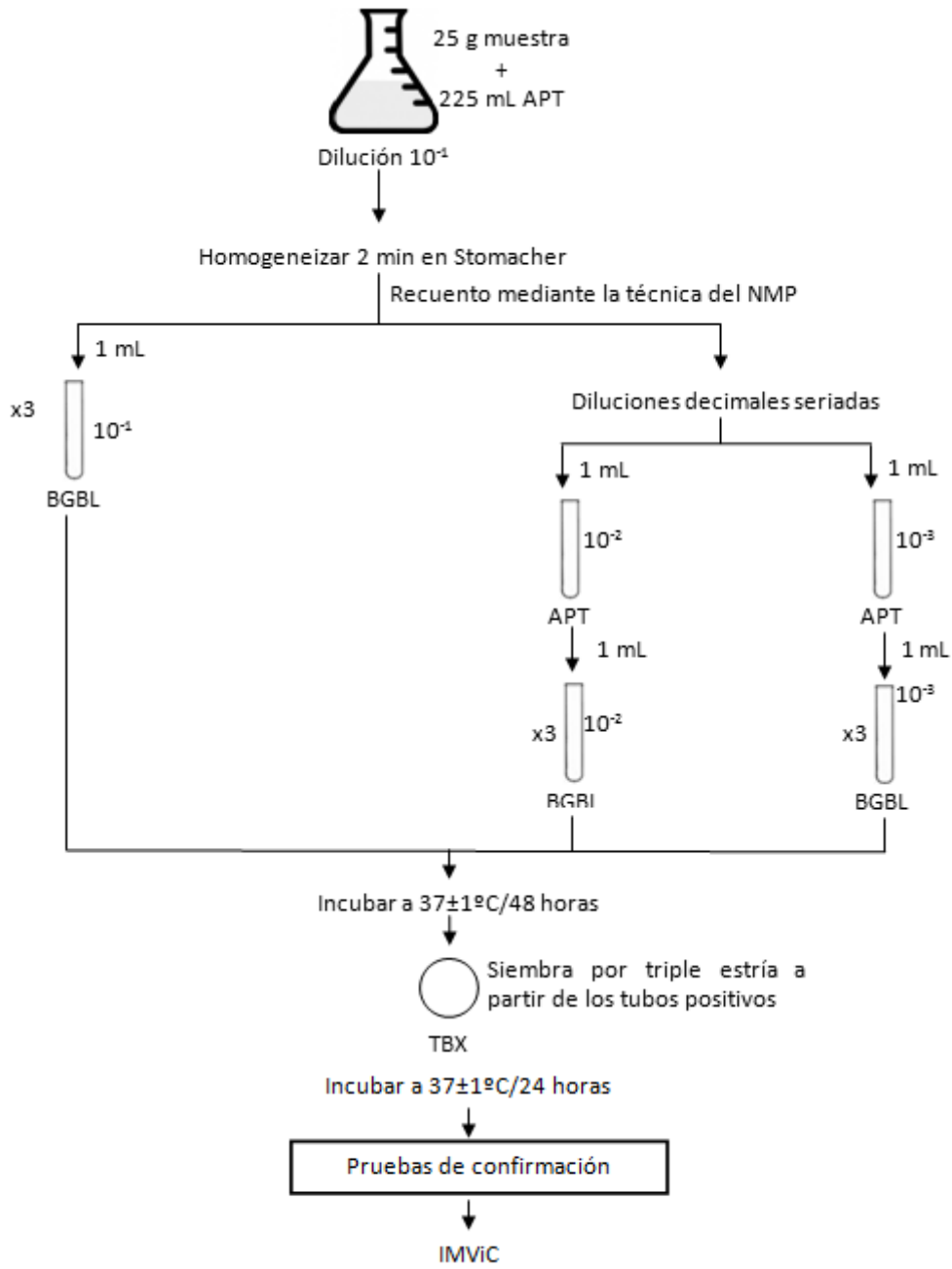
- TORRES C.; ZARAZAGA M.** (2002). Antibióticos como promotores del crecimiento en animales ¿Vamos por el buen camino? *Gaceta Sanitaria*.2002; 16(2):109-12 pages.
- TORRES C.; ZARAZAGA M.** (2007). BLEE en animales y su importancia en la transmisión a humanos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2007;25S:29-37.
- VAN DRIESSCHE E.; HOUF K.; VANGROENWEGHE F.; De ZUTTER L.; VAN HOOFF J.,** (2005). Prevalence, enumeration and strain variation of *Arcobacter* species in the faeces of healthy cattle in Belgium. *Veterinary Microbiology* 105(2), 149-154 pages.
- VANDAMME P; DE LEY J.** (1991).Proposal for a New Family, *Campylobacteraceae*. *International Journal Systematic Bacteriology* 41: 451-455 pages.
- VANDAMME P.; PUGINA P.; BENZI G.; VAN ETTERIJK R.; VLAES L.; KERSTERS K.; BUTZLER J. P., LIOR H.; LAUWERS S.** (1992). Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian school. *Journal Clinical Microbiology* 30, 2335-2337 pages.
- VILCHEZ 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; 29:6-12 pages.
- WAAGE A. S.; VARDUND T.; LUND V. y 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*. 65: 1636-1643 pages.
- WESLEY & MILLER G.** (2010). *Arcobacter* an opportunistic human food-borne pathogen?, In: Scheld, W.M., Grayson, M.L., Hughes, J.M., editors. *Emerging Infections* 9. Washington, DC: *American Society for Microbiology Press*. 2010: 185-211 pages.
- WESLEY I. V.;WELLS S. J.; HARMON K. M.; GREEN A.; SCHROEDER-TUCKER L.;GLOVER M.; SIDDIQUE I.**(2000). Fecal shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter spp.* in dairy cattle. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 1994-2000 pages.
- WIRSEN C; SIEVER S; CAVANAUGH C; MOLYNEAUX S; AHMAD A; TAYLOR L** (2002). Characterization of an autotrophic sulfide-oxidizing marine *Arcobacter* species that produces filamentous sulfur. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 316 -325 pages.
- YAN, J.J., KO, W.C., HUANG, A.H., CHEN, H.M., JIN, Y.T. and WU, J.J.** (2000) *Arcobacter butzleri* bacteremia in a patient with liver cirrhosis. *Journal of the Formosan Medical Association* 99, 166-169 pages.
- ZHAO, GE, DE VILLENA, SUDLER, YEH, ZHAO, WHITE, WAGNER AND MENG** (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*, Dec. 2001, P. 5431–5436. Vol. 67, No. 12.

ANEJOS

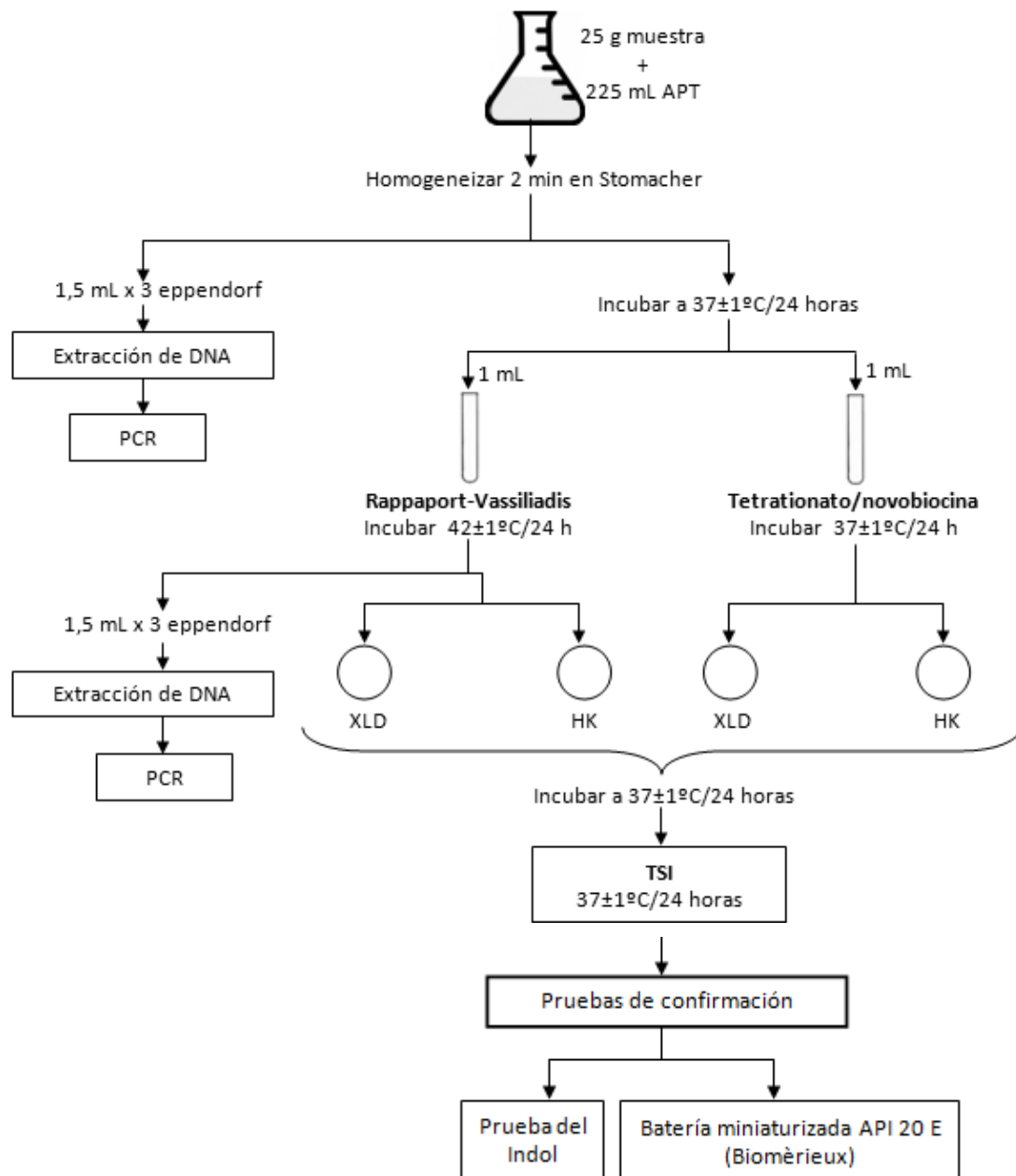
ANEJO 1: Esquema para el análisis microbiológico de aerobios mesófilos



ANEJO 2: Esquema para el análisis microbiológico de *Escherichia coli*



ANEJO 3: Esquema para el análisis microbiológico de *Salmonella*



ANEJO 4: Esquema para el análisis microbiológico de *Arcobacter*

