



Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas,  
Químicas y Naturales. Secretaría de Investigación y Postgrado. Maestría  
en Salud Pública y Enfermedades Transmisibles.

Maestrando  
***Bqco. Pablo Nicolás Capaccio***

**Caracterización microbiológica de chacinados y  
su relación con las condiciones higiénico-  
sanitarias y prácticas de elaboración en  
establecimientos de la provincia de Misiones.  
Prueba piloto de una herramienta basada en  
auditoría de las buenas prácticas de  
manufactura como predictor de riesgo**

**Tesis de Maestría presentada para obtener el título de “Magíster  
en Salud Pública y Enfermedades Transmisibles”**

“Este documento es resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto  
queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899”.

Director  
***Mg. Bqco. Ramón Alejandro Martínez***

**Posadas, Misiones 2018**



Esta obra está licenciado bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-  
CompartirIgual 4.0 Internacional. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



Universidad Nacional de Misiones  
Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales  
Maestría en Salud Pública y Enfermedades Transmisibles

**Caracterización microbiológica de chacinados  
y su relación con las condiciones  
higiénico-sanitarias y prácticas de elaboración en  
establecimientos de la provincia de Misiones.  
Prueba piloto de una herramienta basada en  
auditoría de las buenas prácticas de manufactura  
como predictor de riesgo.**

**Autor: Bqco. Pablo Nicolás Capaccio**

**Director: Mg. Bqco. Ramón Alejandro Martínez**

**POSADAS, ARGENTINA 2018**

A Ingrid, Anabella, Agustín y Tiago, soles de mis amaneceres.

A mi madre, mi padre y su estrella.

A mis compañeros de caminos.

## **EVALUADORES QUE APROBARON LA TESIS**

Mgter. Amada Beatriz Pucciarelli Roman.

Dra. Martha Helena von Specht.

Dra. Lucrecia Acosta Soto.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Alejandro Martínez, director y amigo, por su guía y colaboración en este proyecto.

A todo el personal del Laboratorio de Alimentos, especialmente a quienes colaboraron en el procesamiento de las muestras incluidas en esta investigación.

A Débora López, por su asesoramiento en aspectos metodológicos de microbiología.

A Federico Payes, que acompañó el cambio de paradigma en la inspección desde la conducción de la División de Alimentos, y en su nombre, extensivo a todas las personas que acompañaron desde el Ministerio de Salud Pública de Misiones.

A "Ruso" y Fernando, por creer y hacer posible esta Maestría.

A todo el equipo docente por su dedicación, paciencia y compromiso.

A los evaluadores, por aportar a hacernos mejores maestrandos.

A mis compañeros de Maestría, por los buenos momentos compartidos.

A mi Familia, fundamentalmente, por brindarme su amor, prestarme su tiempo, y llenarme de energías y esperanzas para recorrer este camino.

## RESUMEN

Los productos cárnicos se han asociado a brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) globalmente. En Misiones (Argentina) no se documentan investigaciones referidas a su calidad microbiológica (CM) y condiciones de elaboración. Las buenas prácticas de manufactura (BPM) previenen los peligros para la inocuidad alimentaria y se insertan en el cambio de paradigma de inspección a auditorías de establecimientos, siendo necesario incluir una herramienta para su evaluación y categorización del riesgo.

El objetivo de este estudio fue caracterizar microbiológicamente a chacinados y establecer su relación con condiciones higiénico-sanitarias y prácticas de elaboración en establecimientos de Misiones, probando una herramienta basada en auditoría de BPM como predictor de riesgo.

Se realizaron auditorías a 28 establecimientos. Se analizaron microbiológicamente 105 productos según metodología oficial. Se halló CM “aceptable” en 74,3% (n=105) de los productos, siendo los “cocidos” los que presentaron más dificultades, con recuentos elevados de mohos-levaduras como indicador mayormente incumplido y *Listeria monocytogenes* en un solo caso. No se halló *Salmonella spp.* En establecimientos, el cumplimiento de BPM promedio fue de 68,6% (n=28), con menor adherencia en “control de procesos, procedimientos y registros” (promedio 47,6%; n=28). Se demostró asociación estadísticamente significativa (Test Fischer,  $p < 0,05$ ) entre: CM y riesgo de establecimiento ( $p < 0,0001$ ), CM y nivel de industrialización ( $p = 0,0023$ ), CM y potabilidad de agua ( $p = 0,0172$ ).

Los hallazgos de esta investigación evidencian la importancia del estudio de las ETA y la vigilancia sanitaria de estos alimentos en la región. Asimismo, la categorización de riesgo es un aporte para la gestión de la seguridad alimentaria.

## ABSTRACT

Processed meats have been globally associated with outbreaks of foodborne diseases (FBD). In Misiones (Argentina), there is no documented research related to their microbiological quality (MQ) and processing conditions.

Good Manufacturing Practices (GMP) prevent hazards for food safety and are inserted in the change of inspection paradigm to audits, being necessary to include a tool for evaluation and categorization of the risk of establishments.

This research aims to characterize processed meats microbiologically and establish their relationship with hygienic-sanitary conditions and manufacturing practices in Misiones factories, testing a tool based on GMP audit as a risk predictor.

Audits were conducted in 28 processed meat factories. One hundred and five products were collected and analyzed microbiologically, according to official methodology. MQ "acceptable" was found in 74.3% (n=105) of the products, being the "cooked" those that presented more difficulties, with high count of molds and yeasts as indicator mostly unfulfilled and *Listeria monocytogenes* in only one case. *Salmonella spp.* was not found.

In factories, the average compliance of GMP was 68.6% (n=28), with less adherence in "control of processes, procedures and records" (average 47.6%, n=28). A statistically significant association was demonstrated (Test Fischer,  $p < 0.05$ ) between: MQ and risk of establishment ( $p < 0.0001$ ), MQ and industrialization level ( $p = 0.0023$ ), MQ and potability of water ( $p = 0.0172$ ).

The findings of this research show the importance of the study of FBD and the sanitary surveillance of these foods in the region. Likewise, the categorization of risk is a contribution to the management of food security.

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ANMAT: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica

APPCC: Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos

ASJ: Autoridad Sanitaria Jurisdiccional

BPM: Buenas Prácticas de Manufactura

CAA: Código Alimentario Argentino

CDC: Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention)

CM: Calidad Microbiológica

EHEC: *Escherichia coli* productora de toxina Shiga o verotoxigénica (STEC)

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

GMC: Grupo Mercado Común

HACCP: siglas del APPCC en inglés (Hazards Analysis Critical Control Point)

ICMSF: Comisión Internacional sobre Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos

INDEC: Instituto Nacional de Estadísticas y Censos

IPEC: Instituto Provincial de Estadísticas y Censos de Misiones

ISO: Organización Internacional de Normalización

MERCOSUR: Mercado Común del Sur (Argentina, Brasil, Paraguay, Uruguay y Venezuela)

MIP: Manejo Integrado de Plagas

NMP: Número Más Probable

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

PFCA: Programa Federal de Control del Alimentos

POE: Procedimientos Operacionales Estandarizados

POES: Procedimientos Operacionales Estandarizados de Saneamiento

SAGyP: Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca

SE: Semana Epidemiológica

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

SIFEGA: Sistema de Información Federal para la Gestión del Control de los Alimentos

SPRel: Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos

SUH: Síndrome Urémico Hemolítico

TICs: Tecnologías de la Información y las Comunicaciones



## INDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I .....	13
1. INTRODUCCION.....	13
1.1. Las enfermedades transmitidas por alimentos y los chacinados como productos involucrados.....	13
1.2. El papel de los organismos de control de la inocuidad de los alimentos y las buenas prácticas de manufactura en la industria alimenticia. ....	15
2. ALCANCES Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	18
3. FORMULACIÓN DE LAS PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN A MODO DE INTERROGANTE.....	20
4. OBJETIVOS.....	21
4.1. Objetivo general. ....	21
4.2. Objetivos específicos. ....	21
5. JUSTIFICACIÓN. ....	22
CAPITULO II .....	24
1. ANTECEDENTES O REVISION DE LA LITERATURA. ....	24
1.1. Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA). ....	24
1.2. Los microorganismos indicadores y los microorganismos patógenos. ....	25
1.3. La contaminación de los productos cárnicos.....	28
1.4. Los chacinados y su control microbiológico. ....	29
1.5. Las ETA y los productos cárnicos. ....	31
1.6. Legislación y control: buenas prácticas de manufactura e inspección basada en el riesgo / auditorías. ....	34
CAPITULO III .....	39
1. METODOLOGIA.....	39
a.  Ámbito de estudio. ....	39
b.  Población.....	39

c.	Tipo de estudio y diseño.....	40
d.	Análisis de sesgos. ....	41
e.	Selección de técnica e instrumento de recolección de datos. Fuentes primarias y secundarias. Prueba piloto del instrumento. ....	41
f.	Análisis de los resultados. ....	42
g.	Procedimientos para garantizar aspectos éticos de la investigación. ....	42
2.	MATERIALES Y MÉTODOS. ....	43
a.	Tareas preliminares. ....	43
b.	Toma de muestras. ....	43
c.	Caracterización del producto chacinado (*). ....	44
d.	Análisis de laboratorio. ....	44
e.	Caracterización del tipo de elaboración de chacinados. ....	48
f.	Determinación de las condiciones higiénico- sanitarias y prácticas de elaboración. ....	48
3.	INFORMACION PRELIMINAR .....	50
4.	RESULTADOS y DISCUSION.....	51
5.	CONCLUSIONES.....	67
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	68
CAPITULO IV .....		75
PROPUESTAS DE TRABAJOS FUTUROS Y/O RECOMENDACIONES. ....		75
ANEXOS .....		76
ANEXO 1: ACTA DE AUDITORIA .....		76
ANEXO 2: DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA .....		80
ANEXO 3: Preparación de la muestra, suspensión inicial y diluciones. Según ISO 6887-1:1999. ....		81
ANEXO 4: Recuento de aerobios mesófilos (UFC/g) a 30°C. Según ISO 4833-2:2013. ....		82
ANEXO 5: Recuento de <i>Escherichia coli</i> NMP/g. Según ICMSF Método 1 .....		83
ANEXO 6: Recuento de <i>Escherichia coli</i> NMP/g. Según ISO 16649-2:2001.....		83

ANEXO 7: Recuento de Estafilococos coagulasa positiva (UFC/g). Según ISO 6888-1: 1999.	84
ANEXO 8: Recuento de mohos y levaduras (UFC/g) según ISO 21527- 2:2008. ....	88
ANEXO 9: Recuento de anaerobios sulfito reductores (UFC/g) según ISO 15213:2003.....	90
ANEXO 10: <i>Salmonella spp</i> según ISO 6579:2002; Co 2004.....	92
ANEXO 11: <i>Listeria monocytogenes</i> según ISO:11290- 1:1996 . ....	95
ANEXO 12: Cálculo y expresión de los resultados (ISO 7218:2007) .....	100

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Parámetros microbiológicos en chacinados, sus límites de aceptación y metodología de análisis.....	45
<b>Tabla 2.</b> Subgrupos de buenas prácticas de manufactura (BPM) incluidos en el acta de auditoría, puntaje parcial ponderado y su aporte al puntaje total. ....	50
<b>Tabla 3.</b> Clasificación de los chacinados, denominaciones de productos y cantidades analizadas (n=105). ....	52
<b>Tabla 4.</b> Comparación de los diferentes tipos de chacinados según los resultados “No aceptables” en los parámetros microbiológicos estudiados.. ....	55

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ubicación geográfica de los 15 municipios donde se emplazan los 28 establecimientos elaboradores de chacinados en Misiones. ....	51
<b>Figura 2.</b> Tipo de chacinados elaborados en Misiones (n=105).....	52
<b>Figura 3.</b> Distribución de los establecimientos elaboradores de chacinados en Misiones según el tipo de elaboración (n=28).....	53
<b>Figura 4.</b> Cantidad de productos elaborados (tipos) por establecimiento (n=28).....	53
<b>Figura 5.</b> Calidad microbiológica de los chacinados elaborados en Misiones (n=105).....	54
<b>Figura 6.</b> Calidad microbiológica de los chacinados según tipo de elaboración (n=105). ....	54
<b>Figura 7.</b> Calidad microbiológica en los diferentes tipos de chacinados analizados (n=105).....	55
<b>Figura 8.</b> Distribución de los parámetros microbiológicos con límites excedidos de acuerdo con el número de muestras no aceptables (n=36).....	56
<b>Figura 9.</b> Distribución de frecuencias de cantidad de parámetros microbiológicos con valores no aceptables para los diferentes productos analizados (n=105). ....	59
<b>Figura 10.</b> Categorización del riesgo de los establecimientos elaboradores de chacinados de Misiones en base al porcentaje de adherencia a las buenas prácticas de manufactura (BPM) (n=28). ....	59
<b>Figura 11.</b> Distribución de los productos en base a calidad microbiológica en relación con el porcentaje de cumplimiento de buenas prácticas de manufactura (BPM) y riesgo del establecimiento elaborador. (n=105) .....	60

<b>Figura 12.</b> Distribución del porcentaje de cumplimiento de las buenas prácticas de manufactura (BPM) con relación al tipo de elaboración de los establecimientos (n=28). .....	61
<b>Figura 13.</b> Distribución porcentual de los diferentes riesgos estimados en los establecimientos auditados de acuerdo con el tipo de elaboración (n=28). .....	62
<b>Figura 14.</b> Porcentaje de adherencia de los establecimientos para cada subgrupo en referencia a las buenas prácticas de manufactura (BPM) (n=28). .....	62
<b>Figura 15.</b> Porcentaje de adherencia a las buenas prácticas de manufactura (BPM) de los establecimientos – subgrupo “Control de procesos, procedimientos y registros” - según el tipo de elaboración (n=28). .....	63
<b>Figura 16.</b> Porcentaje de adherencia a las buenas prácticas de manufactura (BPM) de los establecimientos – subgrupo “Condiciones generales”- según el tipo de elaboración (n=28). .....	64
<b>Figura 17.</b> Porcentaje de adherencia a las buenas prácticas de manufactura (BPM) de los establecimientos - subgrupo “Personal”- según el tipo de elaboración (n=28). .....	64
<b>Figura 18.</b> Potabilidad del agua disponible en los Establecimientos elaboradores de Chacinados de la provincia de Misiones (n=28). .....	65

## CAPÍTULO I

### 1. INTRODUCCION.

#### 1.1. Las enfermedades transmitidas por alimentos y los chacinados como productos involucrados.

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) representan un serio problema para la salud de la población, el bienestar social y la economía, pero se ha subestimado a menudo debido a la infranotificación y a la dificultad para establecer una relación de causalidad entre las contaminaciones de alimentos y las enfermedades o muertes por ellas provocadas. Aunque pueden afectar a cualquier persona, es de destacar que estos casos siempre involucran a los grupos más vulnerables, siendo mayormente susceptibles los niños, las mujeres embarazadas, las personas inmunosuprimidas y los adultos mayores de todos los estratos sociales, pero cobrando mayor dimensión en un contexto donde la carencia de recursos, tanto alimentarios (incluida el agua potable) como de saneamiento básico, crean un círculo vicioso de enfermedad y malnutrición.

El informe “Estimación de la carga mundial de las ETA” publicado en 2015 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es el primero en ofrecer estimaciones completas sobre la carga de morbilidad causada por 31 agentes contaminantes (bacterias, virus, parásitos, toxinas y productos químicos) a nivel mundial y regional (1). Según la OMS, los alimentos insalubres están relacionados con la muerte de aproximadamente 2 millones de personas al año, en su mayoría niños. Los alimentos que contienen bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas nocivas causan más de 200 enfermedades, que van desde la diarrea hasta el cáncer (2).

Las ETA son causadas por el consumo de agua o alimentos contaminados con agentes biológicos (bacterias, virus, parásitos, hongos), químicos (alérgenos, residuos de medicamentos, agroquímicos, toxinas, etc.) o físicos (metales, vidrio, tierra, etc.). Dichos agentes se denominan peligros, y pueden llegar a los alimentos en cualquier momento, desde la producción primaria (agricultura, ganadería, o pesca), durante todo el proceso de elaboración, en el transporte, la distribución, la comercialización y la preparación, hasta el tiempo en que son consumidos, por lo que, durante toda esta cadena, es necesario resguardar al alimento, brindando un ambiente básico y condiciones operacionales necesarias para lograr un alimento inocuo y saludable. Ello lo proporcionan las buenas prácticas de manufactura (BPM), que son una serie de prácticas y procedimientos claves para lograr la inocuidad de los alimentos.

Son muy diversos los alimentos asociados a las ETA, siendo sus características intrínsecas determinantes en la contaminación y proliferación de bacterias. Se consideran alimentos de alto riesgo a aquellos que favorecen el crecimiento microbiano, sobre todo si se trata de bacterias patógenas. Suelen ser ricos en proteínas y poseen un cierto grado de humedad. Entre éstos se encuentra a las carnes, pescados, leche, huevos y sus productos derivados. Por su peligrosidad, este grupo de alimentos necesitan las máximas precauciones cuando son manipulados a lo largo de toda la cadena productiva (3).

El sector porcino en Argentina se caracteriza por presentar una gran heterogeneidad, tal es así que en la producción primaria poco más del 95% de los productores de cerdos son pequeños a medianos (desde menos de 10 madres a 250 madres). Al considerar la industria procesadora de carne, se evidencia que alrededor del 65% de la faena se encuentra en manos de tan solo las diez principales firmas. La región "Pampeana" genera el 90% de la producción, seguida por "Cuyo" con 6%, y las regiones "Nordeste" y "Noroeste" con menos de 2%, destacándose las provincias de Misiones con 1% y Salta con 0,6%; la región "Patagonia" solamente participa con 0,6%.

El punto de inicio de la cadena porcina es la producción primaria (granjas). El eslabón de la industria está constituido por el frigorífico (matadero frigorífico, matadero municipal y matadero rural) encargado de la faena y/o desposte de los animales, y por la industria elaboradora de chacinados y salazones. En el país hay 178 plantas frigoríficas habilitadas con actividad registrada (2010) y 392 plantas procesadoras de chacinados y salazones, pero también existen cientos de plantas elaboradoras que no cuentan con habilitación (4).

La industria de productos cárnicos en nuestro país nació con características artesanales, que pasaron a ser bien específicas a inicios del siglo XX, lo que la diferenció de la industria frigorífica. Esa actividad, familiar y doméstica en sus comienzos, dio origen a la comercialización de los "fiambres", con una aceptación inmediata del público, convirtiéndose posteriormente en una industria con un mercado amplio y exigente. Su propósito es transformar los cortes porcinos en productos con alto valor agregado, a través de distintos procedimientos de conservación como el salado, ahumado, secado y enfriado. Al considerar el tipo de elaboración dentro del estrato de menor tamaño, coexisten firmas de elaboración artesanal e industrial. Entre las primeras, los embutidos secos y frescos concentran el 60% de lo producido. Estos productos son elaborados en base a "viejas recetas familiares" que no requieren de técnicas sofisticadas ni de equipamiento excesivamente costoso. En las firmas pequeñas que producen en forma industrial, la variedad de productos es mayor, siendo los principales los embutidos cocidos (37%), las salazones secas

(27%) y las salazones cocidas (23%), mientras que las firmas medianas procesan fundamentalmente embutidos secos (44%) y salazones cocidas (34%), y en menor medida embutidos cocidos y salazones secas. En el estrato de mayor tamaño la producción se divide casi en partes iguales entre los embutidos secos (salames, salamines), los embutidos cocidos (mortadela, salchicha) y las salazones cocidas (jamón, paleta), si bien elaboran, en muy baja proporción, no embutidos frescos (hamburguesas, cuya materia prima es la carne bovina) (4).

La provincia de Misiones se caracterizó por una masiva afluencia de inmigrantes de distintos lugares del mundo durante el siglo pasado: hacia fines de la década de 1940, convivían numerosas etnias, confesiones religiosas y nacionalidades (5). Los nuevos pobladores trajeron consigo costumbres culinarias, y desde entonces se inició la producción local de alimentos cárnicos (chacinados y salazones) especialmente en el seno de las familias europeas, a partir de recetas ancestrales, primero en sus comunidades, para luego extenderse a todo el territorio. En la actualidad el consumo de estos alimentos está arraigado en toda su población: existen desde pequeñas salas de elaboración artesanal, con escasa producción y comercialización local, hasta importantes industrias que abastecen toda la provincia, e incluso se comercializan en otros puntos del país.

Los alimentos más frecuentemente involucrados en los brotes de ETA son los de origen animal (6). Aun no se documentan investigaciones de brotes de ETA en Misiones, de los alimentos implicados ni tampoco estudios acerca de los derivados cárnicos, que muestren un conocimiento de sus características microbiológicas ni sobre sus condiciones, prácticas o tipos de elaboración.

## **1.2. El papel de los organismos de control de la inocuidad de los alimentos y las buenas prácticas de manufactura en la industria alimenticia.**

La declaración de Alma Ata (URSS, 1978) mostró al mundo la grave desigualdad existente en el estado de salud de la población, siendo considerada como política, social y económicamente inaceptable, y confirmó a la promoción y protección de la salud del pueblo como indispensable para un desarrollo económico y social sostenido, contribuyendo a mejorar la calidad de la vida de las personas. La atención primaria de la salud se orienta hacia los principales problemas de salud de la comunidad y presta los servicios de promoción, prevención, tratamiento y rehabilitación necesarios para resolver esos problemas. Por ello todos los gobiernos deben formular políticas, estrategias y planes de acción nacionales, con objeto de iniciar y mantener la atención primaria de



salud como parte de un sistema nacional de salud completo y en coordinación con otros sectores (7).

Las funciones esenciales de salud pública (FESP) son un conjunto de acciones y capacidades destinadas a proteger y mejorar la salud de la población, y representan un componente relevante de las políticas de salud que buscan dar respuesta a los desafíos de los sistemas de salud en un contexto de reformas sectoriales que limitan el ejercicio de la función rectora de las autoridades sanitarias. Estas funciones comprenden: el seguimiento, la evaluación y el análisis de la situación de salud (FESP 1); la vigilancia de la salud pública, la investigación y control de riesgos en salud pública (FESP 2); la promoción de la salud (FESP 3); la participación de los ciudadanos en la salud (FESP 4); el desarrollo de políticas y capacidad institucional de planificación y gestión en materia de salud pública (FESP 5); el fortalecimiento de la capacidad institucional de regulación y fiscalización en materia de salud pública (FESP 6); la evaluación y promoción del acceso equitativo a los servicios de salud necesarios (FESP 7); el desarrollo de recursos humanos y capacitación en salud pública (FESP 8); la garantía y el mejoramiento de la calidad de los servicios de salud individuales y colectivos (FESP 9); la investigación en salud pública (FESP 10); y la reducción del impacto de las emergencias y desastres en la salud (FESP 11) (8). Por ello se hace necesario analizar el rol del Estado en la salud pública y abordar la problemática de las ETA abarcando la mayor parte de estos aspectos, en el contexto de sostener los procesos de transformación de los sistemas de salud hacia la salud universal.

Los derechos humanos básicos promovidos por la OMS guardan relación con la inocuidad y la calidad de los alimentos. En la “Cumbre Mundial sobre la Alimentación” (FAO, 1996), se destacó el derecho a la alimentación definido como “el derecho de toda persona a tener acceso a alimentos sanos y nutritivos” (9). Por ello es deber de los Estados nacionales elaborar y poner en práctica sistemas apropiados de control de la calidad e inocuidad de los alimentos, velar por el bienestar de la población y proveerla de alimentos inocuos en cantidad suficiente.

A fin de asegurar la inocuidad de los alimentos a lo largo de toda la cadena alimentaria es necesario innovar e introducir mejoras constantemente en los sistemas nacionales de control de los alimentos, basando las reglamentaciones en el riesgo. La herramienta para garantizar la inocuidad de los alimentos que se producen, elaboran, transportan, manipulan, comercializan y expenden en la Argentina, son las BPM, en vigencia desde la resolución del Mercosur 80/96, incorporada al Código Alimentario Argentino (CAA), Ley 18284, en 1997 (10). Es decir que todas las empresas relacionadas a alimentos deben basarse en estas prácticas en cada uno de los procesos en las

que intervienen. Pero, al mismo tiempo, es necesario un mecanismo de fiscalización efectivo que garantice el cumplimiento de dichas reglamentaciones.

Por tratarse de un país federal, el control de la inocuidad de los alimentos en la República Argentina se basa en la articulación entre los organismos responsables de la aplicación del CAA del nivel municipal, provincial y nacional. Por ello resulta vital lograr consensos sostenibles en el tiempo y acordar políticas sanitarias comunes. El "Programa Federal de Control de Alimentos" (PFCA) promueve este objetivo, fortaleciendo al "Sistema Nacional de Control de Alimentos" (SNCA) en su misión de velar por la salud de la población, asegurando la inocuidad, salubridad y sanidad de aquellos productos que estén bajo su competencia, los materiales que están en contacto directo con los mismos, las materias primas, envases, aditivos, ingredientes y rotulados. Uno de los pilares del PFCA es el de auditoría alimentaria basada en el análisis de riesgos, con un enfoque preventivo. Este paso del enfoque "reactivo" de la inspección tradicional al "preventivo" en lo que respecta a los riesgos en materia de inocuidad de los alimentos está sujeto a un consenso general internacional, y requiere que los inspectores tengan la capacidad para analizar los procesos y evaluar la pertinencia y la eficacia de diferentes vías para lograr resultados positivos en materia de inocuidad alimentaria, en lugar de controlar simplemente el cumplimiento de las disposiciones prescriptivas.

Las auditorías reemplazan a las actividades de inspección que se realizaban tradicionalmente, donde se identificaban algunos de los problemas visibles en el momento de la inspección, que no siempre reflejaban la realidad del establecimiento, y buscan obtener información sistemática sobre inocuidad de los alimentos en un contexto específico, ofreciendo así una "visión de conjunto" de una situación determinada, proporcionando datos que se utilizarán en la planificación basada en el riesgo (11). Una auditoría es una actividad planificada y organizada, basada en reglas y directrices previamente establecidas y requiere de herramientas para seguir una secuencia organizada sin dejar ningún punto clave de lado, teniendo presente el flujograma de los productos que elabora el establecimiento y las BPM.

En la antigua concepción del control de los alimentos, las actividades de inspección se centraban en la toma de muestras y el análisis de los productos finales para determinar su conformidad con los reglamentos, pero actualmente, se considera una estrategia más costo-efectiva centrarse en actividades de inspección que garanticen el cumplimiento de sistemas de gestión de la inocuidad de los alimentos y prevengan la aparición de peligros y riesgos a lo largo de la cadena agroalimentaria, evitando la ocurrencia de ETA. Durante la auditoría se podrán detectar

conformidades y no conformidades a partir de las observaciones y algunas a partir de mediciones *in situ* (ej., temperatura, pH). Para verificar lo que, a simple vista y a través del estudio de algunos parámetros, parece adecuado o inadecuado respecto de las BPM, respectivamente, se cuenta con el laboratorio de control de alimentos.

En Misiones, solamente existen dos laboratorios oficiales de control de alimentos habilitados, uno provincial y uno municipal, y ambos se encuentran en la ciudad de Posadas, al sur de la provincia, relegando la accesibilidad y oportunidad al momento de utilizar al laboratorio como medio para el cuidado de la inocuidad al resto de los municipios, quienes solamente poseen los programas de inspección como base del sistema de cumplimiento de la normativa para la prevención de las ETA en sus comunidades y para el resto de las acciones en el marco de la gestión de la seguridad alimentaria, por lo que cobra un valor indispensable avanzar en la implementación de auditorías de las BPM. Además, es necesario dar eficiencia y eficacia a los sistemas de gestión, primando las acciones de control de establecimientos en base al mayor riesgo. Por ello, se torna oportuno categorizar a los establecimientos elaboradores de acuerdo con el riesgo que impliquen, actuando de manera preventiva ante las ETA.

En sintonía con el PFCA, desde la gestión de la “División de Alimentos del Ministerio de Salud Pública de Misiones”, en el año 2013 se tomó la decisión de efectivizar el cambio de paradigma de la inspección tradicional al modelo de inspección basada en el riesgo / auditorías de las BPM, con la creación del Área de Auditorías, lo que obligó a repensar y adecuar las metodologías e instrumentos a los fines de lograr los objetivos deseados, ideando un nuevo procedimiento de inspección que se ajuste a las nuevas necesidades.

## **2. ALCANCES Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.**

Existe un acotado conocimiento de los peligros microbiológicos asociados al consumo de chacinados en la provincia de Misiones y no se registran publicaciones científicas sobre el tema. Asimismo, la aparición, distribución y frecuencia de los microorganismos y enfermedades asociadas al consumo de alimentos contaminados, así como los peligros implicados, no siempre siguen el mismo patrón de comportamiento en cada región. Por ello es necesario contar con estudios específicos sobre la calidad microbiológica en derivados cárnicos de producción y consumo local, y conocer las condiciones higiénico-sanitarias y prácticas de elaboración, a los fines de poder identificar los peligros, determinar los riesgos y establecer medidas preventivas.

A su vez, en nuestra región, coexisten los alimentos derivados cárnicos industrializados con los producidos de manera artesanal. Debido a que no existen antecedentes de estudios que evalúen la calidad microbiológica y a que se desconoce la relación entre la calidad de los productos y tipo de elaboración (industrial - artesanal) es que se propone investigarlo en forma paralela.

El uso de agua potable y en cantidad compatible con las actividades industriales es obligatorio en los establecimientos que producen alimentos. En los establecimientos elaboradores de chacinados, el agua se utiliza como materia prima, medio de enfriamiento, medio de cocción, en los procedimientos de saneamiento del establecimiento (infraestructura, equipos, superficies, etc.) y del personal, en la fabricación del hielo, etc., por lo que necesariamente debe ser potable y en cantidad suficiente (12). Por ello, es vital verificar su calidad microbiológica y evaluar asimismo si estos resultados tienen relación con la calidad de los productos elaborados.

Por otra parte, es necesaria la incorporación de estrategias por parte del Estado que permitan avanzar en el cambio de paradigma hacia la “inspección basada en el riesgo” y las “auditorías de las BPM”, con el fin de garantizar alimentos seguros para la población.

Frente a la inspección clásica, donde el único elemento para registro de lo actuado era una acta general de tipo abierta para consignar, en un espacio limitado, las observaciones eventuales a criterio de cada inspector, desde el área de Auditorías de la División de Alimentos del Ministerio de Salud Pública de Misiones se hizo necesario idear una nueva herramienta donde se contemplen los aspectos más importantes de las BPM, que se adapte a todo tipo de establecimiento, que guarde una relativa simplicidad, orden y lógica, y que, además, pueda ser de utilidad para mejorar la gestión de la inocuidad alimentaria.

Por ello, se formuló un nuevo modelo de acta de auditoría (véase el Anexo 1) que incluye los aspectos más relevantes de las BPM y que al mismo tiempo establece, a partir de un sistema de ponderación, una categorización del establecimiento como predictor de riesgo.

Para probar esta nueva herramienta, se pensó en utilizar el método científico, sobre la base que el riesgo para los establecimientos resultante de la misma debiera ser inversamente proporcional a la calidad microbiológica de los productos elaborados. Se decidió realizar una prueba piloto tomando como objeto de estudio a un grupo de alimentos considerados de alto riesgo, tanto por sus propiedades intrínsecas favorables para el crecimiento bacteriano: actividad del agua ( $a_w$ ), la acidez (pH), la composición química, el potencial de oxido-reducción (Eh), como por las características de su origen y procesamiento (materia prima en general con carga bacteriana elevada, y productos resultantes de una alta manipulación y/o procesamiento), además de ser la población consumidora

perteneciente a todos los grupos etarios. En consonancia, que se cuente en la provincia con establecimientos elaboradores de estos productos en un número adecuado para la inclusión de todos y que sea factible en términos de recursos. Además, que dichas acciones se constituyan en el inicio de un programa de vigilancia sanitaria de productos alimenticios, y que su resultado se interprete como un diagnóstico que identifique problemas, y que, a partir de la acción desde el organismo de fiscalización, se abogue por la concreción de los cambios por parte de las empresas elaboradores, para mejorar la seguridad alimentaria y promover la reducción de las ETA. Por ello, para la realidad de la provincia de Misiones, los alimentos que reunían estas características eran los productos cárnicos, y entre ellos, el subgrupo de los chacinados.

Se postula que la utilización de esta herramienta de auditoría de BPM, servirá para determinar las condiciones higiénico-sanitarias y prácticas de elaboración en los establecimientos elaboradores de chacinados de Misiones, y, al mismo tiempo, será un predictor de riesgo de dichos establecimientos, a partir de una función del cumplimiento de las BPM. Asimismo, los resultados de laboratorio servirán para verificar con pruebas objetivas las estimaciones de la auditoría, es decir, si existe una asociación entre las variables, bajo la hipótesis principal que la calidad microbiológica de los productos elaborados está directamente relacionada al cumplimiento o adherencia a las BPM o inversamente relacionada al riesgo del establecimiento.

Además, es de interés conocer qué aspectos de las BPM son los más críticos, a partir de su porcentaje de adherencia, datos de utilidad para idear estrategias para un mayor y mejor control de los establecimientos.

### **3. FORMULACIÓN DE LAS PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN A MODO DE INTERROGANTE.**

¿Cuáles son las características microbiológicas de los chacinados en Misiones?

¿Qué porcentaje de cumplimiento de BPM / riesgo tienen los lugares de elaboración?

¿Existe asociación entre las características microbiológicas de los productos elaborados y el cumplimiento de BPM / riesgo de los establecimientos, determinado a partir de una herramienta (acta de auditoría) basada en el grado de cumplimiento de BPM?

¿Se puede establecer un criterio cierto acerca de la mayor seguridad alimentaria de los productos industrializados frente a los productos de elaboración artesanal?

¿La calidad microbiológica de los productos elaborados guarda relación con la calidad microbiológica del agua disponible en el establecimiento?

¿Qué aspectos de las BPM presentan mayor y menor adherencia por parte de los establecimientos?

¿Cuál es la situación de los diferentes tipos de elaboración frente al cumplimiento de los principales aspectos de las BPM?

## **4. OBJETIVOS.**

### **4.1. Objetivo general.**

- Caracterizar microbiológicamente chacinados y establecer su relación con las condiciones higiénico-sanitarias y prácticas de elaboración en establecimientos de la provincia de Misiones a partir de una herramienta basada en auditoría de las buenas prácticas de manufactura como predictor de riesgo.

### **4.2. Objetivos específicos.**

- Determinar las características microbiológicas de chacinados elaborados en la provincia de Misiones.
- Determinar las características de producción de las empresas elaboradoras.
- Establecer el grado de cumplimiento de buenas prácticas de manufactura / riesgo de los lugares de elaboración y su relación con la calidad microbiológica de los productos.
- Determinar la calidad microbiológica del agua para consumo humano disponible en los establecimientos y su relación con las características de los productos elaborados.
- Conocer las relaciones entre tipo de elaboración y características microbiológicas de los chacinados, y riesgo de los establecimientos.
- Determinar el porcentaje de adherencia de los establecimientos a los principales componentes de las buenas prácticas de manufactura y su relación con el tipo de elaboración.

## **5. JUSTIFICACIÓN.**

Este trabajo representa un aporte a la construcción de la salud pública desde la prevención, constituyéndose en una estrategia de intervención que, en vez de actuar directamente, analiza y estudia aquellos problemas de salud cuyas causas o soluciones son desconocidos, convirtiéndose en necesario para el propio desarrollo del sistema de cuidados de la salud.

Sus resultados constituyen, en primer lugar, una evidencia epidemiológica en relación con riesgo de ETA en los consumidores de estos productos en Misiones, a partir de la caracterización microbiológica de un tipo de alimentos de consumo importante en la región y muy arraigado a sus tradiciones culturales.

Inicialmente, la realización de esta investigación representa la ejecución de un programa inédito de vigilancia sanitaria de productos alimenticios y de establecimientos elaboradores de chacinados en todo el territorio provincial, involucrando al universo de los productores habilitados o en trámite de habilitación. A la vez se espera que sume al fortalecimiento de la vigilancia en salud desde el punto de vista preventivo, ya que pretende introducir el concepto de riesgo de establecimientos elaboradores de alimentos en relación a condiciones sanitarias / cumplimiento de BPM, y en concordancia microbiológica de los productos resultantes de su elaboración, de manera de contar con evidencia, datos objetivos que apoyen y avalen estrategias de vigilancia sanitaria a partir de auditorías basadas en el riesgo en todo el territorio provincial, sin la suma necesidad de recurrir a la vigilancia basada en laboratorio.

A su vez se constituye en un relevamiento de las empresas habilitadas que permite conocer cuáles siguen en actividad, su localización geográfica, las variedades de productos elaborados, el tipo de producción (artesanal, semi-industrial e industrial); y especialmente las condiciones higiénico-sanitarias y prácticas de elaboración, medidas a partir de las BPM. Las no conformidades detectadas promoverán la ejecución de acciones correctivas tendientes a garantizar un ambiente y prácticas adecuadas para la elaboración, con la finalidad de obtener alimentos inocuos.

La nueva herramienta de auditorías promueve el cambio de paradigma, y se constituye en el medio para la verificación del cumplimiento de las BPM (ley 18.284 y resolución 80/96 Mercosur), mejorando las acciones de fiscalización y control, y, a partir de la categorización del Riesgo de los Establecimientos, mejorar la gestión de la seguridad alimentaria.

La adopción de esta herramienta posibilitará contar con mayor y mejor calidad de datos, necesarios para constituir un sistema de información digital, contando con el historial de cada establecimiento y progresiones a través del tiempo, pero además para establecer un mapa de distribución de este

tipo de alimentos en la provincia (identificando por departamento, localidad), focalizando acciones, realizar programaciones anuales de las auditorías, determinar acciones de vigilancia sanitaria , trabajos de prevención de ETA, optimizar recursos, evaluar las actividades del área, entre otros, permitiendo avanzar en sintonía con el Estado nacional y provincial en el uso de las tecnologías de la información y las comunicaciones (TICs) a los fines de brindar seguridad , eficiencia y eficacia en la gestión de las actuaciones, acompañando al “Sistema de información federal para la gestión del control de los alimentos” (SIFEGA), que se adoptó por disposición N°3714/13 de la “Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica” (ANMAT), como componente del PFCA, en el marco del "Plan estratégico de fortalecimiento de las capacidades de regulación, fiscalización y vigilancia a nivel nacional y provincial" (13).

Desde la identificación un establecimiento de alto riesgo, y la presunción de elaboración de alimentos no aceptables desde el punto de vista microbiológico, con la identificación posterior de su cadena de comercialización y consumo, esta estrategia podrá sumar una consideración adicional para determinar prioridades para la salud pública respecto de los eventos que vigila.



## CAPITULO II

### 1. ANTECEDENTES O REVISION DE LA LITERATURA.

#### 1.1. Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA).

Una ETA es la enfermedad que resulta de la contaminación llevada o transmitida a los seres humanos por alimentos que contienen sustancias perjudiciales. Un brote de una ETA es definido como un incidente en el cual (I) dos o más personas sufren una enfermedad similar después de ingerir un mismo alimento, y (II) los análisis epidemiológicos señalan al alimento como el origen de la enfermedad. Para que una enfermedad sea transmitida por un alimento, el patógeno o su(s) toxina(s) deben estar presentes en el mismo. Sin embargo, la sola presencia del patógeno no significa que la enfermedad se manifestará. En la mayoría de los casos de ETA se observa que: a) los microorganismos patógenos deben estar en cantidad suficiente para causar una infección o producir toxinas; b) el alimento debe ser apropiado para el crecimiento de microorganismos patógenos.; c) el alimento debe permanecer a temperaturas que estén dentro de la zona de riesgo, el tiempo suficiente para que los microorganismos se multipliquen y/o produzcan toxinas; d) debe ingerirse una cantidad suficiente del alimento para superar el umbral de susceptibilidad de la persona que ingiere el alimento contaminado (6).

Las ETA se clasifican en infecciones, intoxicaciones o infecciones mediadas por toxinas: las infecciones transmitidas por alimentos son enfermedades que resultan de la ingestión de alimentos que contienen microorganismos perjudiciales vivos; las intoxicaciones causadas por alimentos ocurren cuando las toxinas o venenos de bacterias o mohos están presentes en el alimento ingerido y pueden causar enfermedades luego de la eliminación del microorganismo; la infección mediada por toxinas es una enfermedad que resulta de la ingestión de alimentos con una cierta cantidad de microorganismos patógenos, los cuales son capaces de producir o liberar toxinas una vez que son ingeridos (6).

Los peligros se clasifican, según su naturaleza, en biológicos (microorganismos, toxinas microbianas), químicos (pesticidas, herbicidas, toxinas naturales, aditivos tóxicos, etc.), y físicos (fragmentos de vidrio, metal, u otros objetos que puedan causar daño físico al consumidor). Se define como riesgo a la probabilidad de que ocurra un peligro que afecte la inocuidad del alimento. La evaluación del riesgo potencial de un peligro debe considerar la frecuencia con que éste se da en los consumidores y la gravedad de los síntomas. Los datos epidemiológicos indican los productos posiblemente peligrosos para la salud del consumidor. Para evaluar los riesgos, se

deben considerar: los resultados de análisis de laboratorio, los datos aportados por programas de vigilancia de agentes de ETA, las quejas de los clientes, la devolución de lotes, etc. Para un análisis de peligros, son necesarios un estudio específico del producto y un flujograma de su producción (6).

El peligro biológico es el que representa mayor riesgo para la inocuidad del alimento, e incluyen microorganismos, asociados a la contaminación por manipuladores de alimentos y a las materias primas crudas en el establecimiento. Algunos de éstos pasan naturalmente al ambiente donde los alimentos se procesan. Muchos son inactivados por el tratamiento térmico (calor), y otros pueden ser controlados mediante prácticas adecuadas de manipulación y almacenamiento (higiene, control de temperatura y tiempo). Las bacterias patógenas son la causa de la mayoría de los casos y brotes de ETA. El inadecuado almacenamiento o manipulación de alimentos crudos contribuirá a un aumento en el número de estos microorganismos antes del tratamiento térmico, aumentando la posibilidad de riesgo en un alimento si hubiese una falla en el proceso o si es consumido crudo (6).

## **1.2. Los microorganismos indicadores y los microorganismos patógenos.**

### **Microorganismos indicadores.**

Los microorganismos indicadores en un alimento no representan un peligro directo para la salud. Pueden indicar la presencia de microorganismos patógenos o de sus toxinas y la posibilidad de que las prácticas de manufactura fueron inadecuadas (contaminación o falta de higiene) durante la producción, proceso, almacenamiento y distribución. Puesto que los microorganismos patógenos vienen de la misma fuente que los indicadores, la detección de éstos pueden indicar un posible peligro para la salud.

Los coliformes totales son microorganismos indicadores de la familia *Enterobacteriaceae*. Fermentan la lactosa con producción de gas cuando se incuban a 35-37°C durante 48 h. Son bacilos gramnegativos no esporulados. Los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Klebsiella* forman este grupo. *Escherichia* es el único que tiene al tracto intestinal de humanos y animales como hábitat primario. Las otras bacterias pueden encontrarse en vegetales y en el suelo, donde son más resistentes que algunas bacterias patógenas de origen intestinal como *Salmonella* y *Shigella*. Así, la presencia de coliformes totales no indica, necesariamente, contaminación fecal o la presencia de patógenos estrictos (6).

Los coliformes fecales y *E. coli* en particular, se han seleccionado como indicadores de contaminación fecal debido a su relación con el grupo tifoide - paratifoide y a su alta concentración

en diferentes tipos de muestras. Aproximadamente el 95% del grupo de los coliformes presentes en heces fecales, están formados por *E. coli* y ciertas especies de *Klebsiella*. Ya que los coliformes fecales se encuentran casi exclusivamente en las heces de animales de sangre caliente, se considera que reflejan mejor la presencia de contaminación fecal. Los coliformes fecales se denominan termotolerantes por su capacidad de soportar temperaturas más elevadas (14) . Los coliformes fecales y *E. coli* tienen la capacidad de fermentar la lactosa con producción de gas a una temperatura de 44-45,5 °C. En estas condiciones, el 90% de los cultivos de *E. coli* son positivos mientras que simplemente algunas cepas de *Enterobacter* y *Klebsiella* mantienen esta característica (6).

Un contenido elevado de *Staphylococcus aureus* indica un potencial peligro debido a la producción de una toxina y, puede indicar fallas en procedimientos de saneamiento.

El recuento de aerobios mesófilos se usa para monitorear las BPM, y refleja contenido microbiano de materiales crudos e ingredientes, la eficiencia del procedimiento de elaboración / proceso, la condición de higiene del equipo y utensilios y la relación tiempo-temperatura de almacenamiento y distribución.

Los mohos y las levaduras son indicadores de contaminación ambiental. El recuento de mohos en equipos es usado como indicador de eficacia en procedimientos de saneamiento durante el proceso de los alimentos. La importancia de la presencia de mohos y levaduras en los alimentos está determinada por la capacidad de producir diferentes grados de deterioro y descomposición de estos. Además, los hongos producen metabolitos tóxicos conocidos como micotoxinas, compuestos estables que no se destruyen durante el procesamiento de alimentos, por lo que son responsables de intoxicación con consecuencias graves (cáncer, mutagénesis) en los órganos afectados. También están asociados a reacciones alérgicas e infecciones, principalmente en la población inmunocomprometida, en ancianos y niños (15).

### **Microorganismos patógenos.**

*Salmonella spp.* es una bacteria gramnegativa patógena que se encuentra en el tracto intestinal del hombre y de los animales, siendo fuentes de contaminación los animales domésticos, el ser humano, aves y algunos reptiles; *S. typhi* y *S. paratyphi* causan infección y producen fiebre tifoidea y entérica; los alimentos asociados son carnes crudas, pollo, huevos, leches y derivados (6).

Algunas cepas de *E. coli* son capaces de causar enfermedad en humanos; las fuentes de contaminación son animales, los seres humanos, agua contaminada con materia fecal, durante el

procesamiento de alimentos de origen animal, o por fallas en la manipulación. Existen cuatro clases reconocidas de *E. coli* enteropatógenas (grupo ECE) que causan gastroenteritis en humanos, entre los que están las cepas enterohemorrágicas (EHEC) que causa la colitis hemorrágica, por el daño en la luz intestinal que produce una toxina (tipo Shiga). Algunas personas afectadas, principalmente las muy jóvenes, pueden desarrollar el síndrome urémico hemolítico (SUH). La EHEC comprende las cepas O157:H7 y, con una frecuencia cada vez mayor, otras cepas distintas. Se estima que hay más de 100 serotipos que poseen un potencial patogénico similar (16). Los alimentos asociados a *E. coli* O157:H7 e implicados en brotes fueron: carne bovina cruda molida (hamburguesas), jugo de manzana, lechuga, embutidos fermentados, mayonesas, agua contaminada, leche sin pasteurizar y quesos de pasta blanda (6).

*S. aureus* es el agente etiológico más frecuente entre las intoxicaciones de origen alimentario. Tiene una resistencia elevada que facilita la contaminación y multiplicación en los alimentos, y su toxina resiste incluso un tratamiento de 30 minutos a 100 °C (6). Presentan mayor resistencia a la desecación, soportando condiciones ambientales durante largos períodos. Produce además una enzima capaz de coagular el plasma, denominada coagulasa. Es parte de flora normal de mucosas y piel del hombre y de los animales. Las enterotoxinas son proteínas relativamente termoestables producidas casi exclusivamente por cepas coagulasa positivas de *S. aureus*, pero no todas las cepas pertenecen a ese grupo si bien se estima que la mayoría de las cepas son capaces de sintetizar enterotoxinas (17). La cantidad de toxina necesaria para causar intoxicación en el hombre, 90 ng, se alcanza en poblaciones de *S. aureus* mayores a  $10^5$  células por gramo (18). La contaminación de alimentos se da por fallas de higiene personal y manipulación inadecuada. Los alimentos involucrados son: carnes y derivados; aves y derivados del huevo; pastelería; ensaladas con huevos, atún, pollo y lácteos (6).

Los anaerobios sulfito-reductores constituyen un grupo bacteriano asociado al género *Clostridium* spp. Son bacilos gram positivos, anaerobios obligados, formadores de esporas que tienen la propiedad de reducir el ion sulfito a sulfuro en presencia del citrato férrico u otra sal de metales pesados. Crecen a temperatura de 37°C, la  $a_w$  mínima para su desarrollo es 0,95 y a un pH entre 7 y 7,4, de modo que son fácilmente inactivadas a pH ácido o básico. Las exotoxinas extracelulares y enzimas producidas por *Clostridium* spp. son los principales factores de virulencia. Son ubicuas en el medio ambiente, y sus esporas se encuentran habitualmente en el suelo, polvo, sedimentos, medio acuático, vegetación en descomposición y en el tracto digestivo de los animales, incluido el hombre. En consecuencia, pueden transmitirse a una amplia gama de alimentos, tanto crudos,

como parcialmente tratados tales como: las carnes curadas (principalmente embutidos), conservas, fermentados, ahumados, productos envasados al vacío, semiconservas vegetales y las especias. Las esporas de *Clostridium spp.* explican su persistencia en ambientes hostiles y también su adquisición exógena por los seres humanos (15).

*Listeria monocytogenes*, se encuentra en mamíferos, aves, la tierra, y otras fuentes. La mayoría son patógenas en algún grado y el principal grupo susceptible son embarazadas, fetos, ancianos e inmunocomprometidos en general. Es muy resistente y puede sobrevivir perfectamente a los efectos de la desecación, congelamiento y calentamiento. Se ha asociado a alimentos como leche cruda, quesos, helado, verduras crudas y carnes crudas o deficientemente cocidas de todo tipo (6).

### **1.3. La contaminación de los productos cárnicos.**

La carne y sus derivados se incluyen dentro de los alimentos que, si no se controlan los problemas de contaminación desde la producción primaria, pueden transmitir agentes etiológicos productores de enfermedades o intoxicaciones alimentarias.

Cuando se evalúa la calidad microbiológica de los productos cárnicos y se encuentran cargas elevadas de microorganismos como *coliformes*, *S. aureus* y *E. coli*, se evidencia la contaminación del producto, ya sea por la materia prima utilizada o por fallas en el proceso de elaboración o comercialización antes de la venta al consumidor. Estos microorganismos indicadores pueden señalar la presencia potencial de otros microorganismos patógenos o sus toxinas, y un posible peligro para la salud del consumidor.

La masa muscular interna de la carne contiene pocos microorganismos o no los contienen. La contaminación se debe a causas externas durante las operaciones que ocurren en el matadero, a partir de microorganismos procedentes del exterior del animal (piel, pezuñas y pelo) y del tracto intestinal de éste. Los microorganismos que contaminen los cuchillos utilizados en la faena pronto se encontrarán en distintas partes de la canal, siendo vehiculizados por la sangre y por la linfa. Además, pueden ser fuentes intermedias de contaminación las manos y vestimenta del personal, el aire, los paños utilizados y otros objetos o superficies que contacten con la carne.

Los microorganismos de la superficie del animal provienen suelo, el agua, los piensos, el estiércol, así como su propia flora superficial, mientras que en el contenido intestinal se encuentran los microorganismos propios de la flora intestinal. La contaminación puede ocurrir también durante el transporte (carretillas, cajas, vehículos, contacto con otra carne contaminada, personal, aire) y en los lugares de destino, como fábricas de productos derivados o carnicerías, a partir de equipos

(picadora, embudidoras, sierras, empaquetadoras), superficies en contacto, personal, aire, o por otros ingredientes con los que toman contacto, como las tripas o especias en la elaboración de chacinados. Además, durante la comercialización minorista y por parte de los consumidores, en su hogar, puede ocurrir contaminación adicional (recipientes contenedores, heladeras, balanzas, personas, etc.). Como consecuencia de las distintas procedencias de los microorganismos, son muchas las especies microbianas que es probable que contaminen las carnes y sus derivados.

Los bovinos y demás rumiantes son el principal reservorio de EHEC, que se transmite a los seres humanos por ingestión de alimentos o agua contaminados con heces animales, o por contacto directo con animales infectados o su entorno. Las principales fuentes de infección del ganado por ECEH en las explotaciones son el agua de beber, los piensos y el entorno inmediato de los animales (19).

Los mohos de muchos géneros pueden llegar a la superficie de los alimentos cárnicos y crecer allí, hallándose en las carnes tratadas y curadas las especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Thamnidium*. También se suelen encontrar levaduras. Las bacterias aisladas en carnes tratadas y curadas corresponden a los géneros *Lactobacillus*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Serratia* y *Staphylococcus* (20).

#### **1.4. Los chacinados y su control microbiológico.**

Dentro de los productos cárnicos se encuentran los chacinados y las salazones. Las salazones se realizan en general por inmersión en salmuera con 15-25% de concentración de sal / cloruro de sodio (salazón húmeda) o por frotación con sal (salazón seca): las elevadas concentraciones de sal disminuyen la disponibilidad de agua del producto, inhibiendo el desarrollo bacteriano. Los chacinados son productos preparados sobre la base de carne y/o sangre, vísceras u otros subproductos animales que hayan sido autorizados para el consumo humano, adicionados o no con sustancias aprobadas a tal fin. Se clasifican en embutidos y no embutidos. En los embutidos, el preparado es introducido a presión en un fondo de saco de origen orgánico o inorgánico aprobado para tal fin, aunque en el momento del expendio y/o consumo carezcan del continente. Los no embutidos, no están introducidos en un fondo de saco orgánico o inorgánico. Los chacinados embutidos a su vez se clasifican en crudos (frescos y secos) y cocidos, y los no embutidos se dividen en crudos y cocidos. Dentro de los chacinados no embutidos crudos se incluyen a productos moldeados como las hamburguesas y a los preparados a base de carne, como las milanesas. En el grupo de chacinados no embutidos cocidos, encontramos al matambre arrollado. Los chacinados

embutidos son pastas que se introducen o embuten a presión en una membrana o tripa que puede ser natural o artificial. Entre los embutidos crudos se encuentran los embutidos de corta duración, también denominados frescos o de pasta blanda (chorizos, salchicha parrillera), cuya comestibilidad oscila entre 1 y 6 días, recomendándose su conservación en frío; y los de larga duración, también denominados secos, fermentados o de pasta dura (salame, salami, longaniza, chorizo seco), que se pueden inocular con bacterias fermentadoras como *Lactobacillus spp.*, adicionado además azúcares como nutrientes para las mismas, y que requieren una maduración prolongada, durante la cual ocurren procesos bioquímicos como acidificación, deshidratación, formación de aroma y sabor característicos. Esta deshidratación parcial favorece su conservación por un lapso prolongado (21).

La cocción de los embutidos mediante calor seco (estufas) o en agua con o sin sal, o al vapor reduce el número de microorganismos y coopera en su conservación. El calor que llega a los productos durante el ahumado contribuye a reducir el número de microorganismos (20).

Los embutidos cocidos a su vez pueden clasificarse en emulsionados (salchichas, salchichón, mortadela, entre otros) y no emulsionados (morcilla, chorizo cocido, entre otros). Para mejorar las características higiénico- sanitarias deben ser sometidos a una pasteurización a 80°C , seguida por un enfriamiento rápido y preferentemente deben ser envasados al vacío (21). Estos productos se deben refrigerar, ya que son perecederos y , si se conservan a temperatura ambiente, existe la posibilidad de que en los mismos crezcan microorganismos causantes de intoxicaciones alimentarias (20).

Los chacinados son uno de los grupos de alimentos que obligatoriamente están sujetos a controles microbiológicos en Argentina (22).

La aceptabilidad de un proceso es frecuentemente el aspecto más difícil del análisis de alimentos, y los análisis microbiológicos son una herramienta eficaz en esta evaluación. Un criterio microbiológico para alimentos define la aceptabilidad de un proceso, producto o lote de alimentos basándose en la ausencia o presencia o el número de microorganismos y/o la investigación de sus toxinas por unidad de masa, volumen o área. La evaluación que se hace de la inocuidad de los alimentos y de su aptitud para el consumo humano a través del cumplimiento con el criterio microbiológico designado para el producto en cuestión, puede referir a ausencia de patógenos o a la demostración de la aplicación de buenas prácticas de higiene (23).

Los microorganismos elegidos para la elaboración del criterio son relevantes para el alimento y circunstancias particulares: productos crudos (chacinados frescos) o listo para consumir

(chacinados secos y cocidos), siendo que el perfil del consumidor del producto es el público en general, de todas las edades, incluyendo niños, ancianos, embarazadas, inmunocomprometidos, los límites propuestos deben ser críticos. Se contempla la búsqueda de microorganismos patógenos y de microorganismos indicadores, como índice de higiene inadecuada y posible presencia de patógenos. Algunos microorganismos no son considerados en el alimento crudo, ya que se considera su tratamiento térmico previo al consumo, por el cual se eliminará dicho microorganismo. Entre los patógenos encontramos a *Salmonella spp* y *L. monocytogenes*. Entre los indicadores se incluyen aerobios mesófilos y mohos-levaduras, que permiten evaluar condiciones de higiene, la calidad de la materia prima, problemas de almacenamiento o vida útil; Los anaerobios sulfito-reductores se utilizan como indicadores de higiene, una potencial contaminación fecal, y la posible presencia de patógenos (*C. botulinum*). *E. coli*, que permite evaluar potencial contaminación fecal, posible presencia de patógenos, o contaminación post tratamiento térmico, y *S. aureus* coagulasa positiva, que permite evaluar la contaminación por manipulación humana y contaminación post tratamiento térmico. Estos dos últimos también son considerados entre los patógenos, es decir aquellos que pueden encontrarse en el alimento en cuestión y que pueden convertirlo en un potencial vehículo de enfermedad a quien lo consuma (23).

### **1.5. Las ETA y los productos cárnicos.**

Diversos estudios realizados en diferentes partes del mundo ubican a los productos cárnicos como principales alimentos implicados en brotes de ETA. En España, *Salmonella spp.* ocupa el primer lugar entre los agentes causales de las ETA seguido a mucha distancia de *S. aureus* y *Clostridium perfringens*, siendo el alimento más frecuentemente identificado huevo y/o derivados, seguido de mariscos y luego carnes y productos cárnicos (excluyendo aves) (24). *Salmonella spp.* resultó también predominante en los aislamientos de coprocultivos realizados a personas afectadas de ETA de etiología bacteriana, en 72 brotes estudiados en Cuba (25). Los animales para consumo, infectados por *Salmonella spp.*, son la principal fuente de transmisión y, en función de las especies y regiones, su impacto oscila entre un 0% y un 90% (26). Cuando se produce el sacrificio de estos animales, clínicamente sanos, los serotipos que portan, a nivel intestinal, pasan a las canales y persisten en productos que se consumirán sin previa cocción, como es el caso de los embutidos frescos y los ahumados, así como aquellos sometidos a cocción insuficiente (27).

Un estudio latinoamericano ubica a los alimentos cárnicos embutidos como los alimentos más frecuentemente implicados en casos de brotes de ETA, y como especies aisladas con mayor



frecuencia a *S. aureus* (28). En Nicaragua los productos más vinculados a los brotes de ETA son los productos cárnicos y lácteos, siendo los agentes más importantes causales *S. aureus* y *E. coli* enteropatógena (17).

Un trabajo chileno analizó 2.434 brotes de ETA notificados entre 2005 y 2010 con 12.196 personas afectadas, cuyos principales alimentos involucrados fueron productos cárneos (en especial mariscos) y los principales agentes etiológicos aislados fueron *Salmonella spp* y *Shigella spp.*(29).

Un estudio de la Argentina analizó 39 brotes de ETA que afectaron a 958 personas en el período 1993- 2001, identificando también a los alimentos cárneos como los principales involucrados (36%), y a *Salmonella spp* (38%), seguida por *S. aureus* (15%) como los agentes etiológicos más frecuentes (27).

La importancia de *L. monocytogenes* como agente de ETA ha crecido constantemente en los últimos veinticinco años. La contaminación por *L. monocytogenes* es una de las principales causas de incautaciones de alimentos, y concierne principalmente a productos cárnicos y lácteos.

En la mayoría de los Estados miembros de la Unión Europea, la incidencia anual de listeriosis humana varía de dos a diez casos por millón de habitantes, siendo principal causa de las hospitalizaciones (91%) debido a las ETA, y se asocia a casos aislados y epidémicos que ocurren en todo el mundo; tiene una alta tasa de mortalidad, que la convierte en una de las causas más comunes de muerte entre las ETA. El mantenimiento de la higiene en los frigoríficos y plantas procesadoras es fundamental para reducir el riesgo de presencia de la *L. monocytogenes*. Las medidas de prevención y control se basan en análisis de riesgos y programas de control de puntos críticos en todas las etapas de la industria alimentaria. La capacidad de *L. monocytogenes* para sobrevivir a las condiciones de procesamiento de alimentos y soportar bajas temperaturas representa una gran amenaza para la salud pública. Es capaz de adherirse y sobrevivir en diferentes superficies, debido a su capacidad para formar biofilms, lo que le confiere resistencia a los desinfectantes, siendo un medio de contaminación para los productos que se manipulan después del tratamiento térmico (30).

Las fallas higiénicas durante el sacrificio facilitan la contaminación de carne e instalaciones industriales con heces animales; mientras que el incumplimiento de las BPM permite que la bacteria sea llevada a la industria por medio del calzado, la ropa, el transporte, etc. Se relató la presencia de *L. monocytogenes* en instalaciones industriales: desagües, refrigeradores, filtros de aire, paredes, utensilios de limpieza y otros ambientes que son húmedos, fríos y difíciles de limpiar, donde pueden sobrevivir durante largos periodos (31). Temperaturas internas de 73°C son

suficientes para la inactivación de este patógeno a nivel industrial (32). Investigaciones latinoamericanas refieren aislamientos de *L. monocytogenes* en diversos productos cárnicos como salchichón, mortadela y chorizo (31; 33).

En Argentina, según una publicación oficial de la Dirección General de Higiene y Seguridad Alimentaria del Gobierno de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, los casos de ETA en todo el país disminuyeron desde 9586 casos (en 2008) a 6586 casos (en 2011). Los agentes causales mayormente encontrados en brotes de ETA en la ciudad de Buenos Aires en el periodo 2000-2010 fueron *E. coli*, *S. aureus* y *Bacillus cereus* (34). En la vecina provincia de Corrientes, ya se han registrado casos de trichinellosis en cerdos y humanos en 2011 (35; 36).

Se han señalado brotes de intoxicación estafilocócica en embutidos secos. La multiplicación de *S. aureus* puede limitarse manteniendo la carne en refrigeración durante la fermentación inicial. Si no se emplea la refrigeración, la adición de un cultivo iniciador y/o de acidificante químico causará la acidificación rápida y el crecimiento de *S. aureus* (37).

En la Argentina, durante 2018, hasta la semana epidemiológica (SE) 40, se notificaron 188 casos de SUH. Este número es inferior a la mediana y al promedio de casos para el mismo período de los últimos 8 años (2010-2017) de 271,5. La tasa acumulada correspondiente hasta la SE40 de 2018 fue de 0,42 casos cada 100.000 habitantes. De los 188 casos notificados, 152 (80%) corresponden a menores de 5 años. En este grupo de edad la mediana de casos notificados para el periodo 2010-2017 hasta la misma SE40 fue de 213 casos. La tasa acumulada correspondiente para la SE40 de 2018 fue de 4,07 casos por 100.000 menores de 5 años; la tasa específica de notificación más alta se observó en el grupo de 1 año con 7,51 casos cada 100.000 habitantes. En la provincia de Misiones, no se notificó ningún caso hasta la SE 37 del 2018, en comparación con los 3 casos notificados en el mismo periodo de 2017 (16). Muchos alimentos han sido vinculados a estos brotes, destacando las carnes y derivados cárnicos crudos o insuficientemente cocinados. Un estudio español halló una prevalencia de EHEC de 19,41 % (n=170) en carnes y derivados (38). Sobre características microbiológicas en chacinados existen escasas publicaciones de la región. Investigadores del Estado de Paraná, Brasil, determinaron que el 31,7% de las muestras analizadas de chacinados embutidos artesanales (n=60) no cumplían con los criterios microbiológicos exigidos en la normativa (39).

## **1.6. Legislación y control: buenas prácticas de manufactura e inspección basada en el riesgo / auditorías.**

El *Codex Alimentarius* es un documento internacional creado desde una comisión de la “Fundación de la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura” (FAO) y la OMS, que establece normas alimentarias que tienen como propósito, entre otras cosas, la protección de la salud de los consumidores, asegurar prácticas equitativas en el comercio de alimentos y promocionar la coordinación de todas las normas alimentarias acordadas por las organizaciones gubernamentales y no gubernamentales. Estas medidas comprenden todas aquellas dirigidas a cuidar la calidad total de los alimentos en toda la cadena, como las buenas prácticas agrícolas (BPA) que son técnicas aplicadas a los distintos cultivos y a la producción pecuaria para obtener productos satisfactorios en términos cualitativos y cuantitativos e inocuamente garantizados para el consumo, y las BPM, que permiten controlar la higiene y sanidad durante todas las operaciones de los distintos procesos aplicados a los alimentos tales como cocción, refrigeración, congelación, envasado, deshidratado, azucarado, entre otros. Estas guías de BPM proporcionan los conocimientos técnicos básicos que se deben adoptar y aplicar a las materias primas en cada una de las operaciones a las que se someten durante la transformación industrial o preparación a nivel familiar de los alimentos para lograr una calidad e inocuidad garantizadas para el consumo. Las guías, tanto para las BPA como para las BPM, proveen normas y recomendaciones técnicas a seguir para obtener alimentos sanos y seguros, e incorporan en su contexto tanto los “procedimientos operacionales estandarizados” (POE) y los “procedimientos operacionales estandarizados de saneamiento” (POES) como el “manejo integrado de plagas” (MIP). Estos procedimientos deben estar documentados en los manuales que describen la correcta forma de realizar todas las actividades y operaciones del proceso de producción, señalando las prácticas y medidas que se deben adoptar para asegurar la producción de alimentos en condiciones adecuadas. Muy probablemente, la disponibilidad de recursos para fomentar las tecnologías de BPA y BPM produzca resultados positivos con una inversión económica menor que el gasto económico que puede ocasionar la incidencia de las ETA. Además, se logra un beneficio social en términos del mejoramiento de la calidad de vida de la población (17).

En Argentina se incorpora a la Ley 18.284 (CAA, por Resolución del Ministerio de Salud y Acción Social N° 587 del 1.09.97) la Resolución GMC N°080/96 “Reglamento técnico Mercosur sobre las condiciones higiénico sanitarias y de buenas prácticas de elaboración para establecimientos elaboradores/ industrializadores de alimentos”, que establece los requisitos generales (esenciales)

de higiene y de **buenas prácticas de elaboración** para alimentos elaborados/industrializados para el consumo humano, y es aplicable a toda persona física o jurídica que posea por lo menos un establecimiento en el cual se realicen algunas de las actividades siguientes: elaboración/industrialización, fraccionamiento, almacenamiento y transporte de alimentos industrializados en los Estados parte del Mercosur (40).

El Estado debe garantizar el derecho del consumidor al acceso a alimentos seguros y lo ejecuta por medio de las autoridades bromatológicas, quienes deben realizar las inspecciones a los establecimientos elaboradores para verificar el cumplimiento de las disposiciones de las leyes y reglamentaciones. Esta investigación propone utilizar un sistema de inspección basada en el riesgo / auditorías de las BPM, poniendo énfasis en los procesos más que en los productos.

Tradicionalmente, las actividades de inspección se realizan con énfasis en evaluar el cumplimiento con todas las normativas. Este tipo de inspección se realiza para mejorar el saneamiento básico y mejorar las condiciones generales de los establecimientos de alimentos. Sin embargo, con esta concepción tradicional, el inspector solo trata de encontrar riesgos alimentarios existentes y asegurar su corrección, es decir que es "reactivo" y no contempla medidas "preventivas" para prevenir futuras violaciones.

El desarrollo de un perfil de riesgo es una de las actividades de gestión de riesgos; la priorización del riesgo ayudaría a diseñar e implementar medidas de control reguladoras (41).

En este enfoque moderno basado en el riesgo, la inspección cambia de la simple verificación de cumplimiento de un producto o establecimiento de alimentos, a las auditorías de las BPM, verificando la evaluación de los controles establecidos en las operaciones para abordar los factores de riesgo de ETA que podrían poner en riesgo la inocuidad de los productos elaborados.

El *Codex* define la auditoría como "un examen sistemático e independiente para determinar que las actividades y sus resultados se ajusten a los objetivos planificados" es decir si las acciones planificadas (planes de BPM), son las indicadas para otorgar inocuidad al alimento (42).

Al realizar inspecciones basadas en el riesgo, un inspector de alimentos debe comprender el significado de los factores de riesgo de ETA que pueden causar enfermedades en los consumidores si se dejan sin control. Es sobre estos factores que el inspector debe concentrarse durante las inspecciones para tener un impacto significativo en la seguridad de los alimentos. En muchos países se han identificado varios factores importantes de riesgo de ETA. El informe de vigilancia de los "Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades" (CDC) de 1993–1997, Vigilancia de brotes de ETA: Estados Unidos (CDC, 2000) es uno de los que más identifica dichos

factores. Cinco de estas amplias categorías de factores contribuyentes se relacionan directamente con las preocupaciones de seguridad alimentaria dentro del comercio minorista y el servicio de alimentos, establecimientos y se denominan colectivamente por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) como “Factores de riesgo de ETA”, siendo los alimentos de fuentes inseguras, la cocción inadecuada, las temperaturas de mantenimiento inadecuadas, los equipos contaminados y mala higiene personal (43).

Otros ejemplos de factores de riesgo ampliamente identificados para ETA son la contaminación cruzada (por ejemplo, desde un producto crudo hasta un producto listo para comer), el estado de salud de los manipuladores de alimentos, la calidad del agua y la presencia de plagas (43).

Un estudio de la FAO ha sugerido un enfoque basado en el riesgo como una forma de mejorar la efectividad de la inspección, a partir de tres ejes: revisar los factores de riesgo de ETA antes de efectuar la inspección; efectuar la inspección basada en el riesgo de tales factores, determinando si los controles de dichos factores son adecuados y eficaces y efectuar recomendaciones para introducir mejoras en los sistemas de gestión de la calidad e inocuidad de forma continua que el establecimiento utiliza, tendientes a progresar hacia un sistema de APPCC, si corresponde. Además, resumió claramente las técnicas de inspección (observación, inspección, medición, ensayos y formular preguntas) el uso de técnicas aprobadas de ensayo y de extracción de muestras y la necesidad de revisar el historial y los registros existentes, antes y durante la inspección. Además, destacan la importancia de determinar las etapas críticas para la inocuidad del producto, si el personal de la planta conoce los factores de riesgo inherentes a cada producto y a cada etapa y verificar si existen medidas de control para cada factor de riesgo (44).

Aunque los elaboradores tienen la responsabilidad de establecer un sistema de gestión de la seguridad para controlar los factores de riesgo de ETA, los inspectores tienen un papel vital y multifacético en la protección del consumidor. Inicialmente deben evaluar el control de los elaboradores sobre los factores de riesgo de ETA asociados a cada proceso. Una vez que se identifican los factores de riesgo de ETA que están fuera de control, el rol de los inspectores cambia para ayudar al operador a fortalecer la gestión de seguridad alimentaria existente. Es decir que sistema se basa en estrategias de intervención diseñadas para lograr el cumplimiento inmediato y a largo plazo. Con la asistencia del inspector, un elaborador puede lograr un cambio de comportamiento a largo plazo que resulte en una reducción en la ocurrencia de factores de riesgo y en un aumento en la protección de la salud pública (45).

Un reporte de Uruguay expone con claridad varios aspectos metodológicos de las auditorías y define como objetivos : verificar la eficacia del sistema, supervisando las acciones del control de la calidad de las industrias; propiciar a la empresa una mejoría continua del sistema; verificar si el programa aprobado está siendo cumplido; identificación de la necesidad de entrenamiento del personal, pero especialmente establece que la frecuencia con la que se realiza la auditoría a un establecimiento es variable y depende de una serie de factores, como el número y entidad de los defectos encontrados. Una empresa con un número de defectos importantes (sin tener en cuenta su entidad) nos puede estar indicando, por ejemplo: baja confiabilidad de la empresa, necesidad de capacitación, necesidad de reformulación del plan; necesidad de mejorar la infraestructura edilicia; sin embargo, no se obtendrá una mayor seguridad de los alimentos elaborados con el simple hecho del aumento de frecuencia. Sobre esta base mencionan que se debe tratar caso a caso, pero marcando una tendencia que indique aproximadamente el lapso entre auditorías. Esta frecuencia de auditorías debe estar relacionada con una clasificación según el número de defectos que se verifican previamente en una planilla predeterminada, dando como consecuencia un modelo de clasificación de riesgo de establecimientos alimentarios (46).

Un trabajo de la OPS/ OMS realizó una adecuada clasificación de los peligros y de la evaluación de la gravedad, clasificando a los peligros de acuerdo con su potencial para causar enfermedades, variando dicho potencial entre ninguno y severo. Asimismo planteo la evaluación del riesgo, con una clasificación en grados, que van desde alto, moderado, bajo a insignificante (6).

Una publicación española documentó un plan de inspección basado en el riesgo de los establecimientos alimentarios, con el objetivo de promover la implantación y desarrollo de los sistemas de autocontrol en los establecimientos alimentarios y evaluar su eficacia mediante la supervisión, uniformando los criterios de actuación por parte de los agentes de control. A su vez menciona el concepto de flexibilidad en la aplicación de los sistemas de calidad en ciertas empresas alimentarias, como carnicerías , salchicherías, charcuterías y comedores escolares, con el fin de dar soluciones específicas sin poner en peligro la seguridad alimentaria e introduce el concepto que la frecuencia de supervisión de los establecimientos alimentarios estará asociada a la categoría a la que pertenezcan en base a la clasificación del riesgo, establecido por un sistema de puntajes (47).

Un documento de la FAO establece las pautas para la categorización del riesgo de alimentos y establecimientos alimentarios y suministra tablas de categorización de riesgos en empresas que tratan con alimentos primarios y secundarios (41).

En nuestro país, investigadores de la Universidad de Lanús plantearon un método de evaluación y categorización de establecimientos basado en el riesgo, en tres etapas: una pre-evaluación , de materias primas que ingresan al establecimiento, una ponderación en función del riesgo del establecimiento, y una tercera etapa que determina la categoría sanitaria en función del análisis de peligros y estimación del riesgo (48).

La ANMAT creó en 2017 el “Plan Integral de Fiscalización de Establecimientos, Productos Alimenticios y Materiales en Contacto con Alimentos “ (PIF), el cual incluye un eje de fiscalización a establecimientos de alimentos elaborados o industrializados, a partir de la realización de auditorías para verificar el cumplimiento de las BPM estableciendo documentos de referencia para su aplicación, con el objetivo de fortalecer el proceso de auditoría basado en peligro-riesgo fundados en las directrices para la realización de auditorías de BPM a establecimientos de alimentos elaborados / industrializados, y contemplando una lista de chequeo de BPM para consignar conformidades y no conformidades (49-52).

## CAPITULO III

### 1. METODOLOGIA.

#### a. **Ámbito de estudio.**

Establecimientos elaboradores de chacinados registrados de la provincia de Misiones.

##### **Área geográfica de estudio.**

La provincia de Misiones es el tercer distrito más pequeño del país, con 29.801 kilómetros cuadrados (km<sup>2</sup>) que representan 0,8 % del total de la superficie nacional. Está ubicada en medio de los países limítrofes de Brasil y Paraguay, y solamente el 20 % de su frontera limita con la provincia argentina de Corrientes. Cuenta con 1.101.593 habitantes (2,7 % del total del país) y se encuentra dividida en 75 municipios (5).

##### **Ámbito institucional.**

La presente investigación se desarrolló en el ámbito institucional de la División de Alimentos - Dirección de Saneamiento Ambiental, que es una dependencia de la Subsecretaría de Atención Primaria y Salud Ambiental del Ministerio de Salud Pública de Misiones, y es la autoridad jurisdiccional responsable de velar por el cumplimiento del CAA, ley 18.284, en todo el territorio provincial y está conformado por cuatro áreas centrales: "Jefatura", "Normas/ Legislación", "Laboratorio", y "Auditorías". El autor de esta investigación coordina el área de "Auditorías" desde fines del año 2013.

#### b. **Población.**

##### **Universo o población objetivo.**

Establecimientos elaboradores de chacinados de la provincia de Misiones, Argentina.

##### **Unidad de análisis, criterios de inclusión y exclusión.**

Unidad de análisis: Elaboradores de chacinados de Misiones (sus establecimientos de elaboración y los productos allí elaborados).

Criterios de Inclusión: Se incluyeron aquellos establecimientos en actividad registrados en el Ministerio de Salud Pública de Misiones, tanto en los Registros Nacionales (RNE) como Provinciales – Artesanales (RPEA) y a aquellos en trámite de inscripción o reinscripción a dichos registros.



Criterios de Exclusión: Se excluyeron a todos los elaboradores que no tuviesen radicado su emprendimiento en la provincia de Misiones, a aquellos sin registro de elaborador de alimentos (R.N.E. o R.P.E.A.) ni con trámite respectivo iniciado, y a aquellos con registro vencido y que no hubiesen iniciado nuevo trámite de inscripción.

**Población accesible.**

Quedaron incluidos en el estudio todos los establecimientos elaboradores de chacinados de Misiones inscriptos, reinscriptos o en trámites de inscripción o reinscripción en los registros nacionales (R.N.E.) o provinciales (R.P.E.A.) de Alimentos del Ministerio de Salud Pública de Misiones.

**c. Tipo de estudio y diseño.**

Estudio descriptivo, de corte transversal, el cual se dividió en dos componentes:

I) Componente descriptivo: Se caracterizaron:

- a) Los chacinados elaborados en la provincia de Misiones (variedades, de acuerdo con la clasificación general).
- b) Las características microbiológicas de estos chacinados, que a su vez determinaron su aceptabilidad para el consumo.
- c) El tipo de elaboración (artesanal / semi-industrial / industrial).
- d) Riesgo del establecimiento en referencia al cumplimiento de las BPM.
- e) La adherencia de los establecimientos a los diferentes componentes de las BPM.
- f) Calidad microbiológica del agua disponible en los establecimientos.

II) Componente de asociación: se plantearon una serie de hipótesis direccionales.

- a) La calidad microbiológica del chacinado (variable dependiente) está relacionada a las condiciones higiénico-sanitarias y prácticas de elaboración, sintetizadas en el concepto de riesgo del establecimiento (variable independiente), medida a partir del uso de una herramienta de auditoría de BPM. El supuesto que subyace a esta hipótesis es que un alto grado de cumplimiento/ adherencia a las BPM (correspondiente a un riesgo bajo) del establecimiento, mejora la calidad microbiológica de los productos elaborados.
- b) La calidad microbiológica del chacinado (variable dependiente) está relacionada al tipo de elaboración (variable independiente). El supuesto que subyace a esta hipótesis es que un tipo

de elaboración más industrializado mejora la calidad microbiológica de los productos elaborados.

- c) La calidad microbiológica del chacinado (variable dependiente) está relacionada a la calidad microbiológica del agua (variable independiente). El supuesto que subyace a esta hipótesis es que el uso de agua apta microbiológicamente mejora la calidad microbiológica de los productos elaborados.

#### **d. Análisis de sesgos.**

##### **Sesgo de omisión.**

Podrían existir elaboradores de chacinados en diferentes localidades de la provincia de Misiones que se encuentran en la clandestinidad, es decir, que no posean registros vigentes (R.N.E., R.P.E.A.) ni tampoco hayan iniciado los trámites para su inscripción respectiva en el Ministerio de Salud Pública de Misiones, y que, por lo tanto, no hayan sido incluidos en esta investigación, pero resulta imposible su identificación.

##### **Sesgo de información.**

La herramienta que se pretende probar en este estudio, basada en auditoria de las BPM como predictor de riesgo, se fundamenta en una planilla de tipo estructurada (véase el Anexo 1), que justamente obliga a completar todos los campos, y se fundamenta en los criterios de la Disposición ANMAT 1930 /1995, por lo cual evita el sesgo de información, que pudiera ocurrir si los campos son abiertos y diferentes observadores tuvieran la libertad de completarla según preferencias, como ocurría con la utilización de las actas de inspección tradicionales.

#### **e. Selección de técnica e instrumento de recolección de datos. Fuentes primarias y secundarias. Prueba piloto del instrumento.**

Sin considerar el listado de establecimientos elaboradores de chacinados registrados y en trámite de inscripción, proveniente del Ministerio de Salud Pública de Misiones, a partir del cual se incluyeron los participantes del estudio, todos los datos se obtuvieron a partir de fuentes primarias. El acta propuesta (véase el Anexo 1) se probó en las actividades rutinarias del área de auditorías a establecimientos elaboradores de diferentes rubros alimenticios, y se ajusta a los fines de la investigación.

Los resultados de laboratorio se obtuvieron tras la aplicación de la metodología analítica oficial en todos los casos, ampliamente probada en el servicio de Laboratorio, contando con años de desarrollo y práctica en dichos procedimientos.

Se desarrolló una prueba preliminar de las actividades concernientes a la planificación, auditoría, recolección de muestras, análisis de laboratorio, interpretación de resultados y carga de datos en la base, a fines de evaluar la metodología y realizar los ajustes correspondientes.

#### **f. Análisis de los resultados.**

Los datos obtenidos a partir de las actas de auditorías y de los resultados de laboratorio se cargaron en planillas de cálculo y luego se procesaron y analizaron estadísticamente con el programa "Info Stat" ® 2018 (versión estudiantil).

Para establecer asociación de variables cualitativas se utilizó la **prueba exacta de Fisher** bivariable (o de dos colas), para un nivel de confianza de 95% ( $p < 0,05$ ) y agrupando variables y dicotomizando los grupos de forma lógica a fin de plasmarlos en una tabla de contingencia de 2x2.

#### **g. Procedimientos para garantizar aspectos éticos de la investigación.**

En la presente investigación no se realizaron ensayos con personas. Se estudiaron productos alimenticios y condiciones higiénico- sanitarias de elaboración respectivas de establecimientos. Igualmente se mantuvo la confidencialidad de los registros que pudieran revelar la identidad de los responsables de cada establecimiento elaborador, sus nombres comerciales, o marcas, respetando las reglas de privacidad y de confidencialidad de acuerdo con los requisitos normativos aplicables. Así mismo, una copia del acta de auditoría como todos los informes con los resultados de los análisis de cada alimento estudiado fueron entregados personalmente a cada uno de los participantes. Se brindó además a cada uno de ellos asesoramiento profesional permanente y seguimiento para dar solución a las eventuales no conformidades encontradas durante la auditoría y/o a partir de los resultados de los análisis de los productos alimenticios.

El proyecto fue evaluado y aprobado por el "Comité de Ética" del Hospital Provincial de Pediatría "Dr. Fernando Barreyro" de la ciudad de Posadas, Misiones. (véase el Anexo 2: Dictamen del Comité de Ética).

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **a. Tareas preliminares.**

Se recolectó información disponible en los archivos de la División de Alimentos sobre los establecimientos elaboradores de chacinados inscriptos en los registros de elaboradores de Misiones: registro nacional de establecimiento (R.N.E.) y registro provincial de elaborador artesanal (R.P.E.A.) y los que habían iniciado el trámite de inscripción para dichos registros.

Se estableció el listado de participantes incluidos en el estudio y se diagramó un cronograma tentativo de actividades, ubicando geográficamente a cada establecimiento por localidad en un mapa. Tras la comunicación y acuerdo previo con los establecimientos, se fueron diagramando las fechas de las actividades en terreno.

### **b. Toma de muestras.**

Se realizaron auditorías en cada uno de los establecimientos incluidos en el estudio (ver descripción más adelante) y se realizó la toma de muestra de cada uno de los productos elaborados y disponibles, de acuerdo con el siguiente plan de muestreo:

Reconociendo que el artículo 302 del CAA establece para el análisis microbiológico de los chacinados contar con planes de muestreo de dos clases y de tres clases (ICMSF), que estipulan 5 muestras de producto, pero a la vez, considerando que el estudio implica la participación de pequeños productores artesanales que impide la toma de dicha cantidad de muestras debido a un volumen de producción muy reducido, no pudiendo en estos términos concretarse la investigación, se consideró adaptar los criterios de aceptación\* para cada parámetro microbiológico considerando una sola muestra "indicativa" para cada tipo de chacinado disponible, obtenida de manera adecuada, aleatoriamente del lote, estipulando como suficiente para conocer las características del producto. Esta particularidad se menciona en el CAA, y refiere que ".....cuando el número total de unidades del lote fuera igual o inferior a 100 unidades, se procederá a la toma de una muestra indicativa (n = 1)" (22).

#### **Toma de muestras de chacinados.**

En todos los casos se procedió a la toma de una pieza entera representativa del lote, siempre manteniendo las condiciones de esterilidad (uso de guantes, utensilios y envases estériles). En los casos de productos ya envasados (ej. envasados al vacío) se mantuvieron en su envase original.

Las muestras fueron debidamente rotuladas y acompañadas de datos descriptivos y de identificación exactos y se guardaron en una conservadora con refrigerantes, verificando que la temperatura fuese inferior a los 10 °C durante el transporte al laboratorio, que se realizó en todos los casos dentro de las 4 h. Una vez en el laboratorio, se mantuvieron refrigeradas (0 - 5 °C), y se procedió al procesamiento dentro de las 24 h siguientes de acuerdo con metodología oficial, previa caracterización del producto \*.

#### **Toma de muestras de agua.**

Se utilizaron frascos de polipropileno roscados con tapa de polipropileno estériles, con capacidad de 150 ml, tomando muestras representativas del agua del grifo del ambiente de elaboración del establecimiento. Se desinfectó la salida de la muestra y se utilizaron técnicas asépticas para evitar la contaminación de ésta. Se dejó correr el agua durante 2 minutos, y se cargó el recipiente, dejando un espacio aéreo de al menos 2,5 cm para facilitar la mezcla previa al estudio. Las muestras fueron debidamente rotuladas y acompañadas de datos descriptivos y de identificación exactos y se guardaron en una conservadora con refrigerantes, verificando que la temperatura fuese inferior a los 10°C durante el transporte al laboratorio. Una vez en el laboratorio, se mantuvieron refrigeradas, y se procedió al procesamiento en las 2 h siguientes (53).

#### **c. Caracterización del producto chacinado (\*).**

Se realizó la caracterización de cada producto, de acuerdo con la denominación y tipo de chacinado (embutido / no embutido, y a su vez, fresco, cocido o seco, según corresponda) según lo establece la legislación vigente (12; 54).

#### **d. Análisis de laboratorio.**

##### **Caracterización microbiológica de chacinados.**

Por caracterización microbiológica se entiende al conjunto de aquellas características que se precisen para definir a un alimento en términos de inocuidad desde el punto de vista microbiológico, pudiendo incluir a microorganismos indicadores y/o patógenos.

A cada muestra se le realizaron las determinaciones de parámetros microbiológicos que, de acuerdo con el tipo de producto, se detallan en la Tabla 1. La metodología utilizada en el laboratorio

es la establecida por la normativa, ley 18.284 CAA, Capítulo VI, Artículo 302 – (Resolución Conjunta SPReI N° 179/2012 y SAGyP N° 715/2012).

**Tabla 1.** Parámetros microbiológicos en chacinados, sus límites de aceptación y metodología de análisis.

Parámetro	Embutidos			No embutidos		Metodología
	frescos	secos	cocidos	frescos	cocidos	
	Límite de aceptación					
Recuento de aerobios mesófilos (UFC/g)	--	--	10 <sup>5</sup>	--	10 <sup>5</sup>	ISO 4833:2003
Recuento de <i>E. coli</i> (NMP/g o UFC/g)	10 <sup>3</sup>	<3	<3	10 <sup>3</sup>	<3	ISO 16649-3:2005, ICMSF -1
Recuento de Estafilococos coagulasa positiva (UFC/g)	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	ISO 6888-1:1999
Recuento de mohos y levaduras (UFC/g)	--	--	10 <sup>3</sup>	--	10 <sup>3</sup>	ISO 21527-2:2008
Recuento de anaerobios sulfito-reductores (UFC/g)	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	ISO 15213:2003
<i>Salmonella spp</i>	ausencia en 25 g	ausencia en 25 g	ausencia en 25 g	ausencia en 25 g	ausencia en 25 g	ISO 6579:2002 Co: 2004
<i>Listeria monocytogenes</i>	--	ausencia en 25 g	ausencia en 25 g	--	ausencia en 25 g	ISO:11290-1:1996

Nota: Cabe aclarar el citado artículo 302 ha sufrido ligeras modificaciones en enero de 2017, de acuerdo con Resolución Conjunta SPReI y SAV N° 4 - E/2017, pero no se adoptaron a los fines de uniformidad en el estudio y a que se estaba finalizando la etapa de procesamiento de muestras.

*E. coli* O157:H7/NM no fue considerado en esta investigación debido a imposibilidad de realización por limitaciones técnicas operativas del Laboratorio.

Los límites de aceptación que figuran en la Tabla 1, de acuerdo con el tipo de determinación y productos, están de acuerdo con los límites microbiológicos considerados apropiados para el

alimento en el punto indicado de la cadena alimentaria, y están adaptados de las especificaciones contempladas en la normativa vigente (CAA, Capítulo VI, artículo 302) (50).

Criterio de aceptación para la muestra indicativa:

- para parámetros que presentan un plan de muestreo de 2 clases, mantener el plan y la alícuota de muestra analizada en gramos para cada parámetro; o sea aceptación o rechazo, en función de la presencia o ausencia del microorganismo investigado en la muestra indicativa.

- para parámetros que presentan un plan de 3 clases, pasar a uno de 2 clases donde ningún valor deberá sobrepasar el valor máximo (M) propuesto, o sea aceptación si el recuento del microorganismo en la muestra indicativa es  $\leq M$  y rechazo si el recuento del microorganismo en la muestra indicativa es  $> M$ . El resultado de la muestra indicativa es interpretado para todo el lote o partida” (22).

**Metodología para el análisis microbiológico de chacinados.**

Para la **preparación de la muestra, suspensión inicial y diluciones** se procedió de acuerdo con metodología ISO 6887-1:1999. (véase el Anexo 3)

Para el **recuento de aerobios mesófilos (UFC/g) a 30°C**, se realizó el procedimiento según ISO 4833-2:2013, por método horizontal, mediante la técnica de siembra en superficie, (véase el Anexo 4).

Para el **recuento de *Escherichia coli* NMP/g**, se efectuó el procedimiento según ICMSF Método 1 (véase el Anexo 5) o ISO 16649-2:2001 (véase el Anexo 6)

Para el **recuento de Estafilococos coagulasa positiva (UFC/g)** se realizó la técnica de recuento en placa, procedimiento según ISO 6888-1: 1999 (véase el Anexo 7)

Para el **recuento de mohos y levaduras (UFC/g)** se procedió según ISO 21527- 2:2008 (véase el Anexo 8).

Para el **recuento de anaerobios sulfito reductores (UFC/g)** se procedió según ISO 15213:2003 (véase el Anexo 9).

Para la determinación de ***Salmonella spp*** en 25 g, se procedió de acuerdo con ISO 6579:2002; Co 2004 (véase el Anexo 10).

Para la determinación de ***Listeria monocytogenes*** en 25 g, se realizó el procedimiento según ISO: 11290- 1:1996 (véase el Anexo 11).

### **Metodología para el análisis microbiológico del agua.**

Se realizaron las siguientes determinaciones microbiológicas, de acuerdo con criterios establecidos en la normativa vigente (CAA, Art 982), como se resume a continuación:

#### **- Bacterias coliformes: NMP a 37 °C- 48 hs. (Caldo Mc Conkey), en 100 mL.**

Por el método 9221.F de Standard methods examination of water and wastewater 20° Edition.

Valor aceptable: igual o menor de 3 NMP/ 100 mL.

#### **- *Escherichia coli* en 100 mL**

De un tubo con caldo Mc Conkey simple concentración, incubado a 44,5°C que haya dado reacción positiva, se sembraron placas con medio EMB. Se incuban a 37°C durante 24 h. De las colonias desarrolladas, se eligió una de color negro-verdoso con brillo metálico (sospecha de *E. coli*), y se sembró con ansa aguja en tubos con Agar triptosoya, que se incubaron a 37°C durante 24 h. De esta manera se aisló la cepa pura, que luego se desarrolló en tubo de estrías, lográndose material para realizar las pruebas bioquímicas diferenciales para la *E.coli*. (indol (+), rojo de metilo (+), Voges Proskauer (-) Citrato de sodio (-))

Valor aceptable: Ausencia en 100 mL.

#### **-*Pseudomonas aeruginosa* en 100mL.**

Prueba presuntiva: Sembrar en caldo asparagina en doble concentración. Incubar a 37 °C durante 48 h. Se consideraron positivos los tubos que observados con lámpara UV se vieron fluorescentes y mostraron producción de pigmentos.

Prueba confirmatoria: Se inocularon 0,1 mL del cultivo en medio líquido acetamida y se incubaron a 37°C por 48 h. La reacción positiva fue dada por un pH elevado, detectable por el color púrpura que aparece.

Valor aceptable: ausencia en 100 mL.

#### **-Recuento de bacterias mesófilas en agar.**

Mezclar cuidadosamente la muestra. Colocar 1 mL de ésta en la placa de Petri. A continuación, se vuelca 15 mL de medio Plate Count Agar (agar para recuento) licuado y a una temperatura no mayor de 44°C. Se debe mezclar cuidadosamente evitando proyectar la mezcla hacia los bordes de la placa. Dejar solidificar e incubar a 37°C durante 24-48 h con la placa invertida.

Valor aceptable: Hasta 500 UFC/mL. (En el caso de que el recuento supere las 500 UFC/mL y se cumplan el resto de los parámetros indicados, sólo se deberá exigir la higienización del reservorio y un nuevo recuento).



Criterio de potabilidad: El agua se consideró “potable” cuando los valores fueron “aceptables” para los tres primeros parámetros citados, y “no potable” cuando cualquiera de los tres primeros parámetros microbiológicos citados hubiese mostrado valores “no aceptables”.

#### **e. Caracterización del tipo de elaboración de chacinados.**

Se estableció la categoría de establecimiento industrial, semi industrial o artesanal en base principalmente a los siguientes parámetros: instalaciones / equipamiento, volúmenes de producción, cantidad y relación contractual con el personal y sistemas de comercialización, definiéndose las siguientes denominaciones operacionales de variables como:

**Establecimiento industrial**: aquel cuya producción de alimentos se logra a partir de instalaciones y/o equipamiento a predominio de tipo industrial (automático / semiautomático), con volúmenes productivos de magnitud, personal contratado, y sistemas de comercialización masivos (alcance a toda la provincia y nacional).

**Establecimiento semi-Industrial**: aquel cuya producción se realiza en instalaciones de magnitud intermedia, con algún equipo automático o semiautomático, volúmenes intermedios, y sistemas de comercialización dentro de la localidad o a localidades de la provincia, con personal contratado.

**Establecimiento artesanal**: aquel cuya producción se realiza en pequeñas instalaciones, sin equipos automáticos o semiautomáticos, escaso volúmenes de producción y comercialización solo a nivel local, como emprendimiento familiar o con participación de algún personal contratado.

#### **f. Determinación de las condiciones higiénico- sanitarias y prácticas de elaboración.**

Las condiciones higiénico-sanitarias y prácticas de elaboración son conceptos relacionados a los procedimientos que se efectúan sobre la materia prima hasta el alimento terminado en cualquier etapa de su procesamiento, necesarios para lograr alimentos inocuos, saludables y sanos. Se midieron a partir de una herramienta: **acta de auditoría de BPM**, basada en riesgo, a modo de planilla de chequeo sistemático para registrar variables, según observación directa y por formulación de preguntas al responsable (véase el Anexo 1).

Frente al tipo de acta “abierta” históricamente utilizada donde de manera obligatoria se consignaban únicamente los datos generales del establecimiento, y existía un apartado para redactar lo que a criterio del inspector fuera necesario, careciendo de una sistematización que

obligue a verificar “todos” los aspectos importantes en una empresa alimenticia, se hizo necesario e indispensable la generación de una nueva herramienta que , además de ser equitativa, es decir, que obligue a inspeccionar a todos los establecimientos de la misma manera, sea universal, es decir que pueda ser utilizada en todo tipo de establecimientos alimenticios, que estén involucrados con cualquier matriz alimentaria, y estandarizada, es decir , que incluya todos los aspectos generales y necesarios en la implementación de BPM.

Estos aspectos de BPM, a su vez, se pueden dividir en tres grandes grupos, los relativos a “lo que hay que tener” es decir, las **condiciones generales** de infraestructura, equipamiento, etc., lo concerniente a “lo que hay que hacer” en lo referente al **control de los procesos**, los **procedimientos**, que deberán estar escritos formando parte de un plan o programa de BPM ( Incluyendo los POES y el MIP), y deberán verse reflejados en los **registros** diarios que avalen la ejecución de los procedimientos descritos, y aspectos de **personal**, incluidos la capacitación, libreta sanitaria, uniforme, dependencias para higiene personal, etc. Los *ítems* que se incluyeron fueron agrupados en los siguientes apartados: recepción y almacenamiento de materia prima, elaboración, almacenamiento de producto terminado y egreso, gestión de residuos, manejo de plagas, personal, sanitarios y control de calidad.

Para poder establecer una categorización del riesgo de los establecimientos, se realizó una ponderación de cada uno de los puntos a evaluar, tras adaptación de los criterios basados en el riesgo de la lista de chequeo de BPM (disposición 1930/95 ANMAT), sobre la base de dar puntaje decreciente a los clasificados en dicha norma como indispensables (valor=2), necesarios (valor=1), recomendables (valor=0,5) siendo entonces la sumatoria de todos los *ítems* aplicables un puntaje total deseado, que significa un 100% de adherencia o cumplimiento a las BPM. Los criterios de aceptabilidad están basados en la normativa vigente (Resolución 80/96 Mercosur y Disposición 1930/1995). En el caso de que un establecimiento no cumpla con ciertos criterios, existe un apartado a la derecha con “observaciones” donde deben describir en forma detallada las no conformidades, no sumando el valor respectivo, siendo su puntaje final un porcentaje en relación con el ideal. De este modo, cada establecimiento obtuvo una sumatoria y un porcentaje, que, según el valor alcanzado, se ubicó dentro de alguna de tres categorías de riesgo (véase más adelante). En el apartado final de dicha acta, consignado como “conclusiones” se consigna cualquier otra información importante no citada con anterioridad (ej.: la referida a producción) y se expresan los plazos acordados para que se den soluciones a las no conformidades detectadas y además se pueden consignar datos de muestras recolectadas.

Para cada elaborador se cuantificaron los criterios de BPM presentes, cuya proporción (%) respecto del total determinó el “riesgo”, clasificándose como sigue: 70 a 100% de cumplimiento o adherencia = “bajo riesgo”; 40 a 69,9 % de cumplimiento o adherencia = “mediano riesgo”; 0 a 39,9 % de cumplimiento o adherencia = “alto riesgo”.

Estas actas, en duplicado, fueron firmadas por el fiscalizador (auditor) y el responsable del establecimiento (auditado), quedando el original en poder del auditor y el duplicado en poder del auditado.

Para el análisis de las diferentes aspectos de las BPM contenidos en la herramienta de auditoría, se agruparon la totalidad de las variables ponderadas en tres subgrupos, basados en los principios básicos de higiene (55) y de las BPM ( véase en Anexo 1, subgrupos de BPM en colores diferentes). Fue así como, en base a los puntajes establecidos, quedaron distribuidos de la siguiente manera:

**Tabla 2.** Subgrupos de buenas prácticas de manufactura (BPM) incluidos en el acta de auditoría, puntaje parcial ponderado y su aporte al puntaje total.

Subgrupo	Aspectos BPM	Puntaje	Aporte
A	Características generales establecimiento/ instalaciones/ equipos	37	50 %
B	Personal (higiene, salud, capacitación, prácticas)	15,5	21%
C	Control de procesos, documentación y registros (BPM, POES, MIP)	21,5	29%
Total		74	100%

Para el sub-análisis, se estimó en términos porcentuales el aporte a cada subgrupo, de manera de continuar con el mismo rango de valores para riesgo, pero esta vez, orientado a cada subgrupo, para poder analizar factores causales con mayor precisión (puntaje total subgrupo A= 37 puntos, subgrupo B=15,5 puntos, subgrupo C= 21,5 puntos). Es decir, para cada subgrupo se volvió a categorizar el riesgo en “alto” (0-39.9% de adherencia a ese subgrupo), “mediano” (40-69.9% de adherencia para ese subgrupo) y “bajo” (70-100% de adherencia para un determinado subgrupo) en base a la sumatoria de los parámetros cumplidos frente al puntaje total para cada subgrupo.

### 3. INFORMACION PRELIMINAR

De acuerdo con los archivos de registros de establecimientos (R.N.E., R.P.E.A.) pertenecientes al rubro de alimentos cárneos y afines, disponibles en la Dirección de Saneamiento Ambiental del Ministerio de Salud Pública de Misiones, se constaba al inicio de la investigación con 36 establecimientos, elaboradores de chacinados y/o salazones. Tras el inicio del trabajo en terreno, se pudo constatar que 14 de ellos habían sido dados de baja o no existían en la dirección citada,

por lo cual, para aumentar el número de establecimientos, respecto al proyecto original, se decidieron ampliar los criterios de inclusión, para abarcar también a los nuevos establecimientos con expediente de trámite administrativo para la inscripción respectiva al R.N.E. o al R.P.E.A., alcanzando de esta manera el número final de 28 establecimientos elaboradores de chacinados (n=28), que correspondieron a 15 municipios de la provincia.

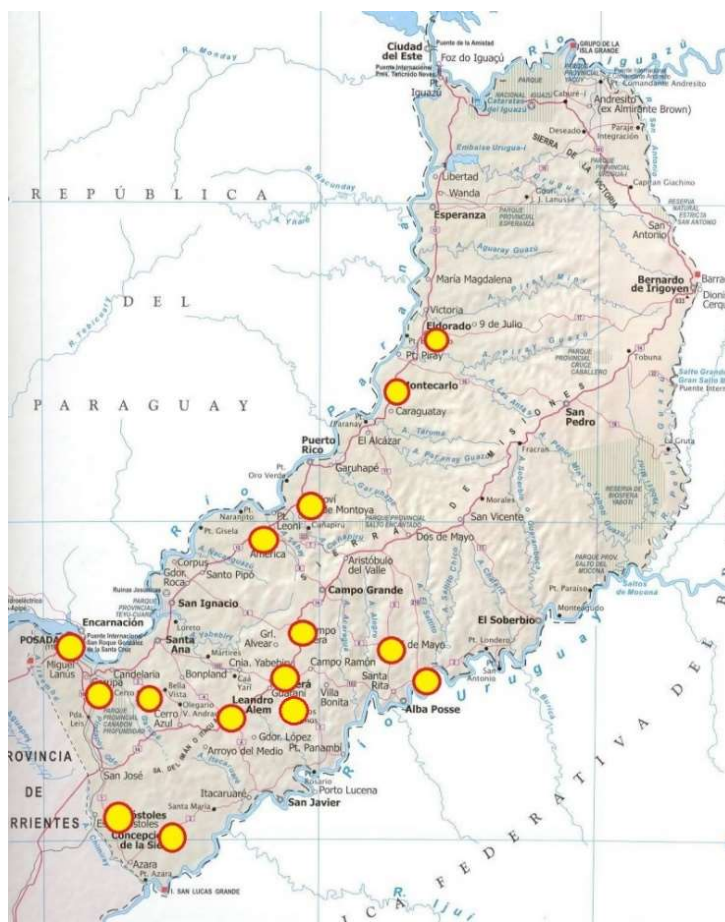
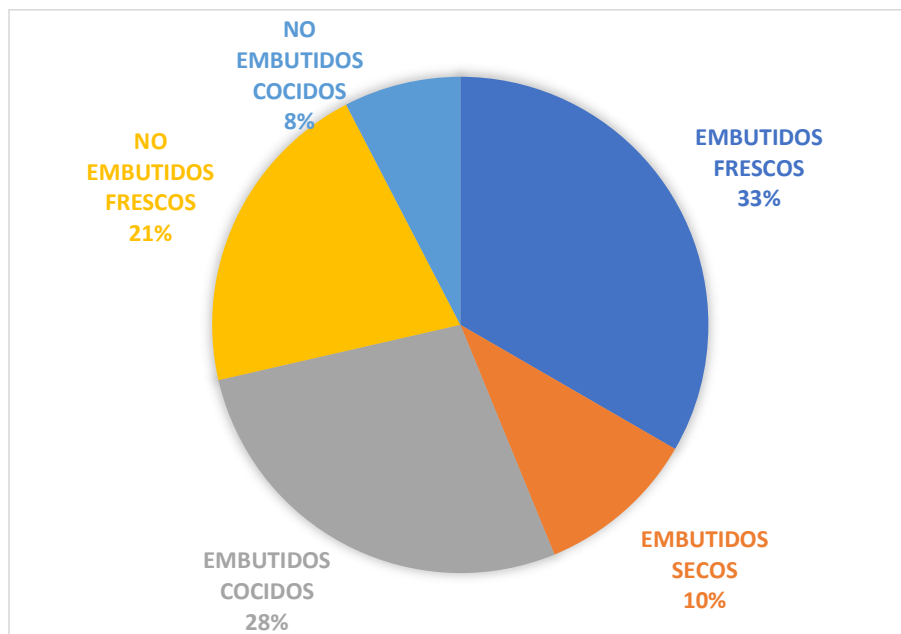


Figura 1. Ubicación geográfica de los 15 municipios donde se emplazan los 28 establecimientos elaboradores de chacinados en Misiones.

Véase la distribución geográfica en la Figura 1. Se destaca la existencia de ocho establecimientos (28,6%) en la ciudad de Posadas, correlacionándose con últimos datos censales en cuanto al porcentaje poblacional relativo, 277.564 habitantes (25,2% del total provincial) (5).

#### 4. RESULTADOS y DISCUSION

De los 28 establecimientos elaboradores, se recolectaron un total de 105 productos.

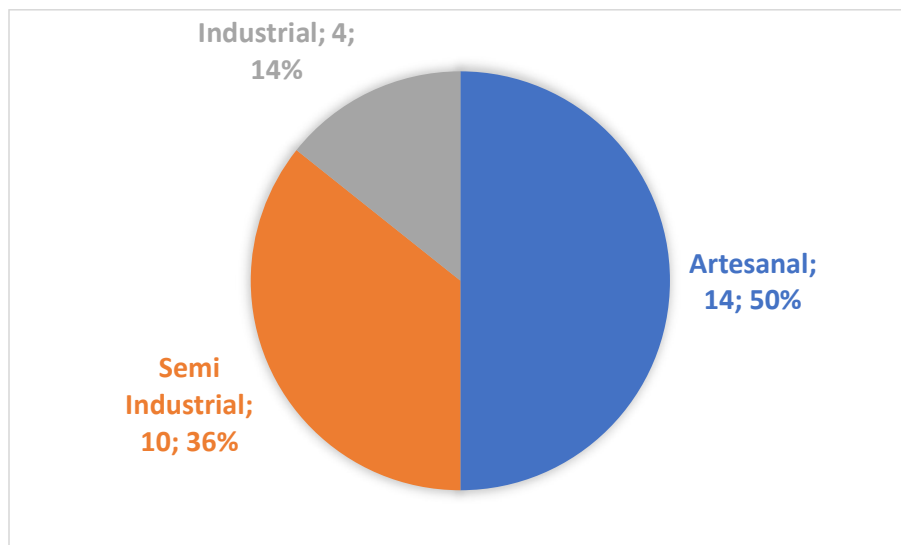


**Figura 2.** Tipo de chacinados elaborados en Misiones (n=105).

Véase en la Figura 2 la distribución de los chacinados de acuerdo con la clasificación general. En la Tabla 3 se pueden visualizar los diferentes tipos de productos según categorías y cantidades. Para simplificar los grupos, no se consideraron variaciones en los tipos de carnes (ej. vaca, cerdo, ave) o tipos de picados (ej. fino, grueso) o calidades de denominación (ej. especial, común).

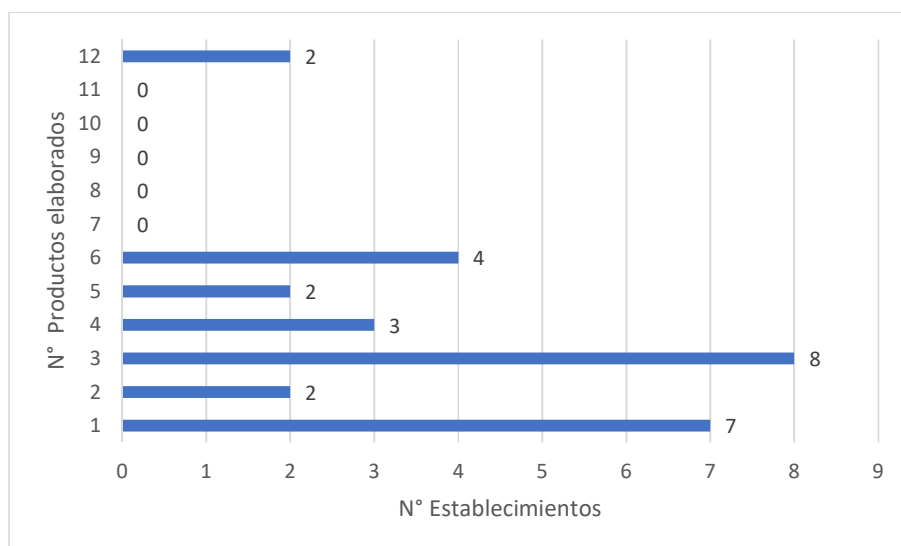
**Tabla 3.** Clasificación de los chacinados, denominaciones de productos y cantidades analizadas (n=105).

Clasificación de chacinados		Denominación del producto (variedad)	Cantidades
Embutidos	Frescos (35)	Chorizos	32
		Salchichas parrilleras	3
	Secos (11)	Salames y salamines	9
		Chorizos secos	2
	Cocidos (29)	Morcillas	8
		Mortadelas	5
		Chorizo ahumado	4
		Rosca ahumada	4
		Salchichones	3
		Cracovia	2
Salchichas		2	
Paté (embutido)		1	
No embutidos	Frescos (22)	Milanesas	16
		Hamburguesas	6
	Cocidos (8)	Queso de Cerdo	7
		Albóndigas (congeladas)	1



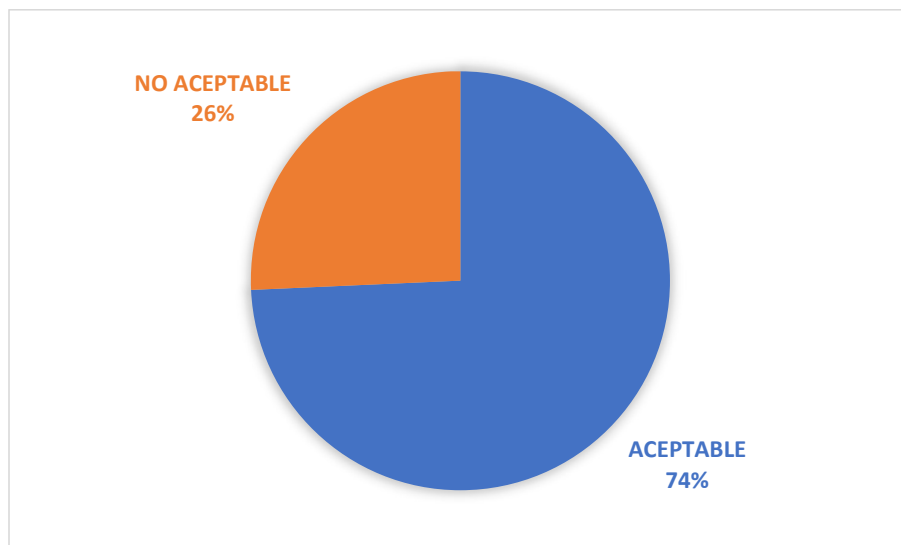
**Figura 3.** Distribución de los establecimientos elaboradores de chacinados en Misiones según el tipo de elaboración (n=28).

Nótese en la Figura 3, el tipo de elaboración es heterogénea, patrón compatible con el tipo de producción porcina e industrial que presenta nuestra provincia, según lo relata un informe técnico del año 2013(4).



**Figura 4.** Cantidad de productos elaborados (tipos) por establecimiento (n=28).

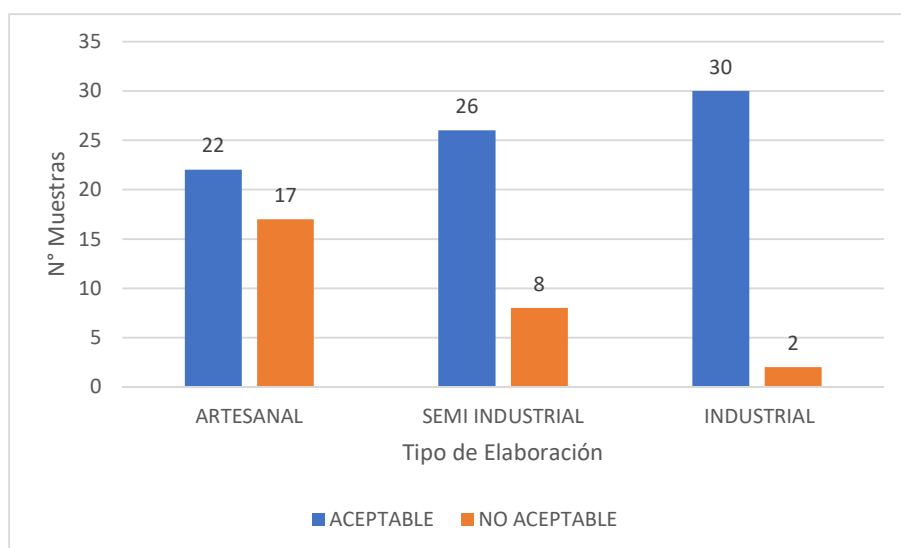
De acuerdo con la variedad de productos elaborados por cada establecimiento, se encontró una moda de 3, con un mínimo de 1 y máximo de 12. Nótese en la Figura 4 la distribución citada. El número de variedades de productos elaborados difiere según el tipo de categoría, siendo el promedio para los industriales de 7,8 (DS: 4,9244), para los semi-industriales de 3,4 (DS: 1,8379) y 2,9 para los artesanales (DS: 1,8337).



**Figura 5.** Calidad microbiológica de los chacinados elaborados en Misiones (n=105).

En cuanto a la calidad microbiológica, 78 productos, 74,3 % (n=105) estuvieron dentro de los valores aceptables para las determinaciones realizadas, mientras que los 27 restantes, 25,7% (n=105) presentaron uno o más parámetros no aceptables, véase la Figura 5.

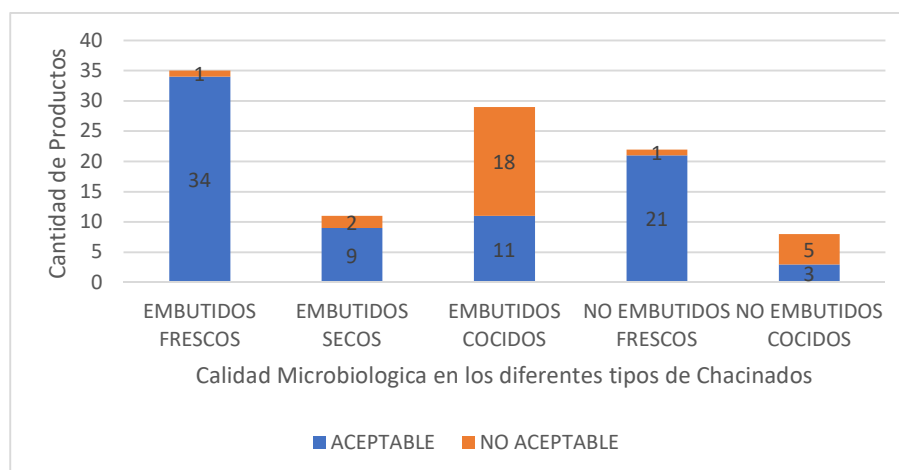
Este porcentaje de productos no aceptables se aproxima con resultados de investigadores de la región (Paraná-Brasil, con limítrofe Misiones) quienes determinaron que 31,7% de los embutidos analizados (n=60) no cumplían los criterios microbiológicos exigidos en la normativa (39).



**Figura 6.** Calidad microbiológica de los chacinados según tipo de elaboración (n=105).

En la Figura 6 se puede apreciar la distribución de los productos con calidad microbiológica “aceptable” y “no aceptable”, de acuerdo con el tipo de elaboración.

Al agrupar los tipos de establecimientos “semi-Industriales” con “industriales”, se compararon frente a los “artesanales”, en relación con la calidad microbiológica de los chacinados y se encontró que la asociación entre industrialización y calidad microbiológica fue estadísticamente significativa ( $p=0,0023$ ).



**Figura 7.** Calidad microbiológica en los diferentes tipos de chacinados analizados (n=105).

En la Figura 7 se pueden apreciar resultados microbiológicos más desfavorables en los productos “cocidos”. Se encontró asociación estadística significativa entre productos “cocidos” y calidad microbiológica “no aceptable” ( $p<0,0001$ ).

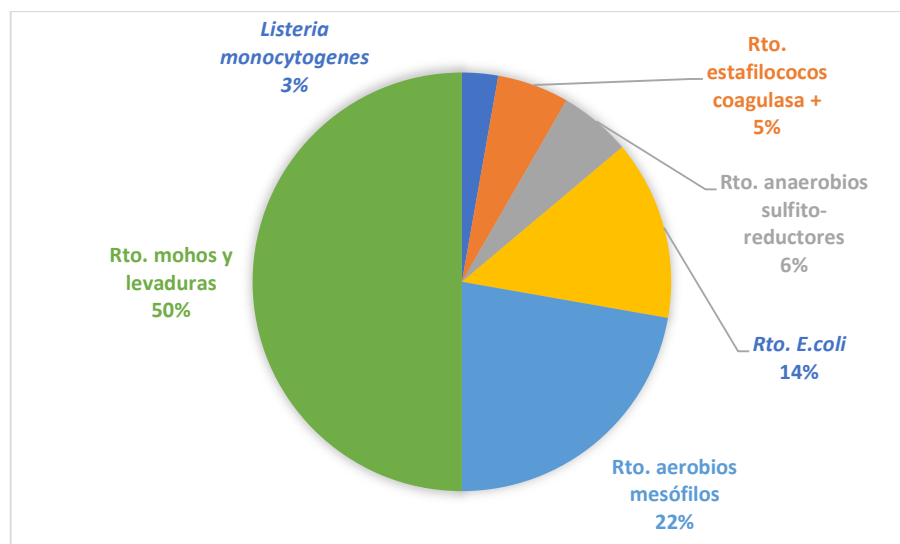
En cuanto a los parámetros microbiológicos que resultaron con calidad “no aceptable”, respecto a los microorganismos estudiados, y según tipo de productos, encontramos la siguiente distribución (véase la Tabla 4).

**Tabla 4.** Comparación de los diferentes tipos de chacinados según los resultados “No aceptables” en los parámetros microbiológicos estudiados.

Resultados “No Aceptables”	Embutidos frescos (n=35)	Embutidos secos (n=11)	Embutidos cocidos (n=29)	No embutidos frescos (n=22)	No embutidos cocidos (n=8)	TOTAL
Recuento de <i>Escherichia coli</i> (NMP/g o UFC/g)	1	2	1	0	1	5
Recuento de aerobios mesófilos (UFC/g)		0	5		3	8
Recuento de Estafilococos coagulasa positiva (UFC/g)	0	0	1	1	0	2
Recuento de mohos y levaduras (UFC/g)		0	14		4	18
Recuento de anaerobios sulfito-reductores (UFC/g)	0	0	2	0	0	2
<i>Listeria monocytogenes</i>		0	1		0	1
<i>Salmonella spp.</i>	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>24</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>36</b>



Estos resultados vuelven a mostrar a los productos cocidos (embutidos y no embutidos) como los que presentan mayores dificultades a nivel microbiológico, representando al 88% de las muestras con resultados “no aceptables” (n=36).



**Figura 8.** Distribución de los parámetros microbiológicos con límites excedidos de acuerdo con el número de muestras no aceptables (n=36).

El parámetro no conforme más frecuente lo representan los recuentos elevados de mohos y levaduras, seguido de recuento de aerobios mesófilos (RAM), representando ambos el 72% del total (n=36), como se aprecia en la Figura 8.

Ambos son microorganismos indicadores que corresponden a un criterio recomendatorio, es decir que no existe peligro directo para la salud. En el primero, debe considerarse como para alertar sobre deficiencias en el proceso o almacenamiento. En este punto, debe analizarse una serie de variables, no existiendo linealidad en este proceso, sino que la integración de estas y el criterio del investigador determinarán la decisión a tomar. Debe realizarse inmediatamente una investigación integral de las BPM, pudiendo incluirse un nuevo muestreo y poniendo especial énfasis en las prácticas de higiene del establecimiento. Los datos recolectados en este procedimiento serán la base de la toma de decisión: si existe evidencia de que un punto crítico del proceso no se encuentra bajo control, debe generarse acción inmediata. La evidencia puede referir a las materias primas, a las condiciones microbiológicas de los equipos de proceso, a deficiencias en la manipulación del alimento, a falta de control de temperaturas de almacenamiento / cocción, al hallazgo de microorganismos indeseables en el ambiente de proceso o la condición microbiológica del producto terminado. El RAM también se utiliza para monitorear la implementación de BPM y refleja: contenido microbiano de materiales crudos e ingredientes, la eficiencia del procedimiento de

elaboración / proceso, la condición de higiene del equipo y utensilios y la relación tiempo-temperatura de almacenamiento y distribución. Alimentos perecederos manipulados correctamente pueden desarrollar RAM elevados y perder calidad si son almacenados por un período de tiempo prolongado (en este caso, no se encontraría elevado por la condición de higiene del producto, sino por la vida útil del mismo). Por ello es que la utilidad del indicador depende de la historia del producto y el momento de la toma de muestra (23).

Sobre un total 37 de productos cocidos, 23 (62,2%) fueron no aceptables. Del total de establecimientos (n=28), 12 (42,9%, n=28), elaboraron productos cocidos, y de este grupo solamente 2 (16,7%, n=12) poseían registros de los tratamientos térmicos. Se halló asociación estadística significativa entre “registro de tratamientos térmicos” y productos “aceptables” (p= 0,0021). Siendo la medición de temperatura en los productos cocidos un punto crítico de control, para revertir esta situación, deben cumplirse las especificaciones técnicas del proceso, verificarse un mínimo de 65 °C en el centro de la pieza más desfavorable, además de verificar condiciones higiénico- sanitarias satisfactorias en el ambiente. Además, son cruciales: el enfriamiento de forma inmediata (ej. duchas de agua), debiendo garantizar la potabilidad del agua, un envasado (ej. al vacío) que impida la recontaminación; adecuadas condiciones higiénicas ambientales, de utensilios, equipos y superficies, y buenas prácticas de manipulación (54).

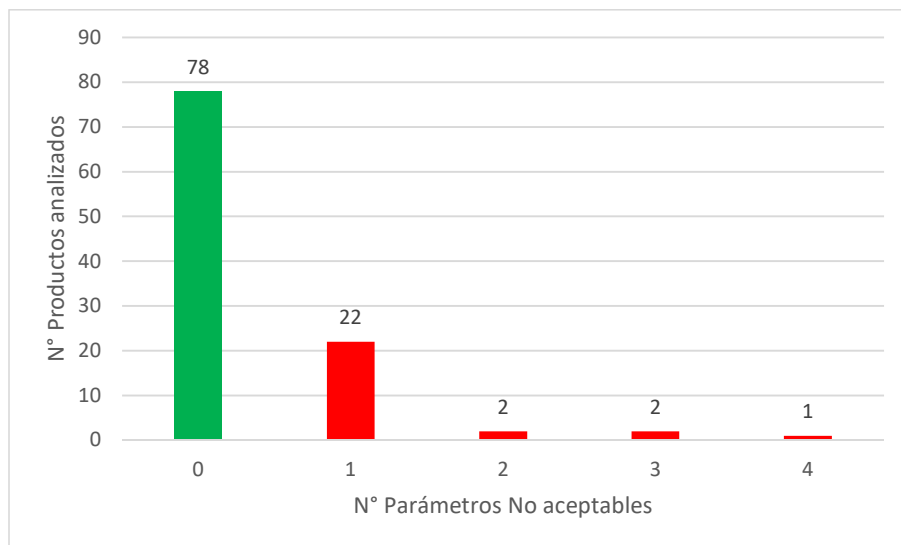
Hay que destacar que no se halló el patógeno *Salmonella spp.* en ninguna de las muestras estudiadas, dato alentador desde el punto de vista epidemiológico, tratándose del microorganismo implicado en la mayoría de los casos de ETA , según lo relatan varios autores (24) (25)(27) (29).

Se confirmó la presencia de *Listeria monocytogenes* en un embutido cocido, morcilla, de elaboración artesanal. Aunque la presencia de un patógeno requiere de la acción inmediata de la autoridad de aplicación según la situación particular (por ejemplo, el retiro del mercado), la legislación provee alternativas a la destrucción si el producto, por el tratamiento que sufre durante su procesado, al momento de su consumo es inocuo (23). Molina-Moreno y colaboradores demostraron, en un estudio realizado en Colombia, que tiempos de 15 minutos de cocción y 5 minutos de fritura son suficientes para inactivar concentraciones de  $10^3$  / g de *Listeria monocytogenes* inoculadas artificialmente en chorizos, y que temperaturas internas de 73°C son suficientes para la inactivación de este patógeno a nivel industrial (32). La morcilla, a pesar de estar definido como embutido cocido en el artículo 343 del CAA (54), por su tipo de consumo en nuestro país, sufre un tratamiento térmico posterior, con lo que el riesgo disminuye.

Así también se observaron no conformidades en *E. coli* en embutidos “secos”, lo que implica el riesgo de que puedan encontrarse en el mismo, patógenos entéricos que constituyan un riesgo para la salud. En muchos productos crudos de origen animal, bajos recuentos de *E. coli* pueden ser esperados dada la asociación cercana de estos alimentos con el ambiente animal y por la probabilidad de la contaminación de las carcasas, reses, etc. con materia fecal animal durante la faena (55). Estos productos deben necesariamente sufrir un proceso de curado en salmuera y una fermentación, donde bacterias lácticas se multiplican, con producción de ácido láctico, aumento de la acidez, y producción de bacteriocinas (6), disminuyendo la flora gram negativa. A medida que transcurre el madurado, el producto sufre deshidratación. Algunos investigadores indican que la maduración inicial debe realizarse manteniendo la carne en refrigeración preferentemente (37). Al considerar el clima subtropical de la provincia de Misiones, con temperatura media anual de 21 °C y veranos con temperaturas superiores a 35°C (5), sin tomar en cuenta las consideraciones citadas en la elaboración de estos productos, se estaría favoreciendo la multiplicación de *E. coli*. Debido a que los embutidos secos no están cocidos, las personas en “alto riesgo” (adultos mayores, niños, embarazadas e inmunosuprimidos) deberían evitarlos. Aunque no se pudo incluir en este estudio por limitaciones técnicas del laboratorio participante, es importante citar que *E. coli* O157:H7, puede sobrevivir el proceso de fermentación, y en 1994, algunos niños se enfermaron después de ingerir salame seco curado que contenía dicha bacteria (57).

Dos productos presentaron no conformidades en los recuentos de “estafilococos coagulasa positiva”: un embutido cocido y no embutido fresco. En el primer caso, pueden significar cocción insuficiente, o recontaminación posterior (manipulación, contacto con equipo o aire contaminados y/ o conservación inadecuada del mismo- falta de refrigeración-). En el segundo caso, materia prima contaminada, contaminación durante el procesamiento a partir del manipulador o ambiente. La presencia de *S. aureus* puede indicar un riesgo potencial para la salud y recuentos elevados se asocian a la presencia de toxinas termoestables, no obstante, recuentos bajos no significa ausencia de éstas, ya que la población pudo haber disminuido en la cocción u otra etapa del proceso (56).

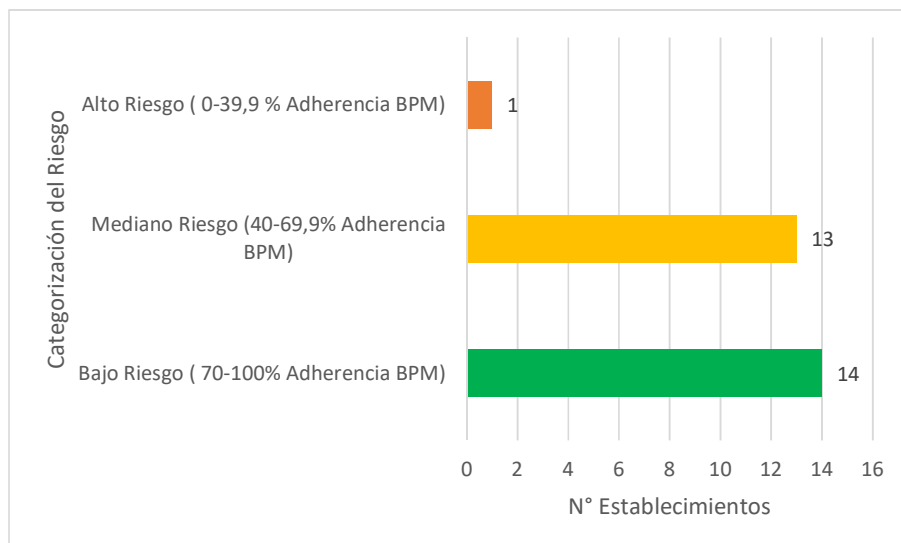
Dos embutidos cocidos tuvieron elevado el recuento de “anaerobios sulfito-reductores”, pudiendo indicar la contaminación fecal de las materias primas, deficiencias en los tratamientos térmicos, inadecuadas condiciones de higiene en general, e incluso a partir del agua utilizada en cada una de las fases de elaboración, ya que se ha demostrado su resistencia a los tratamientos de descontaminación del agua (59). Este resultado también indica el riesgo de patógenos entéricos que constituyan un riesgo para la salud.



**Figura 9.** Distribución de frecuencias de cantidad de parámetros microbiológicos con valores no aceptables para los diferentes productos analizados (n=105).

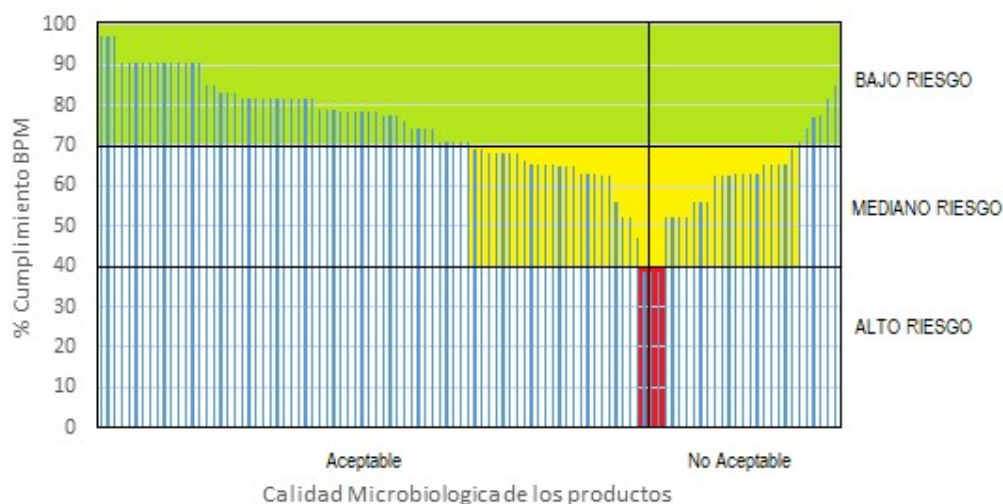
La distribución de frecuencias de la cantidad de parámetros microbiológicos con valores no aceptables en los diferentes productos analizados se muestra en la Figura 9, destacándose que dentro de los 27 productos considerados como no aceptables, 22 lo habían sido por el incumplimiento de un solo parámetro microbiológico.

En relación con las BPM, se encontró un promedio de adherencia de los establecimientos de 68,6% (n=28). Con una máxima de 97%, y mínima de 38,5 %.



**Figura 10.** Categorización del riesgo de los establecimientos elaboradores de chacinados de Misiones en base al porcentaje de adherencia a las buenas prácticas de manufactura (BPM) (n=28).

De acuerdo con la categorización de riesgo propuesta, se halló la distribución que se muestra en la Figura 10, correspondiendo el 50 % (n=28) al grupo de “bajo riesgo”, y solamente un establecimiento se categorizó como de “alto riesgo”, representando el 3,5% del total, e identificándose como elaboración del tipo artesanal, con 38,5% de cumplimiento de BPM.



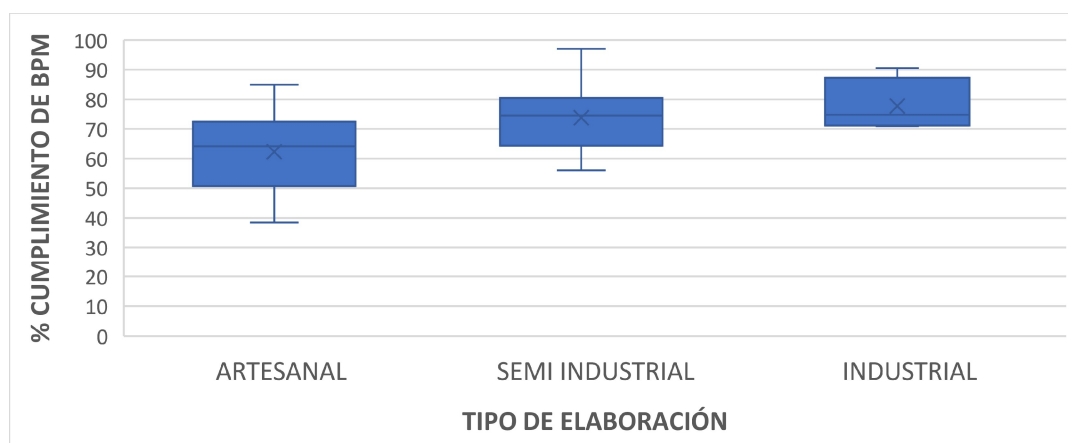
**Figura 11.** Distribución de los productos en base a calidad microbiológica en relación con el porcentaje de cumplimiento de buenas prácticas de manufactura (BPM) y riesgo del establecimiento elaborador. (n=105)

En la Figura 11 véase la distribución de los productos (n=105) según su calidad microbiológica y en los diferentes tipos de establecimientos en base a su cumplimiento de BPM / riesgo.

Nótese que existen algunos productos “aceptables” en establecimientos con “mediano o alto riesgo”, y productos “no aceptables” en los establecimientos de “bajo riesgo”. En este sentido, al analizar para cada establecimiento, la cantidad de productos **“aceptables” / total de productos x 100** y relacionarlos con el riesgo respectivo, se obtuvieron los siguientes promedios para cada uno de los subgrupos: 83,1% (n=14) para los de “bajo riesgo”; 71,7 % (n=13) para los de “mediano riesgo”; y 33,3% (n=1) para los de “alto riesgo”. Hay que notar que éstos son valores promedios y totales, no pudiendo discriminar aquí, las cantidades ni las variedades de productos elaborados por cada subgrupo (embutido, no embutido, fresco, cocido, seco) ni el tipo de parámetro microbiológico no conforme, es decir si se trató de microorganismos indicadores o patógenos. Por ejemplo, puede suceder que un establecimiento categorizado como de bajo riesgo, solamente elabore un embutido cocido, cuyo recuento de mohos y levaduras haya superado el límite de aceptabilidad por pocas unidades; en este caso el promedio de aceptabilidad será 0,00 % para este establecimiento, cuando el riesgo de ETA en los consumidores es muy bajo.

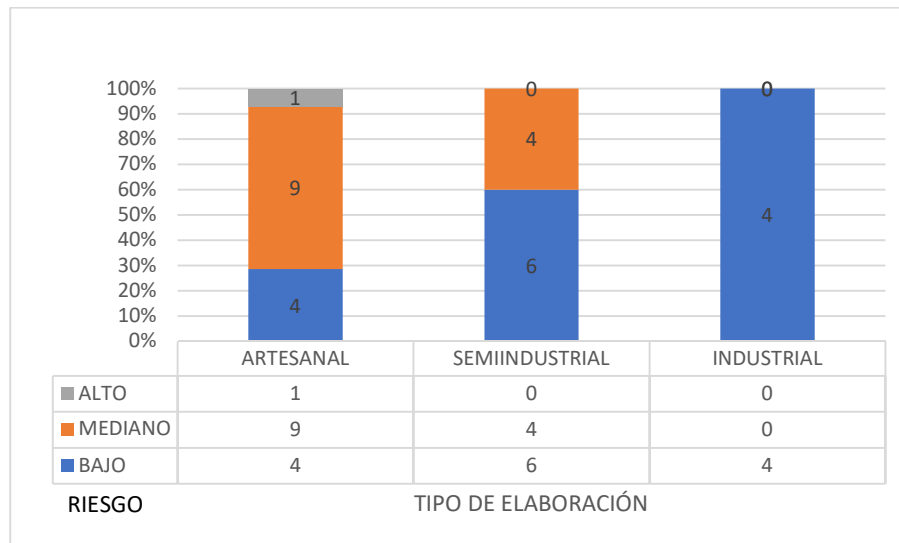
A su vez un establecimiento categorizado como alto riesgo que elabora tres productos puede presentar un producto aceptable, por ejemplo, chorizo fresco, y a su vez dos productos cocidos (listos para consumo) con la presencia de patógenos, con un riesgo de ETA alto, y el porcentaje de aceptabilidad de productos para este establecimiento será de 33,3%.

Para analizar estadísticamente riesgo de establecimientos y calidad microbiológica, se procedió a unificar los establecimientos con riesgos “mediano” y “alto” y enfrentarlo a riesgo “bajo”, se plasmaron los totales de los grupos según calidad microbiológica “aceptable” vs “no aceptable”, en una tabla de contingencia de 2x2. Se determinó asociación estadística altamente significativa entre el riesgo “bajo” de los establecimientos y la calidad microbiológica “aceptable” de los productos elaborados ( $p < 0,0001$ ).



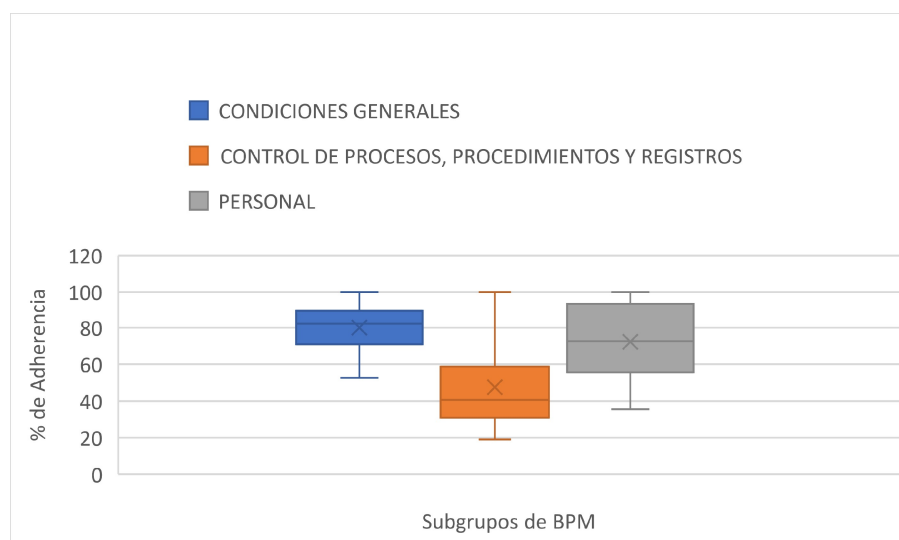
**Figura 12.** Distribución del porcentaje de cumplimiento de las buenas prácticas de manufactura (BPM) con relación al tipo de elaboración de los establecimientos (n=28).

En este sentido, la Figura 12 visualiza la distribución del porcentaje de cumplimiento de BPM en relación con el tipo de elaboración, que muestra un aumento progresivo en el porcentaje de cumplimiento de BPM a la vez que aumenta el grado de industrialización.



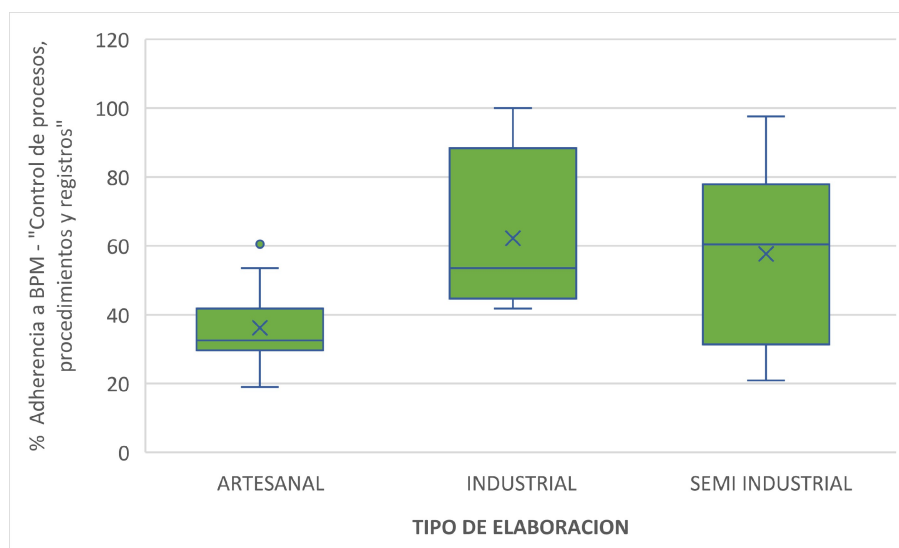
**Figura 13.** Distribución porcentual de los diferentes riesgos estimados en los establecimientos auditados de acuerdo con el tipo de elaboración (n=28).

La Figura 13 muestra la distribución porcentual de los riesgos según el tipo de elaboración, existiendo reducción porcentual del riesgo a medida que aumenta el nivel de industrialización: los emprendimientos industriales muestran un bajo riesgo en su totalidad, los semi-industriales comparten bajo y mediano riesgo, y los artesanales mantienen una preponderancia del mediano riesgo. Al agrupar los establecimientos semi-Industriales con industriales, y el riesgo mediano y alto, y realizar la contingencia frente a establecimientos artesanales y riesgo alto, no se encontró asociación estadísticamente significativa ( $p=0,0570$ ), aunque el valor límite encontrado se podría tomar como indicativo.



**Figura 14.** Porcentaje de adherencia de los establecimientos para cada subgrupo en referencia a las buenas prácticas de manufactura (BPM) (n=28).

La Figura 14 muestra el porcentaje de adherencia a cada uno de los subgrupos de BPM. La menor adherencia se da en el subgrupo “control de procesos, procedimientos y registros”, con un promedio de cumplimiento del 47,6 %, mientras que el subgrupo “condiciones generales” mostró mejores características (promedio de 80,1 %). El subgrupo de “personal”, superó el 72,2 % en promedio, con un rango más amplio. Estas últimas consideraciones eran esperables, ya que la observancia de aspectos generales de instalaciones, equipos, e higiene personal eran las exigencias comunes en las inspecciones tradicionales. A partir del cambio de paradigma, hacia las auditorías, respaldadas por las normativas nacionales y provinciales que establecen la obligatoriedad de las BPM, estos resultados confirman que muchos establecimientos aún no han podido avanzar en estos aspectos. Este resultado podría obedecer a múltiples causas: falta de asistencia profesional, ausencia de compromiso o desconocimiento sobre BPM por parte de los responsables, entre otros problemas, que deberán abordarse en próximas investigaciones. Para clarificar esta problemática se analizó este subgrupo de “control de procesos, procedimientos y registros” frente al tipo de elaboración.

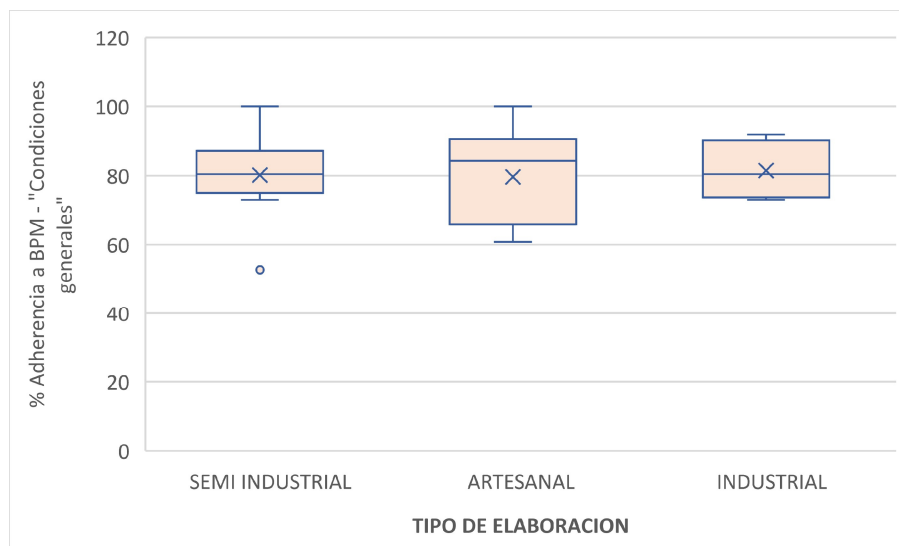


**Figura 15.** Porcentaje de adherencia a las buenas prácticas de manufactura (BPM) de los establecimientos – subgrupo “Control de procesos, procedimientos y registros” - según el tipo de elaboración (n=28).

En relación con el tipo de elaboración, la Figura 15 permite visualizar que a medida que avanza la industrialización, existe mayor adherencia al subgrupo “Control de procesos, procedimientos y registros”, lo cual quedo comprobado tras el análisis, ya que comparando los grupos “artesanal” vs “semi-industrial e industrial” y el “alto riesgo” (adherencia 0-39,9%) vs “mediano-bajo riesgo”



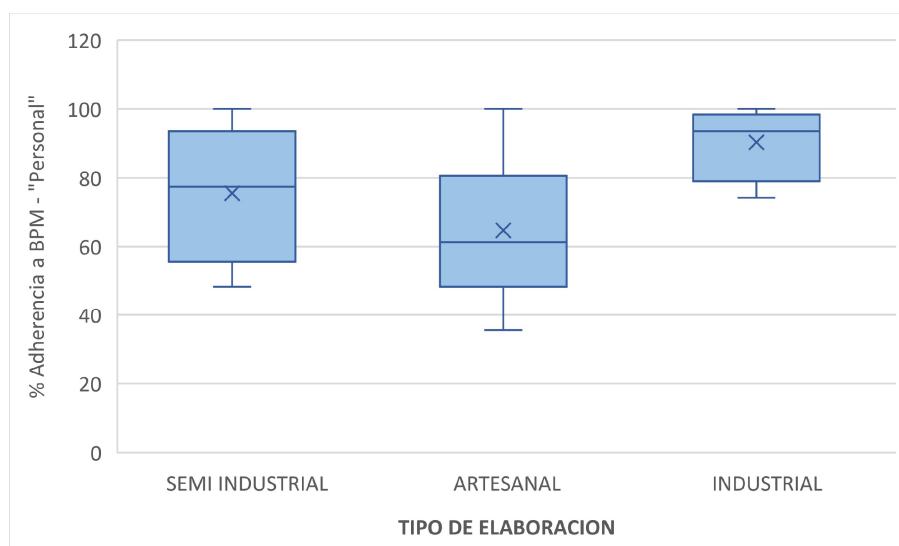
(adherencia 40-100%), en una tabla de contingencia, se encontró asociación estadísticamente significativa ( $p=0,007$ ).



**Figura 16.** Porcentaje de adherencia a las buenas prácticas de manufactura (BPM) de los establecimientos – subgrupo “Condiciones generales”- según el tipo de elaboración (n=28).

Con relación al tipo de elaboración, la Figura 16 muestra el porcentaje de adherencia para los aspectos relacionados únicamente al subgrupo “Condiciones generales”.

Comparando los grupos “artesanal” vs “semi industrial e industrial” y el “alto riesgo” (adherencia 0-39,9%) vs “mediano y bajo riesgo” (adherencia 40-100%), no se halló asociación estadísticamente significativa ( $p=1$ ).

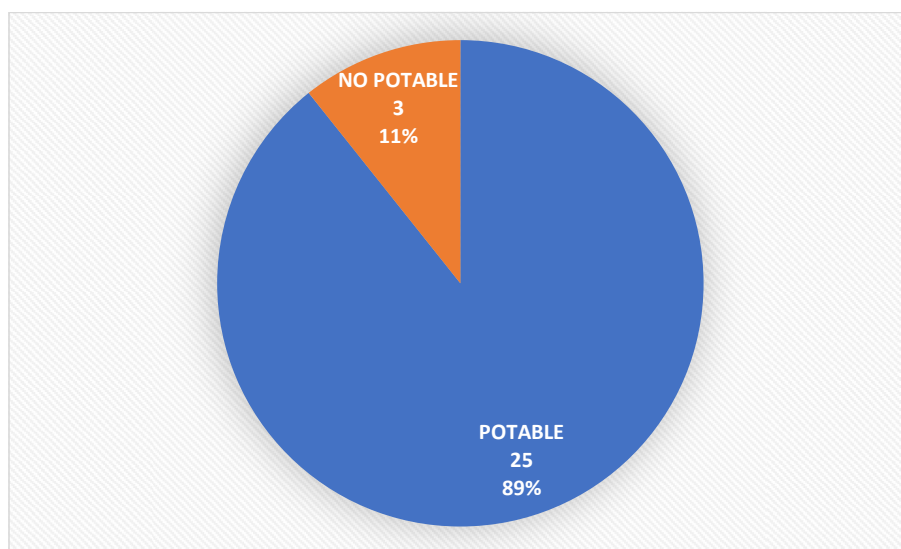


**Figura 17.** Porcentaje de adherencia a las buenas prácticas de manufactura (BPM) de los establecimientos - subgrupo “Personal”- según el tipo de elaboración (n=28).

La Figura 17 muestra el porcentaje de adherencia para los aspectos relacionados únicamente al subgrupo “personal”, en relación con el tipo de establecimiento. Al igual que en el caso anterior, al comparar los grupos “artesanal” vs. “semi industrial e industrial” y el alto riesgo (adherencia 0-39,9%) vs “mediano-bajo riesgo” (adherencia 40-100%), no se encontró asociación estadísticamente significativa ( $p=1$ ).

Para intentar comprender estos resultados, podemos mencionar que todos los establecimientos “industriales” en nuestra provincia cuentan con directores técnicos profesionales trabajando diariamente en la producción, que controlan los puntos críticos y buscan mantener todos los parámetros controlados dentro de los límites preestablecidos. Los establecimientos “semi industriales” se caracterizan por tener asistencia periódica, de profesionales o técnicos que supervisan los procesos de BPM. En cambio, los alimentos artesanales, debido a su producción en general, la mayoría de las veces no cuentan con los suficientes recursos para contar con técnicos o profesionales que le brinden la asistencia necesaria. Este podría ser uno de los motivos por los cuales se observa una marcada diferencia en la adherencia para los tres tipos de establecimientos en el subgrupo de “Control de procesos, procedimientos y registros”, y en los otros dos subgrupos de BPM (“Condiciones generales” y “Personal”) no sea significativa la diferencia.

Otro aspecto para tener en cuenta como variable necesaria para analizar los resultados microbiológicos de los productos es la calidad microbiológica del agua de los establecimientos



**Figura 18.** Potabilidad del agua disponible en los establecimientos elaboradores de chacinados de la provincia de Misiones (n=28).

En base al estudio de la calidad microbiológica del agua disponible, se encontró que el 89,3 % de los establecimientos contaba con agua potable. Véase la Figura 18. Se observó que la procedencia del agua fue: 19 (67,86 %) de red, 7 (25%) de perforación, 1 (3,57%) de pozo sin tratamiento de cloración, y 1 (3,57%) de pozo con tratamiento de cloración. Esto tiene consonancia con la distribución geográfica de los establecimientos (urbanos/ periurbanos) y el panorama provincial en cuanto a fuentes de este recurso en las diferentes zonas de nuestra provincia. Las tres muestras no potables correspondieron a procedencia de red, perforación y de pozo, todas sin tratamiento de cloración. No se encontró relación estadística significativa al analizar agua de red vs otras (perforación + pozo), frente a potable vs no potable ( $p=0,188$ ).

De los establecimientos con agua no potable, uno correspondió con “alto riesgo” y los dos restantes con “mediano riesgo” de acuerdo con nuestra categorización a partir del uso de la herramienta, es decir que ninguno poseía adherencia a las BPM mayor al 70%.

Al analizar la calidad microbiológica (aceptabilidad) de los productos elaborados frente a potabilidad de agua, se determinó que existe relación estadística significativa ( $p=0,0172$ ), constituyéndose el agua potable en un factor indispensable para garantizar la inocuidad de los alimentos elaborados. Estos resultados concuerdan con otros autores que plantean que el agua utilizada en las industrias puede ser una vía de transmisión de microorganismos que deterioren los alimentos o transmitan enfermedades (60).

## 5. CONCLUSIONES

- ✓ En Misiones, la producción de chacinados es heterogénea y se distribuye entre los establecimientos de tipo artesanal y las industrias.
- ✓ La calidad microbiológica de estos alimentos es predominantemente aceptable, y se asocia estadísticamente con el menor riesgo de los establecimientos elaboradores, lo que demuestra que la aplicación de las BPM es el único camino para asegurar la producción de alimentos inocuos.
- ✓ El mayor nivel de industrialización se corresponde con menor riesgo del establecimiento y mejores indicadores de calidad en los productos elaborados, siendo los chacinados cocidos artesanales los productos de menor calidad microbiológica, con recuentos elevados de mohos-levaduras y de bacterias aerobias mesófilas como principales parámetros no conformes, reflejando defectos en las BPM, como cocción insuficiente y/o contaminación post cocción.
- ✓ La calidad microbiológica del agua disponible en el establecimiento está relacionada con la calidad de los productos elaborados y se reafirma como un requisito indispensable y no negociable dentro de las condiciones de los establecimientos.
- ✓ La falta de control de procesos, procedimientos y registros respecto a BPM, especialmente en los establecimientos de elaboración artesanal, se asoció a los déficits de calidad sanitaria de los productos, debiéndose trabajar a futuro en la revisión de los planes y en su implementación en todos los niveles, para garantizar chacinados seguros para los consumidores.
- ✓ Los resultados microbiológicos son una evidencia epidemiológica que servirá para el estudio de las ETA y para planificar la vigilancia sanitaria de estos alimentos en la región.
- ✓ La herramienta de auditoría de BPM como predictor de riesgo facilitará la planificación y gestión, y a partir del análisis de sus resultados, facilitará los abordajes preventivos a nivel provincial, desde el acompañamiento y asesoramiento al elaborador hasta la vigilancia de establecimientos en los niveles locales, con la finalidad de obtener productos seguros, protegiendo al consumidor de las ETA.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. OMS. Estimaciones de la OMS sobre la carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria [Internet]. 2015 [citado 23 de Octubre de 2018]. Disponible en: [http://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/foodborne-diseases/ferg/en/](http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferg/en/)
2. OMS. Día Mundial de la Salud 2015: Inocuidad de los alimentos. WHO [Internet]. 2015 [citado 24 Octubre de 2018]; Disponible en: <http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2015/event/es/>
3. Pascual Anderson M del R. Enfermedades de origen alimentario. Su prevención. Madrid: Diaz de Santos S.A.; 2005. 208 p.
4. Iglesias D, Ghezan G. Análisis de la cadena de la carne porcina en Argentina [Internet]. 2013 [citado 24 Octubre de 2018]. Disponible en: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-\\_cadena\\_de\\_carne\\_porcina\\_n12.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-_cadena_de_carne_porcina_n12.pdf)
5. IPEC. Gran Atlas de Misiones [Internet]. 1st ed. Instituto Provincial de Estadísticas y Censos; 2015. 430 p. [citado 24 de Octubre de 2018]. Disponible en: <https://ipecmisiones.org/>
6. Moraes Raszl S, Bejarano Ore ND, Cuellar JA, Almeida CR. HACCP, Herramienta esencial para la inocuidad de los alimentos [Internet]. 1st ed. OPS/ INPAZZ, editor. Buenos Aires: Instituto Panamericano de Protección de Alimentos (INPAZZ); 2001 [citado 24 Octubre de 2018]. 352 p. Disponible en: [https://www.paho.org/arg/index.php?option=com\\_docman&view=document&layout=default&alias=258-haccp-herramienta-esencial-para-la-inocuidad-de-los-alimentos&category\\_slug=publicaciones-virtuales&Itemid=624](https://www.paho.org/arg/index.php?option=com_docman&view=document&layout=default&alias=258-haccp-herramienta-esencial-para-la-inocuidad-de-los-alimentos&category_slug=publicaciones-virtuales&Itemid=624)
7. Conferencia Internacional sobre Atención Primaria de Salud. Declaración de Alma Ata [Internet]. 1978 [citado 29 Octubre de 2018]. Disponible en: [http://www.paho.org/spanish/dd/pin/alma-ata\\_declaracion.htm](http://www.paho.org/spanish/dd/pin/alma-ata_declaracion.htm)
8. Artaza Barrios O. Funciones esenciales de salud pública : su implementación en Argentina y desafíos hacia salud universal : experiencia federal [Internet]. 1st ed. Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud; 2017 [citado 26 Octubre de 2018]. 196 p. Disponible en: [http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34026/9789507101274\\_spa.pdf?se](http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34026/9789507101274_spa.pdf?se)
9. FAO. Declaración de Roma sobre la seguridad alimentaria mundial. Cumbre mundial sobre la alimentación [Internet]. FAO. 1996 [citado 27 Octubre de 2018]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/003/W3613S/W3613S00.HTM>
10. Código Alimentario Argentino. Capítulo II - Condiciones generales de las fábricas y comercios

- de alimentos [Internet]. [citado 24 Octubre de 2018]. p. 64. Disponible en:  
[http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO\\_II.pdf](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_II.pdf)
11. FAO. Inocuidad y calidad de los alimentos: Inspección y monitoreo [Internet]. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2018 [citado 27 Octubre de 2018]. Disponible en: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/capacity-development/inspection/es/>
  12. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Reglamento decreto 4238/68 - Capítulo XVI - Chacinados [Internet]. Buenos Aires: SENASA; 2015 [citado 29 Octubre de 2018]. p. 21. Disponible en:  
[http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL\\_SENASA/INFORMACION/NORMATIVA/4238/capitulo\\_xvi.pdf](http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/INFORMACION/NORMATIVA/4238/capitulo_xvi.pdf)
  13. ANMAT. Disposición N°3714/13 [Internet]. Buenos Aires: Ministerio de Salud Secretaria de Políticas Regulación e Institutos. ANMAT; 2013 [citado 22 Octubre de 2018]. p. 7. Disponible en: [http://www.anmat.gov.ar/boletin\\_anmat/BO/Disposicion\\_3714-2013.pdf](http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/BO/Disposicion_3714-2013.pdf)
  14. Campos Pinilla C. Indicadores de contaminación fecal en aguas. En: Agua Potable para comunidades rurales, reúso y tratamientos avanzados de aguas residuales domésticas [Internet]. 1st ed. Mexico DF: Red Iberoamericana de Potabilización y Depuración del Agua (RIPDA-CYTED) y Centro Interamericano de Recursos del Agua, Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de México (CIRA-UAEM).; 2003 [citado 24 Octubre de 2018]. p. 224–9. Disponible en:  
[http://tierra.rediris.es/hidrored/ebooks/ripda/pdfs/Capitulo\\_20.pdf](http://tierra.rediris.es/hidrored/ebooks/ripda/pdfs/Capitulo_20.pdf)
  15. Red Nacional de Laboratorios oficiales de análisis de alimentos. Análisis microbiológico de los alimentos . Metodología analítica oficial. Microorganismos indicadores . Volumen 3 [Internet]. Buenos Aires; 2014 [citado 24 Octubre de 2018]. Disponible en:  
[http://www.anmat.gov.ar/renaloea/docs/Analisis\\_microbiologico\\_de\\_los\\_alimentos\\_Vol\\_III.pdf](http://www.anmat.gov.ar/renaloea/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_III.pdf)
  16. Ministerio de Salud y Desarrollo Social. Boletín Integrado de Vigilancia | N° 426-SE 42 [Internet]. Vol. 426. Buenos Aires; 2018 [citado 4 Noviembre de 2018]. Disponible en:  
[https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/biv\\_426\\_se42\\_vf.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/biv_426_se42_vf.pdf)
  17. Rica C, Salvador E, Nicaragua H, Kopper Gloria Calderón Sheryl Schneider Wilfredo Domínguez Guillermo Gutiérrez G. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Estudios de caso en Informe técnico sobre ingeniería agrícola y alimentaria por [Internet]. Rosell C, Mejía D, editors. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la

- agricultura y la alimentación (FAO); 2009 [citado 24 Octubre de 2018]. 194 p. Disponible en:  
<http://www.fao.org/3/a-i0480s.pdf>
18. Instituto Nacional de Salud -Ministerio de Salud y Protección Social. Evaluación de riesgos de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico en alimentos preparados no industriales en Colombia República de Colombia [Internet]. 1st ed. Bogotá D.C.: Imprenta Nacional de Colombia; 2011 [citado 24 Octubre de 2018]. 74 p. Disponible en:  
<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Er-staphylococcus.pdf>
19. Fairbrother J., Nadeau E. *Escherichia coli* : la contamination des animaux à la ferme. Rev sci tech Off int Epiz [Internet]. 2006 [citado 4 Noviembre de 2018];25(2). Disponible en:  
[http://web.oie.int/boutique/index.php?page=ficprod&id\\_prec=97&id\\_produit=249&lang=fr&fichech=1](http://web.oie.int/boutique/index.php?page=ficprod&id_prec=97&id_produit=249&lang=fr&fichech=1)
20. Frazier WC, Westhoff DC. Microbiología de los Alimentos 4° Ed. 4°. Zaragoza: Acribia S.A.; 1993.
21. Medin S, Medin R. Alimentos. Introducción, Técnica y Seguridad. 3°. Buenos Aires: Ediciones Turisticas; 2007. 208 p.
22. Código Alimentario Argentino. Capítulo III : De los productos alimenticios [Internet]. Buenos Aires; 2017 [citado 28 Octubre de 2018]. p. 36. Disponible en:  
[http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo\\_III.pdf](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_III.pdf)
23. INAL - ANMAT. Guía de Interpretación de Resultados Microbiológicos de Alimentos [Internet]. Buenos Aires; 2009 [citado 25 Septiembre de 2018]. Disponible en:  
[http://www.anmat.gov.ar/Alimentos/Guia\\_de\\_interpretacion\\_resultados\\_microbiologicos.pdf](http://www.anmat.gov.ar/Alimentos/Guia_de_interpretacion_resultados_microbiologicos.pdf)
24. Martínez E V, Varela MC, Cevallos C, Hernández-Pezzi G, Torres A, Ordóñez P. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. España, 2004-2007 (excluye brotes hídricos) [Internet]. 2008 [citado 24 Octubre de 2018]. Disponible en:  
[http://revista.isciii.es/public/journals/1/pdf\\_114.pdf](http://revista.isciii.es/public/journals/1/pdf_114.pdf)
25. Barreto Argilagos, Guillermo Sedrés Cabrera M, Rodríguez Torrens H, Guevara Viera G. Agentes bacterianos asociados a brotes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) aislados de coprocultivos. REDVET Rev electrónica Vet [Internet]. 2010 [citado 4 Noviembre de 2018];11(3). Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/636/63613123011/>
26. Plym Forshell L, Wierup M. Infection à Salmonella : une grave menace pour le commerce mondial des produits alimentaires d'origine animale. Rev sci tech Off int Epiz [Internet]. 2006

- [citado 4 Noviembre de 2018];25(2):541–54. Disponible en:  
[http://web.oie.int/boutique/index.php?page=ficprod&id\\_prec=97&id\\_produit=248&lang=fr&fichier=1](http://web.oie.int/boutique/index.php?page=ficprod&id_prec=97&id_produit=248&lang=fr&fichier=1)
27. Di Prieto S, Haritchabalet K, Cantoni G, Iglesias L, Mancini S, Temperoni A, et al. Vigilancia epidemiológica de enfermedades transmitidas por alimentos en la provincia de Río Negro, Argentina, 1993-2001. *Med (Buenos Aires)* [Internet]. 2004 [citado 24 Octubre de 2018];64(2):120–4. Disponible en: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0025-76802004000200005&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0025-76802004000200005&script=sci_arttext&tlng=pt)
28. López Aday D, Rivero Alvarez E, Martínez Torres A, Alegret Rodríguez M. Enfermedades transmitidas por alimentos en Villa Clara. *Rev Cubana Hig Epidemiol* [Internet]. 2013 [citado 24 Octubre de 2018];51(2):203–13. Disponible en:  
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223229324009>
29. Alerte V, Cortés A S, Díaz T J, Vollaire Z J, Espinoza M ME, Solari G V, et al. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos y agua en la Región Metropolitana, Chile (2005-2010). *Rev Chil infectología* [Internet]. 2012 Feb [citado 24 Octubre de 2018];29(1):26–31. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182012000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182012000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
30. Jemmi T, Stephan R. *Listeria monocytogenes* – agent de toxi-infection alimentaire et indicateur d'hygiène. *Rev sci tech Off int Epiz* [Internet]. 2006 [citado 4 Noviembre de 2018];25(2):571–80. Disponible en:  
[http://web.oie.int/boutique/index.php?page=ficprod&id\\_prec=97&id\\_produit=250&lang=fr&fichier=1](http://web.oie.int/boutique/index.php?page=ficprod&id_prec=97&id_produit=250&lang=fr&fichier=1)
31. Rodrigues CS, Sá CVGC de, Melo CB de, Rodrigues CS, Sá CVGC de, Melo CB de. An overview of *Listeria monocytogenes* contamination in ready to eat meat, dairy and fishery foods. *Ciência Rural* [Internet]. 2017 [citado 30 Octubre de 2018];47(2). Disponible en:  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782017000200452&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782017000200452&lng=en&tlng=en)
32. Molina-Moreno SN, Mercado-Reyes M, Carrascal-Camacho AK. Efecto de tiempo y temperatura de cocción en chorizo inoculados artificialmente con *Listeria monocytogenes*. *Univ Sci* [Internet]. 2009 [citado 30 Octubre de 2018];14(3):198–205. Disponible en:  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0122-74832009000300003&lang=pt](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-74832009000300003&lang=pt)



33. Martino Zagovalov TK, Leyva Castillo V, Pérez Chang A, de los Reyes M, Suárez Herrera F, Lara Ortiz C. Determinación de *Listeria* spp. en quesos y embutidos comercializados en Cuba. Rev Cuba Salud Pública [Internet]. 1988 [citado 30 Octubre de 2018];31(3):0–0. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-34662005000300007&lang=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662005000300007&lang=pt)
34. Dirección General de Higiene y Seguridad Alimentaria. Enfermedades Transmitidas por Alimentos 2000-2010. Buenos Aires; 2012.
35. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina. Confirman primer caso de Trichinellosis en cerdos en Corrientes. El Universitario Revista Digital de la Universidad Nacional del Nordeste [Internet]. 2011 [citado 29 Octubre de 2018]; Disponible en: <http://eluniversitario.unne.edu.ar/ciencia11.html>
36. Diario Epoca – Goya: detectan el primer caso de triquinosis en humanos [Internet]. Diario Epoca. 2011 [cited 2018 Oct 29]. Disponible en: <http://diarioepoca.com/262158/Goya-detectan-el-primer-caso-de-triquinosis-en-humanos/>
37. Roberts D, Hooper W, Greenwood M. Microbiología Práctica de los Alimentos. 2°. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.; 1995. 276 p.
38. Rípodas Navarro A, Fernández Moreira D, Macho Martínez M, Rípodas Navarro A, Fernández Moreira D, Macho Martínez M. Investigación de *Escherichia coli* productor de toxinas Shiga (STEC) en carnes y derivados cárnicos. Sanid Mil [Internet]. 2017 [citado 4 Noviembre de 2018];73(3):147–52. Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1887-85712017000300147&lang=pt](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1887-85712017000300147&lang=pt)
39. Gottardo E, Viana C, Barcellos V, Zanette C, Bersot L. Embutidos cárneos fermentados artesanais como veículos de micro-organismos patogênicos de importância para saúde pública. Bol do Cent Pesqui Process Aliment [Internet]. 2011 Aug 26 [citado 24 Octubre de 2018];29(1). Disponible en: <http://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/22761>
40. Resolución GMC N° 080/96 en Capítulo II. Código Alimentario Argentino. Ley 18284 [Internet]. 1997 [citado 24 Octubre de 2018]. p. 14–25. Disponible en: [http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO\\_II.pdf](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_II.pdf)
41. Fardiaz D. Guidelines for risk categorization of food and food establishments applicable to ASEAN countries [Internet]. Bangkok: FAO; 2011 [citado 3 Noviembre de 2018]. 50 p. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/015/i2448e/i2448e00.pdf>
42. FAO Y OMS. Sistemas de inspección y certificación de importaciones y exportaciones de alimentos [Internet]. 5th ed. Roma; 2012 [citado 24 de Octubre de 2018]. 125 p. Disponible en:

- [http://www.fao.org/tempref/codex/Publications/Booklets/Inspection/CCFICS\\_2012\\_ES.pdf](http://www.fao.org/tempref/codex/Publications/Booklets/Inspection/CCFICS_2012_ES.pdf)
43. Gould LH, Walsh KA, Vieira AR, Herman K, Williams IT, Hall AJ, et al. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks — United States, 1998–2008 [Internet]. 2013 [citado 24 Octubre de 2018]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss6202a1.htm>
  44. FAO. Manual de inspección de los alimentos basada en el riesgo [Internet]. Roma: Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación; 2008 [citado 27 Octubre de 2018]. 100 p. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i0096s.pdf>
  45. FDA. Conducting Risk-based Inspections [Internet]. 2013 [citado 3 Noviembre de 2018]. Disponible en:  
<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/RetailFoodProtection/ProgramStandards/default.h>
  46. Ripoll A, Da Costa Junior GA, Avdalov N. Manual de Auditoría del Sistema HACCP en la Industria Pesquera [Internet]. Montevideo; 2000 [citado 2 Noviembre de 2018]. Disponible en: [www.infopesca.org](http://www.infopesca.org)
  47. Plan para la supervisión de los sistemas de autocontrol en las empresas alimentarias de Andalucía [Internet]. Sevilla; 2012 [citado 27 Octubre de 2018]. Disponible en: [https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/salud\\_5aeb2cc701e9c\\_plan\\_supervision\\_2012.pdf](https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/salud_5aeb2cc701e9c_plan_supervision_2012.pdf)
  48. Garcia W, Palopoli H, Pilatti H. Guia de análisis de peligros y estimacion del riesgo para la habilitación, categorizacion y seguimiento sanitario de los alimentos. 1st ed. Lanus: Ediciones UNLa; 2015. 180 p.
  49. ANMAT - Ministerio de Salud. Plan integral de fiscalización de establecimientos, productos alimenticios y materiales en contacto con alimentos [Internet]. Buenos Aires; 2018 [citado 2 Noviembre de 2018]. Disponible en:  
[http://www.anmat.gov.ar/pif/Plan\\_Integral\\_de\\_Fiscalizacion.pdf](http://www.anmat.gov.ar/pif/Plan_Integral_de_Fiscalizacion.pdf)
  50. ANMAT. Auditoria de buenas prácticas de manufactura a establecimientos de alimentos elaborados industrializados [Internet]. Buenos Aires: ANMAT; 2018 [citado 2 Noviembre 2018]. p. 6. Disponible en: [http://www.anmat.gov.ar/pif/Auditoria\\_BPM\\_03.pdf](http://www.anmat.gov.ar/pif/Auditoria_BPM_03.pdf)
  51. ANMAT. Directrices para la realizacion de auditorías de buenas prácticas de manufactura de establecimientos de alimentos elaborados / industrializados [Internet]. Buenos Aires; 2016 [citado 2 Noviembre 2018]. Disponible en:  
[http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas\\_alimentos\\_caa.asp](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp)
  52. ANMAT. Lista de verificacion de BPM para Establecimientos de alimentos elaborados /

- Industrializados [Internet]. Buenos Aires: ANMAT; 2016 [citado 2 Noviembre 2018]. p. 6.  
Available from: [http://opinion\\_publica.anmat.gov.ar/proyectos/183.pdf](http://opinion_publica.anmat.gov.ar/proyectos/183.pdf)
53. APHA, AWWA, WPCF. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. 17th ed. Madrid: Ed. Diaz de Santos S.A.; 1992. 1829 p.
54. Código Alimentario Argentino Ley 18284. CAPÍTULO VI ALIMENTOS CÁRNEOS Y AFINES [Internet]. [citado 24 Octubre 2018]. Disponible en:  
[http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo\\_VI.pdf](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_VI.pdf)
55. FAO Y OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD Higiene de los alimentos Textos básicos Cuarta edición [Internet]. 2009 [citado 7 Octubre 2018]. Disponible en:  
<http://www.fao.org/docrep/012/a1552s/A1552S00.pdf>
56. Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) - Instituto Nacional de Alimentos (INAL). Guía de Interpretación de Resultados Microbiológicos de Alimentos [Internet]. Buenos Aires; 2008 [citado 24 Octubre 2018]. p. 21. Disponible en:  
[http://www.anmat.gov.ar/alimentos/Guia\\_de\\_interpretacion\\_resultados\\_microbiologicos.pdf](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/Guia_de_interpretacion_resultados_microbiologicos.pdf)
57. United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (USDA). Los Embutidos y la Inocuidad de los Alimentos [Internet]. USDA. 2018 [citado Noviembre 4 2018]. Disponible en: <https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/informational/en-espanol/hojasinformativas/preparacion-de-las-carne/los-embutidos/lost-embutidos>
58. Safe Practices for Sausage Production The U.S. Department of Agriculture (USDA), Food Safety and Inspection Service (FSIS), and The Association of Food and Drug Officials (AFDO) In cooperation with the U.S. Food and Drug Administration (FDA) [Internet]. [citado 26 Octubre 2018]. Disponible en: [http://www.afdo.org/resources/Documents/Committee\\_Reports\\_2016-2017/Safe-Practices-Sausage-Production\\_04-14.pdf](http://www.afdo.org/resources/Documents/Committee_Reports_2016-2017/Safe-Practices-Sausage-Production_04-14.pdf)
59. Gesche E, Vallejos A, Saez M. Eficiencia de Anaerobios sulfito-reductores como indicadores de calidad sanitaria de agua. Método de Número Más Probable (NMP). Arch Med Vet [Internet]. 2003 Jan [citado 6 Noviembre 2018];35(1):99–107. Disponible en:  
[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-732X2003000100011&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2003000100011&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
60. Silva E, Ortiz JE, Murillo C, Nava G, Cárdenas O, Peralta A, et al. Estudio de caracterización de la calidad microbiológica y fisicoquímica del agua utilizada en la industria de alimentos, Colombia, 2007. Biomédica [Internet]. 2010 [citado 4 Noviembre 2018];30(3). Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/843/84316250015/>

## CAPITULO IV

### PROPUESTAS DE TRABAJOS FUTUROS Y/O RECOMENDACIONES.

El principal objetivo pendiente en el marco de la vigilancia sanitaria de estos productos alimenticios es la investigación *E. coli O 157:H7* y no *O157:H7*, por su implicancia en el síndrome urémico hemolítico (SUH), problema grave para la salud pública, que no se pudo incluir en el presente estudio debido a la limitación de la metodología analítica en el laboratorio participante, pero que debe ser un asunto prioritario para abordar.

Aunque no estuvo plasmado en esta investigación, se han realizado actividades complementarias, de asesoramiento profesional en BPM a todos los productores de chacinados involucrados en el estudio, con la finalidad de poder dar solución a las no conformidades, con trabajo sostenido y seguimiento. Se han realizado nuevas auditorías procurando la regularización, con toma de muestra de productos hasta verificación de aceptabilidad de los parámetros microbiológicos estudiados. Estos resultados también se podrían volcar en un nuevo estudio de intervención, comparando datos tanto de BPM como de Microbiología de los alimentos (antes – después) para determinar la efectividad de la intervención en asesoramiento profesional en BPM a elaboradores. Este modelo de auditorías de BPM ya se ha replicado en otras matrices alimentarias, afianzándose como un sistema propicio para el control de los establecimientos que elaboran, fraccionan, almacenan o expenden alimentos o primeras materias correspondientes a los mismos. Podría continuarse con la evaluación de la herramienta en otros tipos de productos (ej; bajo riesgo) y otros tipos de establecimientos.

Las actividades de terreno realizadas durante esta investigación en diferentes puntos de la provincia han promovido la gestión intersectorial con los municipios. Se espera que este modelo de inspección, a partir de las auditorías de BPM y categorización del riesgo de los establecimientos elaboradores, sea incorporado a la labor cotidiana, favoreciendo el desarrollo de las bromatologías locales y la consolidación de las políticas públicas en materia de seguridad alimentaria.

Aunque, según datos no publicados del Ministerio de Salud Pública, no se han detectado casos de triquinosis en cerdos de la provincia de Misiones, es pertinente la búsqueda de *Trichinella spiralis*, en chacinados, justificado en los brotes de la vecina provincia de Corrientes, y en la posibilidad de ingreso de carnes porcinas provenientes de los países limítrofes, con la potencialidad de uso de estas materias primas no controladas en la fabricación de derivados cárnicos.

# ANEXOS

## ANEXO 1: ACTA DE AUDITORIA



Acta N° B 000001

Fecha: ...../...../.....

### ACTA DE AUDITORÍA

Expediente N°: .....

Establecimiento: .....

Domicilio real: ..... Localidad: ..... Tel: .....

Propiedad de: ..... Correo electrónico: .....

Rubro/s: .....

Siendo las ..... horas, constituido en el citado establecimiento, y siendo atendido por .....

..... D.N.I. N°: .....

quien dice ser ..... de la Empresa, declara que la misma trabaja con los siguientes alimentos: .....

.....  
 .....  
 .....

1. DOCUMENTACION	SI	NO	N°	Fecha Alta	Observaciones
Habilitación Municipal					
R.N.E.					

### 2. SUMINISTRO DE AGUA

Procedencia: Red Pública  Perforación  Pozo  Otro  ..... Tanque / cisterna SI  NO

	SI	NO	Frecuencia	Observaciones
Tratamientos adicionales				
Limpieza y desinfección de Tanque/ cisterna				
Registros de análisis microbiológicos				
Registros de análisis fisicoquímicos				

### 3. SECTOR RECEPCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MATERIAS PRIMAS, INSUMOS Y ENVASES

	A	NA	Puntaje	Observaciones
Paredes			0.5	
Pisos			0.5	
Desagües			0.5	
Techos			0.5	
Aberturas			0.5	
Protección contra ingreso de plagas			2	
Iluminación			0.5	
Ventilación			0.5	
Orden e higiene general			2	
Manual / Registros de Limpieza y desinfección			1	
Condiciones de almacenamiento (Temperatura, Humedad)			2	
Registros de recepción / prácticas de rotación			1	
Registros de temperaturas			1	
<b>Subtotal:</b>				

Mediciones *in situ*:

N° de cámaras/equipos:	A	NA	Temperatura medida °C en cámaras/equipos							Observaciones
			1	2	3	4	5	6	7	
Temperatura de Refrigeración										
Temperatura de Congelación										



MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA  
DIRECCIÓN DE SANEAMIENTO AMBIENTAL  
DIVISIÓN ALIMENTOS



**4. SECTOR ELABORACION**

	A	NA	Puntaje	Observaciones
Paredes			1	
Piso			1	
Desagües			0.5	
Techo			1	
Aberturas			1	
Protección contra ingreso de plagas			2	
Iluminación			0.5	
Ventilación			0.5	
Equipos y utensilios (higiene y funcionalidad)			2	
Lavatorio de manos (agua, jabón líquido, toallas de un solo uso, cesto)			1	
Suministro agua fría y caliente			0.5	
Orden e higiene general			2	
Ausencia de elementos extraños ajenos a la elaboración			0.5	
Elementos de limpieza identificados y guardados correctamente			1	
Flujo de elaboración que impida la contaminación cruzada			2	
Manual / Registros BPM			1	
Manual / Registros Limpieza y desinfección			1	
Registros de temperaturas			1	
<b>Subtotal:</b>				

**Mediciones in situ:**

N° de tratamientos térmicos:	A	NA	Temperatura medida en °C							Observaciones
			1	2	3	4	5	6	7	
Temperatura										

**5. SECTOR ALMACENAMIENTO DE PRODUCTOS TERMINADOS**

	A	NA	Puntaje	Observaciones					
Paredes			0.5						
Pisos			0.5						
Desagües			0.5						
Techos			0.5						
Aberturas			0.5						
Protección contra ingreso de plagas			2						
Iluminación			0.5						
Ventilación			0.5						
Orden e higiene general			2						
Manual BPM / Registros BPM			1						
Manual / Registros Limpieza y desinfección			1						
Condiciones de almacenamiento (temperatura, Humedad)			2						
Registros de temperaturas			1						
Registros de egresos / trazabilidad			1						
<b>Subtotal:</b>									
	A	NA	Temperatura medida en °C						Observaciones
<b>Mediciones in situ:</b>			1	2	3	4	5	6	
Temperatura de Refrigeración									
Temperatura de Congelación									

Acta N° B 000001

6. MANEJO DE RESIDUOS	A	NA	Puntaje	Observaciones
Recipientes			1	
Ubicación			1	
Disposición final			0.5	
Manual / Registros Limpieza y desinfección			1	
<b>Subtotal:</b>				

7. SECTOR SANITARIOS	A	NA	Puntaje	Observaciones
Paredes			0.5	
Piso			0.5	
Desagües			0.5	
Techo			0.5	
Lavatorio de manos (agua, jabón líquido, toallas de un solo uso, cesto)			2	
Orden e higiene general			2	
Elementos de higiene en sanitarios (papel higiénico, cesto)			2	
Manual / Registros Limpieza y desinfección			1	
<b>Subtotal:</b>				

8. SECTOR VESTUARIOS	SI	NO	Puntaje	Observaciones
Dispone de vestuarios separados de los sanitarios?			1	
Ropa de uso exclusivo dentro del establecimiento?			2	
<b>Subtotal:</b>				

9. PERSONAL MANIPULADOR DE ALIMENTOS	A	NA	Puntaje	Observaciones
Cantidad N° <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>				
Vestimenta (pertinente a las operaciones que realiza)			2	
Estado de salud e higiene personal			2	
Lavado de manos (verificar in situ)			0.5	
Curso de manipulador de alimentos			2	N°:
Libreta sanitaria vigente			1	N°:
<b>Subtotal:</b>				

10. MANEJO DE PLAGAS	A	NA	Puntaje	Observaciones
Signos de presencia de plagas			2	
Manual / Registros de Manejo Integrado de Plagas			1	
Registro de Fumigación/ desratización.			0.5	
<b>Subtotal:</b>				

11. CONTROL DE CALIDAD	SI	NO	Puntaje	Observaciones
¿Existen controles de calidad de materia prima?			0.5	
¿Existen controles de calidad sobre el producto terminado?			1	
¿Existen registros de los controles de calidad?			0.5	
<b>Subtotal:</b>				

Puntaje total aplicable: \_\_\_\_\_ Puntaje total del Establecimiento: \_\_\_\_\_ Cumplimiento del Establecimiento: \_\_\_\_\_ %

CATEGORIZACIÓN DEL ESTABLECIMIENTO (según Auditoría)		
<input type="checkbox"/> Alto Riesgo (< 40%)	<input type="checkbox"/> Mediano Riesgo (40-70%)	<input type="checkbox"/> Bajo Riesgo (>70%)

**CONCLUSIONES**

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Para constancia y de conformidad con el procedimiento seguido, las personas intervinientes en el mismo firman al pie de la presente acta, que consta de cuatro fojas, previa lectura de la misma, en original y una copia de igual tenor y a un solo efecto, quedando una en poder de la Empresa.

**Responsable de la Empresa**

**Auditor del Ministerio de Salud Pública**

.....  
Firma

.....  
Firma

.....  
Aclaración

.....  
Aclaración

Ante cualquier consulta, reclamo o trámite dirigirse a:

**Dirección de Saneamiento Ambiental - Ministerio de Salud Pública de Misiones**

Av. Lavalle Nº 5377. Posadas. Misiones ☎ (0376) 4451446 / 4458265 ✉ [mspdivalimentos@gmail.com](mailto:mspdivalimentos@gmail.com)

Ley Nacional Nº 18.284	Decreto Nacional Nº 2.126 /71	Ley Provincial XVII Nº 58	Ley Provincial XVII Nº 71
------------------------	-------------------------------	---------------------------	---------------------------



## ANEXO 2: DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA



"2016- Año del Bicentenario de la Declaración de la Independencia Nacional"

HOSPITAL PÚBLICO PROVINCIAL DE PEDIATRÍA  
"DR. FERNANDO BARREYRO" DE AUTOGESTIÓN  
Avd. Mariano Moreno Nº 110 – Tel/Fax: 0376-447784/447778  
Posadas - Misiones  
[www.hospitaldepediatria.misiones.gov.ar](http://www.hospitaldepediatria.misiones.gov.ar)



Posadas, 23 de Noviembre de 2016

### DICTAMEN


#### AL INVESTIGADOR

Nos dirigimos a usted con el objeto de informarle que el Comité de Bioética ha evaluado el Proyecto de Investigación "CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE CHACINADOS Y SU RELACION CON LAS CONDICIONES HIGIENICAS SANITARIAS Y PRACTICAS DE ELABORACION EN ESTABLECIMIENTOS DE LA PROVINCIA DE MISIONES. PRUEBA PILOTO DE UNA HERRAMIENTA BASADA EN AUDITORIAS DE LAS BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA COMO PREDICTOR DE RIESGO" a ser llevado a cabo por Ud., en la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales - UNAM - Misiones y **NO** hemos encontrado objeciones desde el punto de vista Bioético.

Le recordamos que se debe considerar los Derechos y la Integridad de los seres humanos participantes en la investigación biomédica, ajustándose a la Declaración de Helsinki.

Con atenta consideración.

Bqco. PABLO CAPACCIO  
FCEQyN - UNAM  
**SU DESPACHO:**



Dr. Juan José Ledesma  
Presidente  
COMITÉ DE BIOÉTICA

### **ANEXO 3: Preparación de la muestra, suspensión inicial y diluciones. Según ISO 6887-1:1999.**

Para la realización de cada uno de los procedimientos microbiológicos se procede de la misma manera.

**Suspensión inicial:** En un frasco estéril o bolsa de plástico estéril pesar con una incertidumbre de medición de  $\pm 5\%$  una cantidad de masa  $x$  g (como mínimo 10 g). Agregar una cantidad del diluyente igual a  $9x$  g (dilución 1/10) y homogeneizar entre 3. La temperatura del diluyente debería ser aproximada a la temperatura ambiente, para evitar daños de los microorganismos por cambios bruscos.

El diluyente recomendado es el caldo agua peptona al 0.1%, excepto para muestras que requieran una preparación específica.

NOTA: En algunos casos, particularmente para los productos muy viscosos o muy espesos, podría ser necesario agregar mayor cantidad de diluyente lo cual debe tenerse en cuenta en las operaciones subsiguientes y / o en la expresión de resultados.

**Diluciones decimales:** Transferir con una pipeta 1 ml (con una incertidumbre de medición de  $\pm 5\%$ ) de la suspensión inicial en un tubo con 9 ml del diluyente estéril. Para una óptima precisión no introducir la pipeta más de 1 cm en la suspensión inicial y evitar el contacto entre la pipeta que contiene el inóculo y el diluyente estéril. Mezclar utilizando preferentemente un agitador mecánico durante 5 a 10 segundos para obtener la dilución  $10^{-2}$ . Si es necesario repetir esta operación a partir de la dilución  $10^{-2}$  y diluciones sucesivas, utilizando en cada operación una nueva pipeta estéril para obtener las siguientes diluciones ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , etc.). Se hacen las diluciones que sean necesarias para obtener un número apropiado de microorganismos para realizar el recuento (ver punto 3).

#### **Duración del procedimiento.**

El tiempo transcurrido entre el final de la preparación de la suspensión inicial y el instante en que el inóculo entra en contacto con el medio de cultivo no debe superar los 45 minutos, mientras que el lapso límite entre la preparación de la suspensión inicial y el comienzo de la preparación de las diluciones decimales sucesivas es de 30 minutos (considerar que si la temperatura ambiental del laboratorio es muy alta estos dos lapsos de tiempo deben ser reducidos).

## **ANEXO 4: Recuento de aerobios mesófilos (UFC/g) a 30°C. Según ISO 4833-2:2013.**

### **1. Preparación de la muestra, suspensión inicial y diluciones (ISO 6887-1:1999, ver Anexo 3).**

#### **2. Inoculación e incubación.**

2.1. Transferir por medio de una pipeta estéril 0.1 ml de la suspensión inicial en el caso de otros productos (dilución  $10^{-1}$ ), al centro de dos (2) placas de Petri estériles. Si se preparan placas de más diluciones, se puede reducir a una placa por dilución. Para los productos en los que se espera obtener recuentos bajos, el límite de detección puede aumentarse por un factor de 10, si se siembra 1.0 ml de la muestra, si la muestra es líquida, o 1.0 ml de la suspensión inicial para otros productos, en placas de mayor tamaño (140 mm) o en la superficie de 3 (tres) placas de Petri pequeñas (90 mm). En ambos casos se preparan por duplicado, utilizando 2 (dos) placas grandes o 6 (seis) pequeñas.

2.2. Tomar otra placa de Petri preparada con el medio de cultivo. Transferir utilizando otra pipeta estéril, 0.1 ml de la dilución  $10^{-1}$  (productos líquidos) o 0.1 ml de la dilución  $10^{-2}$  (otros productos).

2.3. Si es necesario, se repite el procedimiento con mayores diluciones, utilizando una pipeta estéril nueva para cada dilución decimal.

2.4. Cuidadosamente extender el inóculo en forma uniforme y lo más rápido posible, sobre la superficie del agar, sin tocar las paredes de la placa de Petri con el esparcidor o espátula. Se puede utilizar el mismo esparcidor/espátula para todas las diluciones de la misma muestra, comenzando con la mayor dilución y progresando en orden hacia la dilución con mayor cantidad de la muestra o menos diluida. Se colocan las tapas y se dejan las placas a temperatura ambiente por 15 min para que el inóculo sea absorbido por el agar.

2.5. Se invierten las placas preparadas y se incuban en la estufa a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $72 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ .  
Nota: No apilar más de seis (6) placas. Las placas deben estar separadas unas de otras y de las paredes y techo de la estufa por lo menos por una distancia de 25 mm.

#### **3. Recuento y selección de las colonias.**

3.1. Después de la incubación por el período especificado, seleccionar las placas que, de ser posible, tengan menos de 300 colonias. Contar las colonias. Examinar las placas bajo una luz tenue.

3.2. Es importante que las colonias diminutas sean incluidas en el recuento sin confundirlas con partículas insolubles o precipitado del alimento. Se examinan los objetos dudosos detenidamente, utilizando lupa si es necesario, para poder distinguir las colonias de otros materiales.

- 3.3. Las “colonias diseminadas” o dispuestas en rosario se consideran como una colonia.
- 3.4. Si se espera el crecimiento de colonias invasivas, se examinan las placas a las 24 h o 48 h y se marcan las colonias visibles.
- 3.5. Si menos un cuarto (1/4) de la placa está cubierto por crecimiento difuso o diseminado, se cuentan las colonias en la parte de la placa no afectada y se calcula el n° para la placa de Petri entera, deduciéndolo por extrapolación del n° teórico que debería corresponder a la placa entera. Si hay sobrecrecimiento en un área superior a un cuarto de la placa, se rechaza este recuento.

#### **4. Expresión de los resultados.**

- 4.1. De acuerdo a norma ISO 7218:2007. Ver Anexo 12.

### **ANEXO 5: Recuento de *Escherichia coli* NMP/g. Según ICMSF Método 1**

**1. Preparación de la muestra, suspensión inicial y diluciones** (ISO 6887-1:1999, ver Anexo 3)

**2. Inoculación y cultivo:** Se siembran 1 ml de cada dilución en una serie de tubos de caldo Lauril sulfato Triptosa doble concentración y dos series de tubos de caldo Lauril sulfato Triptosa simple concentración. Incubar 35-37 °C / 24-48h.

Cada tubo positivo de caldo LS (presencia de gas) repicar en un tubo de caldo EC Incubar 44 °C / 24-48h. Cada tubo de EC positivo repicar en agar EMB incubar a 37°C 24 h.

Observar desarrollo de colonias características (negras con brillo metálico) y realizar las pruebas bioquímicas para su identificación IMVIC.

### **ANEXO 6: Recuento de *Escherichia coli* NMP/g. Según ISO 16649-2:2001.**

**Método Horizontal para la Enumeración de *Escherichia coli* β-glucuronidasa positivo.**

**Recuento de colonias a 44 °C usando 5-bromo-4 cloro-3-indol β-D-glucuronido .**

**Principio:** El medio TBX contiene un agente cromogénico **X β-D-glucuronido**, que detecta la actividad de la enzima **β-glucuronidasa (GUD)**, presente en la mayoría (92 a 99 %) de las cepas de *Escherichia coli* (no detecta la *E. coli* 0157).

- ✓ Medio de cultivo: Agar TBX (Tryptona-Bilis-X- β-D-Glucuronido).
- ✓ Temperatura de Incubación: 44 ± 1°C.
- ✓ Tiempo de Incubación: 18-24 h. (Células estresadas: 4 h a 37°C).
- ✓ Colonias Típicas: azules.
- ✓ Placas seleccionadas para recuento: ≤ 150 colonias típicas y ≤ 300 colonias totales.

#### Ventajas:

- Medio autoclavable. Permite siembra en placa vertida y en superficie.
- Rápido. No debe realizarse confirmación bioquímica.

#### **1.Procedimiento.**

##### **Preparación de la muestra, suspensión inicial y diluciones (ISO 6887-1:1999, ver Anexo 3)**

**Medio de cultivo:** Chromobrit CC.

##### **Siembra.**

- Para propósitos generales: estriar directamente sobre la superficie del medio de cultivo.
- Para recuento bacteriano: *en superficie*: sembrar hasta 0,1 ml de la dilución apropiada y esparcirla en el medio de cultivo; *en profundidad*: inocular hasta 1 ml de la dilución. Verter un volumen del medio de cultivo fundido y enfriado a 40-45°C. Homogeneizar mediante movimientos de vaivén y rotación. Dejar solidificar.

**Incubación:** En aerobiosis, a 35-37 °C durante 18-48 horas.

##### **Interpretación de los resultados.**

Efectuar el recuento de colonias y tener en cuenta la alícuota de muestra sembrada para realizar el cálculo de UFC/ml.

La detección de la actividad enzimática bacteriana, junto con la morfología de la colonia, permite reconocer presuntivamente a:

***Escherichia coli*:** colonias azul-violáceas.

β-glucuronidasa: positivo.

β-galactosidasa: positivo.

#### **ANEXO 7: Recuento de Estafilococos coagulasa positiva (UFC/g). Según ISO 6888-1: 1999.**

##### **Preparación de la muestra, suspensión inicial y diluciones (ISO 6887-1:1999, ver anexo 3)**

##### **Inoculación e incubación.**

Transferir 0.1 ml de la suspensión inicial (dilución 1/10) y 0.1 ml de las diluciones sucesivas por duplicado a placas con agar Baird Parker.

Si para ciertos productos es necesario realizar un recuento de un n° bajo de estafilococos coagulasa positiva, el límite de detección puede ser elevado por un factor de 10 sembrando 1 ml de la suspensión inicial (dilución 1/10), y 1 ml de las diluciones sucesivas en una placa de Petri grande (140 mm) con agar Baird Parker o en tres placas de Petri de 90 mm con agar Baird Parker.

En ambos casos, sembrar por duplicado utilizando 2 placas grandes o 6 placas de 90 mm.

Cuidadosamente dispersar el inóculo sobre la superficie del agar con una espátula de Drigalsky lo más rápido posible, tratando de no tocar los bordes de la placa. Dejar secar las placas sin invertir, con la tapa puesta durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Invertir las placas sembradas e incubar a 35°C ó 37°C por 24 h ± 2 h y luego 24 h ± 2 h adicionales.

#### **Recuento y selección de las colonias.**

- a. Después de la incubación de 24 h ± 2 h marcar en el fondo de la placa la posición de cualquier colonia típica presente. (Ver NOTA 1).
- b. Incubar todas las placas a 35°C ó 37°C (la temperatura es acordada entre las partes interesadas y es indicada en el informe de resultados) durante 24 h ± 2 h adicionales y marcar todas las colonias típicas nuevas. También marcar las colonias atípicas presentes. (Ver NOTA 2). Tener en cuenta para el recuento sólo las placas que contienen como máximo 300 colonias totales con 150 colonias típicas y/o atípicas hasta dos diluciones sucesivas. Una de las placas debe contener al menos 15 colonias.
- c. Seleccionar para la confirmación un número *A* de colonias (en general 5 colonias típicas si sólo hay colonias típicas o 5 colonias atípicas si sólo hay colonias atípicas o 5 colonias típicas y 5 colonias atípicas si se encuentran presente ambos tipos en cada placa).
- d. Si en la placa hay menos de 15 colonias típicas y/o atípicas inocular con el producto líquido sin diluir o con la más baja dilución de los otros productos. Es posible realizar un recuento estimado como se describe en 5.2.

**NOTA 1:** Las colonias típicas son negras o grises, con brillo y convexas (de 1 mm a 1.5 mm de diámetro después de una incubación de 24 h y de 1.5 mm a 2.5 mm de diámetro después de una incubación de 48 h) y rodeadas por una zona de clarificación que puede ser parcialmente opaca. Después de una incubación de por lo menos 24 h puede aparecer un anillo opalescente de precipitación inmediatamente alrededor de la colonia.

Las colonias atípicas son del mismo tamaño que las típicas y pueden presentar una de las siguientes morfologías:

- Colonias negras con brillo, con o sin un fino borde blanco, la zona de clarificación está ausente o es vagamente visible y el anillo opalescente ausente o poco visible.
- Colonias grises sin zona de clarificación

**NOTA 2:** las colonias atípicas son formadas principalmente por cepas de estafilococos coagulasa positiva presentes por ejemplo en productos lácteos, camarones y menudencias.

Con menos frecuencia son formadas por cepas de estafilococos coagulasa positiva presentes en otros productos.

**NOTA 3:** algunas bacterias pertenecientes a otros géneros pueden dar colonias de apariencia similar a las de estafilococos, pero realizando una observación microscópica con coloración de Gram antes de la confirmación se puede realizar una separación de géneros.

**NOTA 4:** Las colonias restantes que pueden estar presentes en la placa y que no presentan apariencia de colonias típicas (NOTA 1) o atípicas (NOTA 2) son consideradas como flora acompañante.

3.5 Si se realizó un inóculo de 1 ml en tres placas (ver 2.2.) considerar esas placas como una en los subsiguientes procedimientos de recuento y confirmación.

3.6 Para realizar un recuento estimativo de un bajo número de estafilococos coagulasa positiva retener todas las placas que contienen colonias típicas y atípicas, seleccionar todas las colonias para la confirmación dentro de los límites establecidos arriba (ver 5.2.)

**Confirmación: prueba de la coagulasa.**

- a. De la superficie de cada colonia seleccionada remover un inóculo con ansa aguja y transferir a un tubo con caldo cerebro corazón infusión (BHI), incubar a 35°C ó 37°C durante 24 h ± 2 h.
- b. Asépticamente agregar 0.1 ml de cada cultivo en 0.3 ml de plasma de conejo (a menos que otra cantidad sea especificada por el fabricante) en un tubo de hemólisis estéril. Incubar a 35°C ó 37°C (la temperatura es acordada entre las partes interesadas y es indicada en el informe de resultados).
- c. Inclinando el tubo observar la formación de coágulo después de 4 h a 6 h de incubación. Si la prueba es negativa reexaminar después de 24 h de incubación o examinar en el tiempo de incubación especificado por el fabricante.
- d. Considerar un resultado positivo si el volumen del coágulo formado ocupa más de la mitad del volumen del líquido original.
- e. Como control negativo para cada lote de plasma agregar 0.1 ml de caldo BHI estéril a 0.3 ml de plasma de conejo e incubar sin inoculación. Para que la prueba sea válida el control negativo no debe mostrar signos de coagulación.

**Expresión de resultados.**

**5.1. Caso general.**

Cálculo del número *a* de estafilococos coagulasa positiva identificados por cada placa seleccionada:

Calcular para cada una de las placas seleccionadas el número  $a$  de estafilococos coagulasa positiva identificados de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$a = b_c / A_c \times C_c + b_{nc} / A_{nc} \times C_{nc}$$

**Donde:**

- $A_c$ : es el número de colonias típicas sometidas a la prueba de la coagulasa
- $A_{nc}$ : es el número de colonias atípicas sometidas a la prueba de la coagulasa
- $b_c$ : es el número de colonias típicas que dieron positiva la prueba de la coagulasa
- $b_{nc}$ : es el número de colonias atípicas que dieron positiva la prueba de la coagulasa
- $C_c$ : es el número de total de colonias típicas que se contaron en la placa
- $C_{nc}$ : es el número de total de colonias atípicas que se contaron en la placa

Redondear a un número entero.

### 5.1.2. Cálculo del número $N$ de estafilococos coagulasa positiva identificados presentes en la porción de muestra sembrada:

Para las placas que contienen un máximo de 300 colonias con 150 colonias típicas y/o atípicas en dos diluciones consecutivas calcular el número de estafilococos coagulasa positiva para cada placa como se especifica en 3.5.5.1.1 y calcular como un promedio de las dos diluciones sucesivas, el número  $N$  de estafilococos coagulasa positiva identificados, presentes en la porción de muestra sembrada, utilizando la siguiente ecuación:

$$NN = \sum a / (n_1 + 0.1n_2) \quad \text{Donde:}$$

- $\Sigma a$ : es el número de colonias de estafilococos coagulasa positiva identificadas en todas las placas seleccionadas
- $V$ : es el volumen de inóculo en cada placa en mililitros
- $n_1$ : es el número de placas seleccionadas de la primer dilución
- $n_2$ : es el número de placas seleccionadas de la segunda dilución
- $d$ : es el factor de dilución correspondiente a la primer dilución seleccionada (la suspensión inicial es una dilución)

Redondear el resultado calculado a 2 cifras significativas.

5.1.3. Informar el resultado como el número de estafilococos coagulasa positiva por mililitro (productos líquidos) o por gramo (otros productos), expresado como un número entre 1.0 y 9.9 inclusive multiplicado por  $10^x$  donde  $x$  es la potencia apropiada de 10.

Ejemplo:

El recuento después de la inoculación con 0.1 ml del producto dio los siguientes resultados:

- Para la primera dilución seleccionada ( $10^{-2}$ ): 65 colonias típicas y 85 colonias atípicas, no hay colonias atípicas; para la segunda dilución seleccionada ( $10^{-3}$ ): 3 colonias típicas y 7 colonias atípicas, no hay colonias atípicas. Se obtuvieron los siguientes datos:



- De las 65 colonias 5 colonias fueron sometidas a la prueba de la coagulasa y todas dieron un resultado positivo, obteniendo entonces un valor de  $a = 65$

De las 85 colonias 5 colonias fueron sometidas a la prueba de la coagulasa y 3 colonias dieron un resultado positivo, obteniendo entonces un valor de  $a = 51$

- De las 3 colonias todas fueron sometidas a la prueba de la coagulasa y 3 colonias dieron un resultado positivo, obteniendo entonces un valor de  $a = 3$

- De las 7 colonias 5 colonias fueron sometidas a la prueba de la coagulasa y todas dieron un resultado positivo, obteniendo entonces un valor de  $a = 7$

$$NN = 65 + 51 + 3 + 7 / 0.1(2 + 0.1 \times 2)10^{-2} = 57272$$

El resultado después de redondear se expresa como:  $5.7 \times 10^4$

## 5.2. Estimación para un recuento bajo.

5.2.1. Si en dos placas correspondientes a la suspensión inicial, cada una tiene menos de 15 colonias identificadas, informar el resultado de la siguiente manera:

### Estimación del número de estafilococos coagulasa positiva por gramo:

$$N_e = \sum a/V \times 2 \times d \quad \text{Donde:}$$

$\Sigma a$ : es la sumatoria de las colonias de estafilococos coagulasa positiva identificadas (5.1.1.)

$V$ : es el volumen sembrado en cada placa

$d$ : es el factor de dilución de la suspensión

5.2.2. Si las dos placas correspondientes a la siembra de suspensión inicial (otros productos) no contienen colonias de estafilococos coagulasa positiva y si la inoculación ha sido realizada con 0.1 ml de muestra informar el resultado de la siguiente manera:

- Menos de  $10/d$  estafilococos coagulasa positiva por gramo, donde  $d$  es el factor de dilución de la suspensión inicial.

Si la inoculación ha sido realizada con 1 ml de muestra informar el resultado de la siguiente manera:

- Menos de  $1/d$  estafilococos coagulasa positiva por gramo, donde  $d$  es el factor de dilución de la suspensión inicial.

## ANEXO 8: Recuento de mohos y levaduras (UFC/g) según ISO 21527- 2:2008.

El ensayo debe realizarse a una muestra representativa que no debe haber sido dañada o cambiada durante el transporte al laboratorio o su almacenamiento. La muestra no debe congelarse.

## **1. Preparación de la muestra, suspensión inicial y diluciones (ISO 6887-1:1999, ver anexo 3)**

### **2. Inoculación e incubación**

2.1. Transferir por medio de una pipeta estéril 0.1 ml de la muestra si el producto es líquido ó 0.1 ml de la suspensión inicial (dilución 1/10) por duplicado en placas de **agar dicloran glicerol 18%**. Repetir el procedimiento para las diluciones decimales si es necesario.

Para facilitar el recuento de bajas poblaciones de levaduras y mohos, se puede inocular un volumen de hasta 0.3 ml de una dilución  $10^{-1}$ ; o directamente de la muestra si es líquida, en tres placas.

2.2. Distribuir el inóculo tan pronto como sea posible sobre la superficie del agar con una espátula estéril, hasta que el líquido se absorba completamente en el medio.

NOTA: Se puede utilizar para la siembra el método de placa vertida, pero en este caso se validará la equivalencia de resultados comparando con los de la inoculación en superficie. La discriminación y la diferenciación de mohos y levaduras no son admisibles. El método de siembra en superficie puede dar recuentos más altos. Este permite una máxima exposición de las células al oxígeno atmosférico y evita cualquier riesgo de inactivación térmica de los propágulos fúngicos. Se recomienda incubar las placas en una bolsa de plástico abierta con el fin de no contaminar la estufa en caso de dispersión de los hongos.

### **3. Recuento de colonias.**

3.1 Realizar el recuento entre el 2º y el 5º día de incubación. Si se han desarrollado mohos de crecimiento rápido, contar el 2º día y luego el 5º y el 7º. Seleccionar las placas con menos de 150 (generalmente entre 10 y 150):

Si la microflora está compuesta principalmente de mohos se seleccionan las placas dentro del intervalo de recuentos más bajos. Si la microflora está compuesta principalmente de levaduras se seleccionan las placas que contienen hasta el límite superior de recuento. Puede llevarse a cabo un examen con una lupa binocular o con un microscopio con el fin de distinguir entre levaduras o mohos y colonias bacterianas.

Contar las colonias de levaduras y las colonias / propágulos de mohos por separado, si es necesario.

Si la identidad de las colonias es dudosa, se examinan preparaciones húmedas o teñidas de células procedentes de un mínimo de 5 colonias por muestra para confirmar que no hay bacterias presentes

NOTA 1: El método de recuento de mohos y levaduras puede ser impreciso ya que el cultivo desarrollado consiste en una mezcla de micelio y esporas asexuales y sexuales. El número de unidades formadoras de colonias dependen del grado de fragmentación del micelio y la proporción de esporas capaces de crecer en el medio en placa.

NOTA 2: La no linealidad de los recuentos de dilución en placas a menudo se produce, es decir, diluciones 1:10 de muestras a menudo no dan lugar a reducciones de 10 veces en los números de colonias recuperadas en el medio.

Esto se ha atribuido a la fragmentación del micelio y la rotura de grumos de esporas durante la dilución, además de la inhibición competitiva cuando un gran número de colonias están presentes en las placas.

PRECAUCIÓN - Las esporas de hongos se dispersan en el aire con gran facilidad. Manipular las placas de Petri con cuidado para evitar el desarrollo de colonias satélites que darían lugar a una sobreestimación de la población en la muestra.

#### 4. Cálculo y Expresión de los resultados.

Según ISO 7218:2007. Ver Anexo 12.

Se informa recuento de mohos y levaduras en la porción de muestra analizada (por gramo)

Si las dos placas correspondientes a la suspensión inicial no contienen colonias de mohos y/o levaduras, informar el resultado como sigue:

$< 10^2$  UFC/g

Volumen sembrado = 0.1 ml

### **ANEXO 9: Recuento de anaerobios sulfito reductores (UFC/g) según ISO 15213:2003.**

#### **1. Preparación de la muestra, suspensión inicial y diluciones (ISO 6887-1:1999, Anexo 3)**

Nota: El tratamiento térmico de la suspensión inicial puede ser necesario para eliminar formas vegetativas de bacterias esporuladas y/o bacterias no esporuladas. Temperaturas y tiempo de calentamiento varían de acuerdo a las necesidades, desde combinaciones que produzcan una pasteurización definitiva a una temperatura moderada para provocar un efecto activador (ej. 75°C durante 20 minutos), hasta hervir durante varios minutos. En este caso, los resultados son número de esporas de bacterias sulfitos reductoras que crecen bajo condiciones anaeróbicas.

#### **2. Inoculación e incubación**

2.1. Transferir por medio de una pipeta estéril 1ml de la suspensión inicial en placa de Petri estéril, por duplicado

2.2. Tomar dos placas de Petri estériles. Usar otra pipeta estéril, transferir a cada placa 1ml de la primer dilución decimal de la suspensión inicial ( $10^{-2}$ ). Repita el procedimiento descrito con las diluciones sucesivas.

2.3. Verter en cada caja de Petri aproximadamente 15 ml de agar sulfito-hierro el cual ha sido enfriado a 44°C - 47°C en un baño de agua. El tiempo transcurrido entre la inoculación de la caja de Petri y la adición del agar no debería exceder los 15 minutos. Cuidadosamente mezclar el inóculo con el medio por movimientos horizontales y permitir que el medio solidifique.

Después que el medio ha solidificado, verter 5 ml ó 10 ml del mismo medio en la placa.

2.4. Si se usan tubos, inocular un volumen de 1 ml de cada dilución dentro de tubos, por duplicado, con medio mantenidos a 44°C - 47°C. Mezclar suavemente sin formar burbujas y dejar solidificar el medio en un baño de agua frío. Después que el medio ha solidificado, verter 2 ml ó 3 ml del mismo medio en cada tubo.

2.5. Después que solidifique el medio incubar las cajas de Petri en jarra de anaerobiosis a 37°C ± 1°C por 24 h a 48 h. Si se sospecha la presencia de bacterias termófilas, preparar una segunda serie de placas de Petri e incubar a 50°C ± 1°C. En el caso de tubos, la incubación en jarra de anaerobiosis no es necesaria.

### **3. Recuento, selección de las colonias y confirmación**

Después de la incubación por 24 h y 48 h, dependiendo del grado de ennegrecimiento y la tasa de crecimiento del microorganismo, contar las colonias negras, posiblemente rodeadas por un halo negro, como bacterias sulfito-reductoras.

NOTA 1: puede ocurrir un difuso e inespecífico ennegrecimiento del medio, especialmente cuando la inoculación se realiza en tubos con agar en lugar de placas de Petri. El crecimiento de bacterias anaerobias, que solo producen hidrógeno y no anhídrido sulfuroso, también puede reducir el sulfito presente y llevar a un ennegrecimiento general del medio.

Contar las colonias de bacterias sulfito-reductoras en cada placa que contenga menos de 150 colonias típicas y menos de 300 colonias en total. Cuando el número de colonias es alto, algunos tubos pueden ser ilegibles. En este caso, solo los tubos donde las colonias están claramente separadas deben ser considerados para el recuento.

NOTA 2: Esta Norma Internacional puede ser usada solo para el recuento de *Clostridium*. Luego de obtener colonia típica, elegir 5 de cada placa, y confirmar el género *Clostridium* con test de confirmación (por ejemplo pruebas de respiración, pruebas de formación de esporas).

### **4. Expresión de los resultados**

Se informa recuento de bacterias sulfito-reductoras en la porción de muestra analizada (por gramo)

Ver anexo 12: Cálculo y expresión de los resultados (ISO 7218:2007).

### **5. Informe del ensayo**

El informe del ensayo debe especificar:

- a) Toda la información necesaria para la completa identificación de la muestra.
- b) El método de muestreo usado si se conocen.

- c) El método de análisis usado, incluyendo la temperatura de incubación, uso de tubos, y cualquier tratamiento térmico para destruir células vegetativas.
- d) Todos los detalles operativos no identificados en la Norma Internacional, o considerados opcionales, junto con detalles de cualquier incidente que pueda haber influenciado en los resultados del análisis.
- e) Los resultados obtenidos. El informe del ensayo también debe establecer si se realizarán más análisis en un laboratorio de referencia, o si se realizaron, cuáles fueron los resultados.

## **ANEXO 10: *Salmonella spp* según ISO 6579:2002; Co 2004**

### **1. Preparación de la muestra, suspensión inicial y diluciones (ISO 6887-1:1999). Preenriquecimiento.**

Nota: Para la preparación de la suspensión inicial se utiliza en general como diluyente agua peptona bufferada (BPW).

Si la cantidad de la porción a analizar es mayor de 25 g utilizar la cantidad necesaria del diluyente de preenriquecimiento para llevar a una dilución 1/10.

### **2. Enriquecimiento selectivo.**

Transferir 0.1 ml del cultivo obtenido en 1. a un tubo con 10 ml de caldo RVS e incubar a  $41.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ .

Transferir 1 ml del cultivo obtenido en 1. a un tubo con 10 ml de caldo MKTTn e incubar  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ .

Nota: Se recomienda utilizar baño de agua o estufa de incubación con aire forzado para asegurar que la temperatura máxima no exceda los  $42.5^{\circ}\text{C}$ .

### **3. Aislamiento e identificación.**

Tomar un ansada de los cultivos obtenidos en 2. (Caldo RVS y MKTTn) y estriar en una placa de agar XLD. Utilizar las placas de Petri grandes ó 2 del menor tamaño usando el mismo ansa. Proceder de la misma manera con el segundo agar selectivo.

Incubar las placas de XLD a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$  y el segundo agar selectivo de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Examinar las placas después de la incubación para la determinación de la presencia de colonias típicas de *Salmonella* y colonias atípicas que podrían ser *Salmonella* (ver nota).

Las colonias típicas de *Salmonella* en el agar XLD son transparentes, del mismo color del medio con centro negro.

Nota: las colonias de *Salmonella* H<sub>2</sub>S negativo (ej. *S. paratyphi* A) en el XLD son rosadas con un centro rosa oscuro y las de *Salmonella* lactosa positivas son de color amarillo con o sin centro negro.

#### **4. Confirmación bioquímica.**

Para la confirmación por propiedades bioquímicas pueden utilizarse kits comerciales para los cuales deben seguirse las instrucciones del fabricante. Para la confirmación tomar de cada placa de Petri (2 placas del menor tamaño o una del mayor tamaño) de cada medio selectivo (ver 3.3.3.) al menos una colonia típica o sospechosa de *Salmonella* y 4 colonias más si la primera es negativa. En el caso de estudios epidemiológicos se recomienda tomar al menos 5 colonias para la confirmación. Si en algunas de las placas hay menos de 5 colonias sospechosas confirmar todas las colonias sospechosas.

Seleccionar las colonias sospechosas y estriar por agotamiento en superficie en placas de agar nutritivo para obtención de colonias aisladas. Incubar las placas a 37°C ± 1°C durante 24 h ± 3 h.

Para la confirmación bioquímica y serológica utilizar cultivos puros.

**Agar TSI:** con una aguja de inoculación hacer una punción en el fondo y estriar el pico de flauta. Incubar a 37°C ± 1°C durante 24 h ± 3 h. Interpretación:

Fondo:

- amarillo: glucosa positivo; - rojo o sin cambio: glucosa negativo
- negro: formación de H<sub>2</sub>S; - burbujas o ruptura de agar: formación de gas a partir de la glucosa

Pico de flauta:

- amarillo: lactosa y/o sucrosa positivo; - rojo o sin cambio: lactosa y sucrosa negativo.
- Las cepas típicas de *Salmonella* dan reacción alcalina (color rojo) en el pico de flauta y ácida (color amarillo) en el fondo, con formación de gas y (en aproximadamente en el 90% de los casos) formación de H<sub>2</sub>S (ennegrecimiento del agar).

En presencia de una *Salmonella* lactosa positiva el pico de flauta del TSI es de color amarillo. Por esto la confirmación preliminar de *Salmonella* no debe basarse solamente en resultados del TSI.

**Agar urea:** Con un aguja de inoculación estriar el pico de flauta. Incubar a 37°C ± 1°C durante 24 h ± 3 h y examinar en intervalos.

Reacción positiva: por hidrólisis de la urea se libera amonio que vira el color del indicador rojo de fenol a rosa y luego a color cereza. La reacción generalmente aparece después de 2 h a 4 h.

**Caldo L-Lisina decarboxilasa:** a partir del cultivo puro inocular con una aguja de inoculación por debajo de la superficie del caldo. Incubar a 30°C ± 1°C durante 24 h ± 2 h.

Reacción positiva: coloración violeta; Reacción negativa: coloración amarilla

**$\beta$ - Galactosidasa:** Utilizar discos siguiendo las instrucciones del fabricante.

**Medio para Voges- Proskauer (VP):** Resuspender un ansada de la colonia sospechosa en un tubo estéril con 3 ml de caldo VP, Incubar a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 h  $\pm$  3 h después de la incubación agregar 2 gotas de la solución de creatina, 3 gotas de la solución alcohólica de  $\alpha$ -naftol y 2 gotas de la solución de KOH; agitar después del agregado de cada reactivo.

**Medio para reacción de indol:** Resuspender una ansada de la colonia sospechosa en un tubo estéril con 5 ml de caldo triptona – triptófano. Incubar a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 h  $\pm$  3 h. Después de la incubación agregar 1 ml de reactivo de Kovacs.

Reacción positiva: anillo rojo; Reacción negativa: anillo amarillo – marrón.

### Interpretación de las pruebas bioquímicas

Test	Salmonella									
	S. Typhi		S.Paratyphi A		S.Paratyphi B		S. Paratyphi C		Otras especies	
	reacción	% (b)	reacción	% (b)	reacción	% (c)	reacción	% (c)	reacción	% (b)
TSI: ácido de glucosa	+	100	+	100	+		+		+	100
TSI: gas de glucosa	(d)	0	+	100	+		+		+	92
TSI: ácido de lactosa	-	2	-	100	-		-		-	1
TSI: ácido de sucrosa	-	0	-	0	-		-		-	1
TSI: producción de H <sub>2</sub> S	+	97	-	10	+		+		+	92
Urea	-	0	-	0	-		-		-	1
Lysina decarboxilasa	+	98	-	0	+		+		+	95
$\beta$ - galactosidasa	-	0	-	0	-		-		-	2 <sup>(e)</sup>
VP	-	0	-	0	-		-		-	0
Indol	-	0	-	0	-		-		-	1

(b) estos porcentajes indican que no todos los aislamientos de serotipos de

*Salmonella* presentan las reacciones + o – marcadas.

(c) el porcentaje no está disponible en la literatura.

(d) *Salmonella* Typhi es anaerogénica (no produce gas)

(e) *Salmonella entérica* subespecie arizonae puede ser lactosa positiva o negativa pero siempre da positiva la reacción de la  $\beta$ -galactosidasa. Para el estudio de estas cepas es útil realizar pruebas bioquímicas complementarias.

### 5. Confirmación serológica y tipificación.

Una vez realizada la identificación por propiedades bioquímicas, la cepa debe ser enviada para confirmación serológica y una mayor tipificación (Centro de Referencia: INEI A.N.L.I.S Dr. Carlos G. Malbrán”).

### 6. Expresión de los resultados.

Indicar presencia o ausencia de *Salmonella* en la cantidad de muestra analizada (por gramos)

6. **Control positivo:** Junto con la muestra realizar un control positivo con un inóculo de una cepa de *Salmonella* spp. de referencia y proceder de la misma manera que la muestra para demostrar que el cultivo positivo es recuperado.

## **ANEXO 11: *Listeria monocytogenes* según ISO:11290- 1:1996 .**

### **1.Preparación de la muestra.**

Los envases intactos de las muestras deben ser desinfectados en el sitio de la incisión inmediatamente antes de realizar la misma para la toma de muestra. Para la desinfección se puede utilizar: peróxido de hidrógeno al 3 %, etanol al 70 %, o isopropanol al 70 %. Si el envase no parece estar limpio, lavar antes de la desinfección con agua y jabón y luego enjuagar.

### **2.Preenriquecimiento y enriquecimiento.**

Pesar 25 g de la muestra en una bolsa de *Stomacher*, agregar 225 ml de BLEB y homogeneizar. Incubar durante 4h a 30°C. Agregar los agentes selectivos y continuar la incubación por 24-48 h. NOTA: La cicloheximida puede ser reemplazada por natamicina (25 mg/l).

### **3.Test de screening (OPCIONAL).**

A partir del caldo de enriquecimiento BLEB de 24 h y 48 h de incubación, estriar en uno de los siguientes agares selectivos para aislamiento: OXA, PALCAM, MOX, LPM. Incubar las placas de OXA, MOX, PALCAM a 35°C durante 24 h – 48 h, y las placas de LPM a 30° C durante 24 h – 48 h.

partir del caldo de enriquecimiento de 48 h (y del caldo de 24 h en forma opcional) estriar en uno de los siguientes medios selectivos diferenciales: BCM, ALOA o CHROM agar.

### **4. Selección de colonias sospechosas.**

e. Examinar las placas del punto 3.1 después de la incubación, para la determinación de la presencia de colonias típica de *Listeria* spp. Las colonias típicas son pequeñas (aproximadamente 1mm) y rodeadas por un halo de oscurecimiento debido a la hidrólisis de la esculina.

Seleccionar 5 ó más colonias típicas y sembrar por estriado en agar TSA-YE para aislamiento de las colonias sospechosas. Incubar a 30°C durante 24 h – 48 h.

f. Examinar las placas del punto 3.2 después de la incubación para la determinación de la presencia de colonias típicas de *Listeria monocytogenes*, que se evidencian de la siguiente manera:

Agar BCM: colonias azules.

- Agar ALOA: las colonias de *L.monocytogenes* y *L. ivanovii* son azules.



con una zona de lipólisis.

Seleccionar 5 ó más colonias típicas y sembrar por estriado en agar TSA-YE, para aislamiento de las colonias sospechosas. Incubar a 30°C durante 24 h – 48 h.

NOTA: El TSA-YE se puede incubar a 35°C si las colonias no se someterán a la prueba de movilidad (6.2).

## 5. Identificación.

**5.1. Observación de colonias típicas con el sistema óptico de Henry (opcional):** Examinar las placas de TSA-YE para ver las colonias típicas. En forma opcional se pueden examinar las colonias con el sistema óptico de Henry (fig.1), el cual consta de un rayo de luz blanca, transmitido en forma oblicua. Las colonias se observan con una coloración azul grisácea a azul. Se recomienda el uso de controles positivos y negativos. La placa se puede observar a simple vista, pero se recomienda utilizar un microscopio de baja resolución o un microscopio de disección (con espejo incorporado).

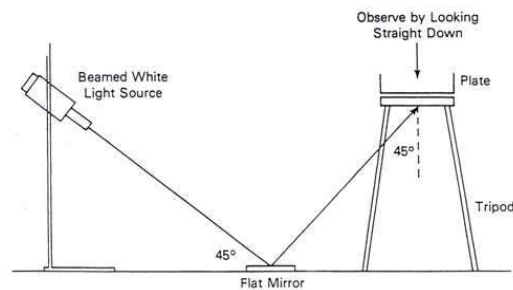


Figura 1: Sistema óptico de Henry

**5.2. Prueba de la movilidad:** A partir de una colonia típica de una placa incubada a una temperatura de 30°C o menor, preparar una suspensión densa en solución fisiológica al 0.85 %. Depositar una gota de la suspensión entre porta y cubreobjeto bien limpios y examinar en el microscopio. *Listeria* spp. se presenta como bacilos cortos, delgados y con movimientos característicos en tumbos (tumbling).

**5.3. Prueba de la catalasa:** Tomar una colonia aislada y suspender en una gota de solución de peróxido de hidrógeno al 3 % en un portaobjeto. Una reacción positiva se ve por la formación inmediata de burbujas de gas.

**5.4. Coloración de Gram:** Realizar la coloración de Gram. *Listeria* spp. se presenta como bacilos Gram positivos cortos y delgados.

**5.5. Inoculación en caldo TSB-YE:** Inocular las colonias típicas en un tubo con caldo TSB-YE. Incubar a 35°C durante 24 h. Este cultivo puede ser conservado a 4°C durante varios días para

repetidas inoculaciones. A partir de este tubo se realizarán las pruebas de fermentación de hidratos de carbono y otras pruebas bioquímicas.

#### **5.6. Prueba de hemólisis**

A partir del agar TSA-YE inocular el agar sangre de oveja al 5 %, para realizar el test de hemólisis. Secar bien la superficie del agar sangre de oveja antes de usar, delinear una grilla de 20 - 25 espacios en la base de la placa y, a partir de una colonia aislada, sembrar con aguja. Utilizar un espacio para cada cultivo. Simultáneamente sembrar controles positivos (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*) y un control negativo (*L. innocua*). Incubar a 35°C durante 24 h – 48 h.

Después de la incubación, examinar las cepas bajo luz brillante:

- *L. monocytogenes*: produce una delgada y clara zona de  $\beta$ -hemólisis
- *L. innocua*: no produce zona de hemólisis
- *L. seeligeri*: produce una zona de hemólisis débil
- *L. ivanovii*: generalmente produce una amplia y clara zona de  $\beta$ - hemólisis

NOTA: No diferenciar especies en este punto, pero registrar la naturaleza de la reacción de hemólisis. En caso de reacciones dudosas, resolver con el test de CAMP.

La prueba de hemólisis se observa mejor cuando se utiliza una capa de agar sangre más delgada de lo usual. También se puede utilizar una sobrecapa de agar sangre de 1- 2 mm de grosor.

#### **5.7. Reducción de nitrato (opcional)**

Sólo *Listeria grayi* ssp. murrayi reduce nitratos. Este test permite distinguir *L. grayi* ssp. murrayi de *L. grayi* ssp. grayi.

A partir del caldo TSB-YE (3.3.6.5) inocular el caldo nitrato. Incubar a 35°C durante 5 días. Agregar 0.2 ml del reactivo A, seguido de 0.2 ml del reactivo B.

El desarrollo de una coloración rojo - violeta indica la presencia de nitritos (reducción del nitrato).

Si no hay desarrollo de color, agregar zinc en polvo y esperar 1 h. El desarrollo de coloración rojo - violeta indica que no hubo reducción de nitratos.

#### **5.8. Inoculación en SIM o MTM.**

A partir del caldo TSB-YE inocular agar SIM ó MTM, incubar a temperatura ambiente 7 días. Observar diariamente. *Listeria* spp. es móvil y da un crecimiento típico en forma de paraguas (umbrella) en la cercanía de la superficie del agar.

En el medio MTM se observa un crecimiento típico más definido.

#### **5.9. Prueba de fermentación de carbohidratos.**

A partir del cultivo obtenido en TS-YEB inocular con un ansa cada uno de los caldos para utilización de carbohidratos (caldo base púrpura de bromo cresol para fermentación de carbohidratos con 0.5 % de soluciones de dextrosa, esculina, maltosa, ramnosa, manitol y xilosa). El uso de campanita de Durham es opcional. Incubar a 35°C hasta 7 días. Una reacción positiva (formación de ácido) se visualiza por una coloración amarilla, que generalmente sucede dentro de las 24 - 48 h. Todas las especies de *Listeria* son positivas para dextrosa, esculina y maltosa y negativas para manitol (excepto *L. grayi*). Ver punto 7 para interpretación de resultados.

NOTA: si la reacción de esculina se evidencia bien en los medios OXA, PALCAM, MOX, LPM se puede omitir esta prueba en tubo.

#### **5.10. Pruebas bioquímicas por kits comerciales.**

Los cultivos puros pueden ser identificados por sistemas de identificación bioquímica disponibles en el comercio (ej. API Listeria, Vitek, MICRO-ID bioMérieux)

#### **5.11. Prueba de CAMP (figura A).**

- En una placa de agar sangre de oveja estriar en forma paralela una línea simple de *S. aureus* ATCC 25923 ó ATCC 4944 y otra línea simple de *Rhodococcus equi* ATCC 6939, separadas entre sí 3-4 cm. Utilizar un ansa o aguja de inoculación.
- Estriar los cultivos test en una línea simple y perpendicular entre las dos líneas de cultivos de referencia. Las líneas de cultivo test deben estar separadas de las de referencia 2 - 4 mm. Durante el estriado las líneas test y referencia no se deben tocar para evitar contaminación cruzada.
- Simultáneamente estriar cultivos controles de *L.monocytogenes*, *L. innocua* y *L. ivanovii*
- Incubar 24 h a 48 h a 35°C.
- Se considera reacción positiva una zona acrecentada de  $\beta$ -hemólisis en la intersección de los cultivos test y los cultivos de *S.aureus* y *R.equi*.
- Una reacción positiva para *R. equi* se ve como una amplia zona (5 a 10 mm) en forma de "cabeza de flecha" de hemólisis. La reacción es negativa si se presenta como una pequeña zona (alrededor de 1 mm) de hemólisis débil en la intersección del cultivo test con la zona de difusión de *R.equi*.
- Una reacción positiva para *S.aureus* se ve como una pequeña zona de hemólisis acrecentada, que se extiende alrededor de 3 a 4 mm del cultivo test y dentro de la zona de hemólisis débil debida al crecimiento del cultivo de *S.aureus*. No ocurre una zona grande de  $\beta$ -hemólisis en la proximidad de las áreas entre *S.aureus* y *L. monocytogenes*.

### **6. Interpretación de propiedades morfológicas, fisiológicas y reacciones bioquímicas.**

Todas las especies de *Listeria* spp. son bacilos cortos Gram positivos móviles, catalasa positivos.

*Listeria monocytogenes* se distingue de las demás especies por las propiedades presentadas en la siguiente tabla:

Especie	Hemólisis	Producción de ácido			Test de CAMP	
		manitol	ramnosa	xilosa	<i>S.aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	V	+	-	-
<i>L. grayi sub. grayi</i>	-	+	-	-	-	-
<i>L. grayi sub. murrayi</i>	-	+	V	-	-	-

V: Reacción variable

(+) Reacción positiva débil

+: > del 90 % reacciones positivas;

-: reacción negativa

NOTA: existen algunas cepas raras de *L. monocytogenes* que no dan  $\beta$  – hemólisis y dan reacción de CAMP negativa.

### 8. Test de identificación genética.

En centros de Referencia, los tests de identificación genética pueden ser utilizados como tests confirmatorios para todas las cepas de *Listeria monocytogenes* identificadas por pruebas bioquímicas. Sin embargo, pueden ser requeridos para identificar cepas atípicas sospechosas de ser *L. monocytogenes*. En algunos casos no se pueden diferenciar las cepas de *L. monocytogenes* de las cepas de *L. innocua* por pruebas fenotípicas, en particular para *L. monocytogenes*  $\beta$ -hemolíticas ramnosa negativa y fosfolipasa C negativa. En otros casos una *L. monocytogenes* débilmente hemolítica puede ser confundida como *L. innocua* (además existen las cepas de *L. innocua*  $\beta$ -hemolíticas).

### 9. Serotipificación

En centros de Referencia, para la serotipificación se pueden utilizar sueros comerciales para caracterizar a los aislamientos como tipo 1, tipo 4 ó no tipo 1 ó 4 (tipo 3, 5, 6 etc.). Seguir las instrucciones del fabricante.

Especies de <i>Listeria</i>	serotipos
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, "7"
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. innocua</i>	4ab, 6a, 6b, IN <sup>a</sup>
<i>L. welshimeri</i>	6a,6b
<i>L. seeligeri</i>	1/2b, 4c, 4d, 6b, IN <sup>a</sup>

a: IN: Indefinido

La mayoría de los aislamientos de *L. monocytogenes* obtenidos en pacientes y en muestras ambientales corresponden a los serotipos 1 y 4. Más del 90 % de los aislamientos de *L. monocytogenes* pueden ser serotificados con sueros disponibles en el comercio. Todas las especies no patogénicas excepto *L. welshimeri* comparten uno o más antígenos somáticos con *L. monocytogenes*.

#### 10. Expresión de los resultados.

De acuerdo a la interpretación de resultados, indicar presencia o ausencia de *Listeria monocytogenes* en la cantidad de muestra analizada (por gramos o mililitros para muestras líquidas).

Nota: Una vez identificado el microorganismo como *Listeria monocytogenes* por propiedades bioquímicas, la cepa debe ser enviada al Centro de Referencia Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S “Dr. Carlos G. Malbrán”, para una mayor caracterización.

#### 11. Control positivo.

Junto con la muestra, realizar un control positivo con un inóculo de una cepa de *Listeria monocytogenes* de referencia, y proceder de la misma manera que la muestra para demostrar que el cultivo positivo es recuperado.

### ANEXO 12: Cálculo y expresión de los resultados (ISO 7218:2007)

**1.1. Método de cálculo: caso general.** Para que el recuento sea válido, se suele considerar necesario que el recuento de colonias se realice al menos en una placa que contenga un mínimo de 10 colonias. El número de microorganismos *N* presentes en la muestra para análisis se calcula como la media corregida de dos diluciones consecutivas, utilizando la ecuación (1)

$$N = \frac{\Sigma C}{V \times 1,1 \times d}$$

Donde:

$\Sigma C$ : es la suma de las colonias contadas en dos placas de las dos diluciones consecutivas, de las cuales al menos una contiene un mínimo de 10 colonias;

*V*: es el volumen de inóculo utilizado en cada placa, en mililitros;

*d*: es la dilución correspondiente a la primera dilución elegida (*d* = 1 cuando se utiliza el producto líquido sin diluir).

El resultado calculado se redondea a dos cifras significativas. Cuando se realiza esta operación:

- si la tercera cifra es inferior a 5, no se modifica la cifra anterior;
- si la tercera cifra es igual o superior a 5, la cifra anterior se incrementa en una unidad.

Preferiblemente el resultado se expresa como un número entre 1.0 y 9.9 multiplicado por la potencia de 10 adecuada, o como un número entero con dos cifras significativas.

El resultado se expresa como número de microorganismos N por mililitro (para productos líquidos) o por gramo (para el resto de productos).

Ejemplo1: El recuento ha proporcionado los siguientes resultados:

- Para la primera dilución ( $10^{-2}$ ): 168 colonias; para la segunda dilución ( $10^{-3}$ ): 14 colonias.

$$N = \frac{\Sigma C}{V \times 1,1 \times d} = (168 + 14) / 1 \times 1,1 \times 10^{-2} = 182 / 0,011 = 16545$$

Redondeando el resultado como se indicó, el número de microorganismos es de 17.000 o  $1.7 \times 10^4$  por mililitro o por gramo de producto. NOTA: en caso de sembrar 0,1 ml  $V = 0,1$  ml

**1.2. Método de cálculo para recuento bajo:** caso en el que una placa (muestra para análisis o suspensión inicial o primera dilución) contiene menos de 10 colonias.

- Si la placa contiene menos de 10 colonias, pero como mínimo 4, el resultado se calcula siguiendo el caso general (1.1) y se expresa como: “el número estimado de microorganismos x por mililitro (productos líquidos) o por gramo (resto de productos)”.

- Si el resultado total oscila entre 1 y 3, la precisión del análisis es demasiado baja y el resultado debe expresarse como: “hay microorganismos presentes, pero a un nivel inferior a (4xd) por gramo o ml”.

**1.3. Método de cálculo para el caso en el que la placa** (muestra para análisis, suspensión inicial o primera dilución) **no contiene colonias.**

Si la placa que contiene la muestra para análisis (productos líquidos) o la suspensión inicial (resto de productos), o la primera dilución inoculada o escogida no contiene colonias, el resultado se expresa de la siguiente manera: “Menos de  $1/d$  microorganismos por mililitro” (productos líquidos) o “menos de  $1/d$  microorganismos por gramo” (resto de los productos).

Donde d es el factor de dilución de la suspensión inicial, o la primera dilución inoculada o escogida ( $d = 100 = 1$  cuando se inocula directamente la muestra para análisis).

**1.4. Método de cálculo para el caso en el que la placa** (muestra para análisis, suspensión inicial o primera dilución) **contiene más de 300 colonias.**

Si el recuento de colonias en todas las placas de todas las diluciones es incontable, mayor a 300, el resultado se expresa de la siguiente manera: “Más de  $300/d$  microorganismos /g ó ml”

Donde d es la dilución correspondiente a la última dilución escogida.

Ejemplo: - Si la última dilución (más diluida) sembrada fue  $10^{-3}$  y se sembró 1ml  $> 300.000$  microorganismos /ml o g  $\Rightarrow > 3 \times 10^5$  UFC/ml o g.