

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados



**ESTUDIO TRANSVERSAL EPIDEMIOLÓGICO
SOBRE CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA AMBIENTAL
EN CARNICERÍAS DE MONTEVIDEO-URUGUAY**

PATRICIA CORREA LUNA BAROZZI

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY
2015



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de posgrado

**“ESTUDIO TRANSVERSAL EPIDEMIOLÓGICO SOBRE CONTAMINACIÓN
MICROBIOLÓGICA AMBIENTAL EN CARNICERÍAS DE MONTEVIDEO-
URUGUAY”**

Dra. PATRICIA CORREA LUNA BAROZZI

Dr. Armando Hoet

Dr. Andrés Gil

Dr. Gustavo Varela

Director de Tesis

Co- Director

Co-director

2015

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Pablo Zunino; DMV, MS, PhD

Departamento de Microbiología

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable - Uruguay

José Piaggio, DMV, MS

Departamento de Bioestadística e Informática

Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República – Uruguay

Laura Betancor; DM, MS, PhD

Departamento de Bacteriología y Virología

Facultad de Medicina de la Universidad de la República - Uruguay

ACTA DE EXAMEN

CURSO: Defensa de Tesis de Maestría

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: Montevideo, 20 de noviembre de 2015

TRIBUNAL: Dres. Pablo Zunino, José Piaggio, Laura Bentancor

CI ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
2.920.869-7	CORREA LUNA, Patricia	S.S.S.	12

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

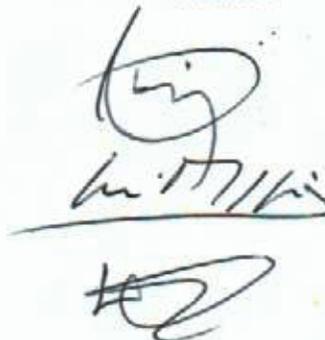
TRIBUNAL

Dr. Pablo Zunino (Presidente)

Dr. José Piaggio

Dra. Laura Bentancor

FIRMA



NOTA: La calificación mínima para aprobar el examen es B.B.B (6)

INFORME DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores los Dres. Armando Hoet, Andrés Gil y Gustavo Varela por impulsarme a realizar la maestría, sus enseñanzas y dedicación.

Al Instituto Nacional de Carnes por permitir la realización de este trabajo y colaborar en la obtención de las muestras.

A mis colegas y amigos de la Cátedra de Bioestadística de la Facultad de Veterinaria por su apoyo incondicional.

A todas las personas del Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene por su colaboración y constante ayuda en el procesamiento de las muestras.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por la financiación brindada.

A los miembros del tribunal Dres. Pablo Zunino, José Piaggio y Laura Betancor por las sugerencias realizadas para mejorar la calidad de este trabajo.

A toda mi familia, especialmente a mi madre, a mi esposo y a mi hijo por apoyarme y acompañarme en este camino.

La investigación que da origen a los resultados presentados en la presente publicación recibió fondos del programa posgrados en el país (becaria P.C.L) de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación bajo el código POS_2011_1_3568.

ÍNDICE

1. RESUMEN	iii
2. ABSTRACT	iv
3. INTRODUCCIÓN	1
4. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	2
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	10
5.1 Objetivo general	11
5.2 Objetivos específicos	11
6. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN	12
7. MATERIALES Y MÉTODOS	13
7.1 Muestreo	13
7.1.1 <i>Marco de muestreo</i>	13
7.1.2 <i>Tamaño de muestra</i>	13
7.1.3 <i>Selección de carnicerías</i>	13
7.1.4 <i>Procedimiento de muestreo</i>	13
7.2 Estudio microbiológico. Aislamiento e identificación de microorganismos	15
7.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	15
7.2.2 <i>Escherichia coli</i>	17
7.2.3 <i>Salmonella</i> spp.	18
7.3 Encuesta epidemiológica	19
7.4 Análisis estadístico	19
8. RESULTADOS	21
8.1 Generalidades	21
8.2 Resultados según agente bacteriano	22
8.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	22
8.2.2 <i>Escherichia coli</i>	26
8.3 Encuesta epidemiológica	30
9. DISCUSIÓN	34
10. CONCLUSIÓN	41
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXO I	47

1. RESUMEN

La contaminación de la carne puede ocurrir en diferentes etapas a lo largo de la cadena alimentaria, incluso en los puntos de venta, cuando ésta toma contacto con distintas superficies como tablas, picadoras y manos del personal, entre otras. Esta situación constituye un riesgo potencial para la salud de los consumidores y para la calidad de los productos.

En Uruguay existe poca información disponible sobre el nivel de contaminación de dichas superficies en las carnicerías. El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de la contaminación microbiológica en las superficies en contacto con los productos cárnicos, e identificar factores asociados a la misma en carnicerías del departamento de Montevideo.

Se estudiaron 66 carnicerías estratificadas en tres áreas geográficas (AG1,2 y 3) según el nivel socio-económico de la población. En todas las carnicerías se tomaron muestras de cuatro tipos de superficies: mesadas de trabajo, tablas, mangos de cuchillos y picadoras de carne procesándose un total de 264 muestras. Las muestras se analizaron en forma individual utilizando protocolos internacionalmente reconocidos para la detección de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp. Para la detección de los genes *mecA* y *tst* en las cepas de *S. aureus*, y *stx1/2* en las cepas de *E. coli* se utilizó la técnica de PCR. Asimismo, se realizó una encuesta epidemiológica para identificar factores de riesgo asociados con los niveles de contaminación.

En función de la muestra se estimó que el 86,88% de las carnicerías de Montevideo tendrían contaminación microbiológica en al menos una de las superficies estudiadas, detectándose una mayor contaminación en el área socio-económica baja y medio-baja (AG3). En este sentido, el 65,07% de las carnicerías tendría *S. aureus*, y el 74,86% *E. coli*. Las superficies más frecuentemente contaminadas fueron mangos de cuchillos, mesadas y picadoras. Asimismo, se estimó que el 6,85% de las carnicerías tendrían cepas de *S. aureus* portadoras del gen *tst* y el 5,46% cepas portadoras del gen *mecA*. En ninguno de los establecimientos se logró aislar *Salmonella* spp. ni detectar cepas de *E. coli* con genes *stx1/2*.

Los resultados de este estudio muestran una alta prevalencia de *S. aureus* y *E. coli* en las superficies en contacto con la carne. Esto sugiere un déficit en la aplicación de buenas prácticas de higiene; fundamentalmente en aquellas carnicerías ubicadas en el área socio-económica baja y medio-baja. De los factores de riesgo estudiados, se encontraron diferencias significativas entre los niveles de contaminación versus área socio-económica, tipo de carnicería, volumen de venta, nivel educativo del personal y también entre los materiales de alguna de las superficies.

Es necesario profundizar en la capacitación de los manipuladores de productos cárnicos para que conozcan y apliquen medidas adecuadas que reduzcan la contaminación de las superficies de trabajo. Estas medidas están destinadas a asegurar la inocuidad y calidad de la carne, y a disminuir el impacto que este alimento, consumido ampliamente en nuestro país, pudiera tener como vehículo de agentes infecciosos y/o sus toxinas.

2. ABSTRACT

Contamination of meat can occur at different stages along the food chain, including at the point of sale where meat touches distinct surfaces like tables, mincers, manipulators' hands, among others. Such contamination constitutes a potential risk for the consumers' health and also affects the quality of the product. Nevertheless, there is limited information available in regards to the level of contamination of such surfaces in butcher shops in Uruguay. The objective of this study was to determine the prevalence of microbiological contamination on surfaces which are usually in touch with meat products, and to identify the risk factors associated with such contamination in butcher's shops in Montevideo city.

In this study, a total of 66 butcher shops were sampled after been stratified into three geographic areas according to the socio-economic status of the population. Samples of four types of surfaces were collected in each butcher shop: working tables, cutting boards, knife handles, and meat mincers. A total of 264 samples were collected. The samples were analyzed according to internationally recognized protocols for detection of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. For the detection of genes such as *mecA* and *tst* for *S. aureus* and *stx1/2* for *E. coli*, PCR assays were used. In addition, an epidemiological survey was conducted in each butcher shop in order to identify potential risk factors associated with contamination levels.

According to the samples, it is estimated that 86.88% of the butcher shops of Montevideo would have microbiological contamination in at least one of the studied surfaces. Butcher's shops located in low and medium-low socio-economic areas (GA3) presented the highest contamination. In this regard, the 65.07% of butchers have *S. aureus* and 74.86% have *E. coli*. The most frequently surface contaminated were tables, meat mincers and knife handles. It is also estimated that 6.85% and 5.46% of the butchers would have *S. aureus* strains carrying the *tst* and *mecA* genes respectively. None *Salmonella* spp. nor *E. coli* strains with *stx1/2* genes were detected in any of the establishments.

The results of this study show a high prevalence of *S. aureus* and *E. coli* in meat contact surfaces in butcher's shops across the Department of Montevideo. This could be evidence of deficiencies in the application of good hygiene practices in regards to meat related contact surfaces and food handlers. This contamination was fundamentally observed in butcher shops located in low and medium-low socio-economic areas. Among the studied risk factors, significant differences between the levels of contamination versus socio-economic areas, kind of butcher shop, sales volume, staff's education level and also among materials of some of the surfaces.

It is necessary to further train manipulators of meat products so they become knowledgeable and capable of applying appropriate actions to reduce the contamination of working surfaces. These measures are designed to ensure safety and quality of the meat and also to reduce its role as a vehicle for infections agents or its toxins.

3. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) causadas por agentes infecciosos o sus toxinas constituyen un problema de salud pública importante y creciente (FAO y OMS, 2002). Tanto en los países desarrollados como en aquellos en vía de desarrollo estas afecciones constituyen una de las principales causas de morbi-mortalidad para los seres humanos (Hassan et al. 2010).

Investigaciones realizadas previamente en distintos países demostraron contaminación microbiológica en la carne (Bosilevac et al. 2007; Pu et al. 2009) y en el ambiente donde se manipula la misma (Hassan et al. 2010). Otros estudios establecieron que bacterias, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* entérica pueden sobrevivir en diferentes tipos de superficie por horas o días luego del contacto inicial (Scott and Bloomfield, 1990; Jiang and Doyle, 1999). Asimismo, la presencia de bacterias en las superficies de contacto con alimentos aumenta significativamente el riesgo de contaminación cruzada por microorganismos con acción deletérea sobre los mismos y por otros capaces de producir ETAs de severidad variable en seres humanos (Sospedra et al. 2012).

La mayoría de los países que cuentan con sistemas para la vigilancia y notificación de casos de ETAs han documentado durante las últimas décadas un aumento significativo en la incidencia de enfermedades causadas por microorganismos presentes en los alimentos, incluyendo *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157, entre otros (FAO y OMS, 2002).

En Uruguay, también se ha observado una tendencia en aumento en la incidencia de los brotes de ETA desde el año 1995. Los agentes más frecuentemente aislados de los alimentos identificados como responsables de los brotes de origen bacteriano fueron *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus*; identificándose al hombre como fuente potencial de infección únicamente en los brotes en los que el agente causal fue *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, en la mayoría de los casos de ETA no se logró identificar el o los agentes responsables (Acuña et al. 2002) ni tampoco se demostró la producción de toxinas o la presencia de sus genes en las cepas recuperadas.

En Uruguay el consumo de carne sin industrializar ocupa el lugar más destacado dentro de la canasta, con una ingesta per cápita de 98,6 kg por habitante por año (INAC, 2015). Por esta razón y lo anteriormente expresado respecto a la contaminación encontrada en la carne cruda y en el ambiente donde ésta se manipula, no sería extraño suponer que este tipo de alimento contribuya a la difusión de agentes de ETAs en nuestro país.

En el presente, Uruguay dispone de poca información sobre la contaminación microbiológica ambiental en los puntos de venta de productos cárnicos, por lo que este trabajo tuvo como finalidad determinar la prevalencia de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* entérica y *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC) en las superficies de contacto con los productos cárnicos en las carnicerías de Montevideo.

4. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

A medida que aumenta la globalización en el suministro de alimentos, sobre todo aquellos que son producidos masivamente, resulta cada vez más evidente la necesidad de reforzar los sistemas que velan por su inocuidad en todos los países. Es por ello que la OMS, ha definido la inocuidad de los alimentos como una prioridad de salud pública, fomentando medidas destinadas a mejorarla a lo largo de toda la cadena alimentaria, desde la granja hasta el plato (FAO/OMS, 2015).

Los alimentos insalubres plantean amenazas para la salud a escala mundial y ponen en peligro la vida de todas las personas. Se ha calculado que cada año mueren aproximadamente 2 millones de personas como consecuencia de enfermedades diarreicas, cuya causa puede atribuirse en la mayoría de los casos a la ingesta de agua o alimentos contaminados (FAO/OMS, 2015).

El comercio internacional de productos alimenticios, la modificación de los hábitos de consumo (tendencia actual a ingerir “comidas rápidas”), la mayor movilidad de las personas entre los diversos países y las malas prácticas de higiene, son los principales factores identificados como responsables del aumento de los casos de ETAs (Hassan et al. 2010). Estas enfermedades presentan la particularidad de impactar sobre las comunidades, regiones y países con una doble agresión de especial importancia: la repercusión sobre la salud de personas y animales, y sobre la economía con aumento de los costos sanitarios, pérdida de alimentos, mercados, trabajo y divisas (Acuña et al. 2002; Scallan et al. 2011).

Las ETAs constituyen un grupo heterogéneo de patologías asociadas al consumo de agua o alimentos, que contienen una variedad de agentes infecciosos o no infecciosos nocivos para la salud de los seres humanos. Se trata de procesos de gravedad variable y que generalmente se presentan con signos y síntomas de la esfera digestiva, aunque puede haber compromiso de otros sistemas. La mayoría de las veces producen cuadros autolimitados pero en ocasiones pueden evolucionar a procesos más severos y/o crónicos, con secuelas permanentes (CDC, 2003). Dentro de las ETAs existe un subgrupo de enfermedades denominado Toxi-Infecciones Alimentarias (TIAs) definido clásicamente como la situación en la cual 1 o más personas que consumieron el mismo alimento desarrollan, luego de un periodo de incubación variable pero generalmente menor a 72 horas, una enfermedad similar y de tipo toxi-infeccioso. Las personas con TIA en general presentan diarrea y vómitos, acompañados de fiebre y en algunas ocasiones síntomas y signos neurológicos. Los casos de TIA pueden presentarse de forma esporádica o como brotes, afectando un número variable de personas que consumieron el mismo alimento (Scallan et al. 2011).

La mayoría de los países que cuentan con sistemas para la vigilancia y notificación de casos de ETAs han documentado durante las últimas décadas aumentos significativos en la incidencia de enfermedades causadas por microorganismos transmitidos por los alimentos, incluyendo *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* y *E. coli* O157, entre otros (OMS, 2002).

En EEUU un estudio realizado entre los años 2000 y 2008, estimó que cada año ocurren 9,4 millones de casos de ETAs, 55.961 hospitalizaciones y 1.351 muertes, causadas por 31 de los principales patógenos adquiridos en Estados Unidos. La mayoría (58%) de estas enfermedades fueron causadas por Norovirus, seguido de *Salmonella* spp. no tifoidea (11%), *Clostridium perfringens* (10%), y *Campylobacter* spp. (9%). Las principales causas de hospitalización fueron *Salmonella* spp. no tifoidea (35%), Norovirus (26%), *Campylobacter* spp. (15%), y *Toxoplasma gondii* (8%). Las principales causas de muerte fueron *Salmonella* spp. no tifoidea (28%), *T. gondii* (24%), *Listeria monocytogenes* (19%), y Norovirus (11%). (Scallan et al. 2011).

En Europa entre 1993-1998, 42 países informaron al Programa de Vigilancia para el Control de Enfermedades Transmitidas por los Alimentos de la OMS más de 30.000 brotes investigados, que involucraron un total de 391.383 personas. En 23.538 brotes se identificó el agente causante. *Salmonella* spp. fue el agente más frecuentemente recuperado, siendo responsable del 77,1% de ellos. En más de la tercera parte de estos se confirmó que la causa fue *Salmonella entérica* serovar Enteritidis. Otros agentes identificados en los brotes investigados incluyeron *Staphylococcus aureus* (4%), *Trichinella* (3%), *Shigella* (3%), *Clostridium perfringens* (2%), hongos tóxicos (2%), *Campylobacter* (1%), virus (1%) y otros (7%). En los 22.386 brotes investigados, en los cuales se identificó el alimento implicado, la carne y los productos cárnicos ocuparon el segundo lugar, participando en el 15% de los brotes. La manipulación incorrecta, la contaminación cruzada, procesamiento inadecuado, higiene insuficiente y reutilización de restos fueron identificados como factores de riesgo en el 14,1% de los brotes investigados. En el 12,8% de los mismos hubo además factores ambientales involucrados. En esta categoría, la contaminación por parte del personal fue el factor contribuyente más frecuentemente informado, seguido de equipos contaminados y ambientes inadecuados (OMS, 2002).

A nivel internacional se han realizado diferentes investigaciones respecto a la contaminación microbiológica de los productos cárnicos y del ambiente donde se manipulan. Un estudio realizado en la ciudad de Mekelle (Etiopía), reveló la existencia de una alta probabilidad de contaminación de la carne a partir de las superficies de contacto con la misma. Dicha investigación fue realizada en 12 carnicerías y las superficies analizadas fueron cuchillos, tablas de cortar y manos de los trabajadores. El microorganismo más frecuentemente aislado fue *E. coli* (32%), seguido de *Staphylococcus aureus* (28%), *Streptococcus* spp. (20%) y *Salmonella* spp. (20%) (Gurmu & Gebretinsae, 2013).

Otro estudio realizado con el objetivo de investigar la calidad microbiológica de la carne cruda y el estado de higiene del ambiente en los puntos de venta y plantas de faena en Karachi-Pakistán concluyó, que los patógenos encontrados podrían ser fuentes de contaminación horizontal de la carne. En este trabajo se tomaron muestras aleatorias en 30 puntos de venta del distrito sur de Karachi, realizando hisopados de superficies como cuchillos, tablas de madera y picadoras de carne, y del ambiente circundante, extrayendo un total de 340 muestras de carne y del ambiente. Los resultados de este estudio mostraron que un 84% de las muestras estaban contaminadas con bacterias, incluyendo

Klebsiella spp., *Enterobacter* spp., *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*. Del total de las bacterias aisladas el 66% eran potencialmente patógenas. Los agentes recuperados incluyeron cepas de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis y *Shigella* spp., mientras que en las muestras ambientales se detectaron cepas de *Staphylococcus aureus* y *Shigella*. Por otra parte en este estudio también se observó que las cepas recuperadas mostraron resistencia a una amplia gama de antibióticos. Los datos de este trabajo confirmaron la presencia de patógenos formadores de biofilms y con resistencia a los antibióticos en la carne cruda y su ambiente en los puntos de venta de Pakistán (Hassan et al. 2010).

Desde su identificación como patógeno para los seres humanos en 1982, STEC O157:H7 ha ocasionado una serie de brotes, especialmente en Canadá, Japón, Reino Unido y Estados Unidos (Bettelheim et al. 2003; Karmali 1989). El virotipo STEC es responsable de casos esporádicos y brotes de diarrea con y sin sangre, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH) (Paton & Paton, 1998). Se trata de un patógeno emergente transmitido por los alimentos, que presenta dosis infectivas bajas (100 bacterias por gramo de alimento pueden causar enfermedad) (Bettelheim et al. 2003; Karmali 1989). Las cepas de STEC O157 y no-O157 pueden aislarse de las heces de animales sanos (Hussein & Bollinger 2005), identificándose como principales reservorios a los rumiantes y en particular al ganado vacuno (Padola et al. 2004; Blanco et al. 2004; Gomez et al. 2002). El engorde intensivo del ganado vacuno a corral se ha señalado como uno de los factores responsables del elevado número de SUH en Argentina (más de 300 casos por año) (Amigo et al. 2015). En este tipo de sistema productivo los animales son alimentados con granos de salvado, cebada o maíz. Esto, junto al estrés del encierro, produce alteraciones en la microbiota del ganado que favorecería la eliminación de STEC O157 en mayor cantidad por períodos prolongados (Amigo et al. 2015).

En la ciudad de Berisso – Argentina, durante el período 2005 – 2010, se demostró que el 60% de los casos de diarrea aguda de origen bacteriano fueron causados por agentes transmitidos por carne bovina (Leotta et al. 2014). Esto llevó a que se realizaran varios estudios con el objetivo de establecer la calidad microbiológica de la carne picada fresca destinada al consumo minorista y determinar la presencia de *Salmonella* spp., *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC), *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* en superficies que contactan con la carne. Leotta et al. (2014) detectaron bacterias patógenas en el 73,6% de las mesadas, 60,9% de los cuchillos, 79,1% de las picadoras de carne y 72,7% de las manos de los carniceros, y observaron una correlación significativa entre la presencia de bacterias patógenas en la carne y las condiciones de sanitización insuficientes de las superficies. En otro estudio complementario, realizado en la misma ciudad, Brusa et al. (2012) investigaron la prevalencia de cepas STEC O157 y no-O157 en muestras de carne y del ambiente (mesadas de trabajo, cuchillos, picadoras de carne y manos de operarios) en 90 carnicerías. Los autores identificaron STEC O157 en el 25,5% de las muestras de carne y en el 4,4% de las muestras ambientales, y STEC no-O157 en el 52,2% y 50,5% respectivamente, lo que permitió confirmar la existencia de contaminación cruzada entre la carne y el ambiente de trabajo en las carnicerías analizadas.

En los Estados Unidos, Bosilevac et al. (2007) realizaron un estudio para conocer el estado higiénico de la carne vacuna sin hueso importada de Australia, Nueva Zelanda, Uruguay y la nacional (USA). Para la determinación del estado higiénico de la carne se realizó recuento de bacterias aeróbicas, coliformes, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. También se estableció la prevalencia de *Salmonella*, *Campylobacter* spp., *Listeria* spp., y *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC). Los resultados mostraron la existencia de diferencias microbiológicas entre la carne sin hueso importada y la producida localmente, identificándose una concentración significativamente mayor de bacterias aerobias, coliformes, *E. coli* spp. y *S. aureus* en las muestras de carne importada de Uruguay, en comparación con las muestras de carne importadas de los otros dos países. Con respecto a los patógenos analizados, *Salmonella* mostró una prevalencia menor al 1% en todas las muestras, siendo la de *Campylobacter* también muy baja y sin diferencias significativas entre los países. La prevalencia de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* fue significativamente mayor en las muestras de carne uruguaya en comparación con los otros países. La prevalencia de STEC se determinó por PCR, resultando un 30% de las muestras de USA, Australia y Uruguay positivas para los genes *stx*; a diferencia de Nueva Zelanda que el resultado fue positivo en el 10% de la muestras.

Otro agente presente comúnmente en las carnes es *S. aureus*. Este microorganismo puede ser integrante de las microbiotas nativas humanas y habitar sitios húmedos como la nasofaringe, el periné y las axilas y también puede formar parte de la microbiota fecal (Acton et al. 2009). Puede causar una variedad de cuadros clínicos que van desde infecciones de piel y tejidos blandos, hasta cuadros más severos como neumonía y osteomielitis, entre otros. También produce cuadros clínicos bien definidos debidos a la acción de exotoxinas como por ejemplo síndrome de piel escaldada (SPE), síndrome de shock toxico (SST) y toxi-infecciones alimentarias (TIAs) (Pardo et al. 2009, Scallan et al. 2011). En nuestro país y a nivel mundial, los alimentos más frecuentemente involucrados en casos de TIA por este agente son los derivados lácteos y carnes (Acuña et al. 2002). Las TIAs causadas por *S. aureus* ocurren cuando los individuos ingieren alimentos en los que desarrollo una cepa productora de enterotoxinas, excretadas durante la fase de crecimiento exponencial. La enfermedad ocurre poco después de la ingestión (período de incubación corto de 1-6 horas) y se manifiesta como un cuadro de inicio súbito con vómitos severos, diarrea, en ocasiones acompañado de fiebre. Es una entidad autolimitada que en general no dura más de 24-72 horas y el tratamiento es sintomático (Kasowsk, 2002). Las enterotoxinas involucradas más frecuentemente en casos de TIAs son la A (SEA), B (SEB) y C (SEC). Algunas de ellas como la SEB y SEC han sido asociadas a casos de síndrome de shock toxico estafilococcico (SSTE) no-menstruales. (Balaban & Rasooly, 2000; Dinges, 2000). Las TIAs por *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA, siglas en inglés) han sido documentadas ampliamente desde su emergencia (Pardo et al. 2009). En Estados Unidos, también se han reportado brotes de TIA por este microorganismo resistente (Jones et al. 2002).

El *S. aureus* resistente a la metilicina (MRSA) ha surgido como un problema de salud pública en todo el mundo (Kennedy et al. 2008). Aunque, los antimicrobianos son esenciales para tratar las infecciones causadas por bacterias, su utilización excesiva o errónea tanto en medicina veterinaria como humana se ha vinculado a la selección de

cepas resistentes, que hacen que los tratamientos de enfermedades infecciosas en los animales y en el hombre dejen de ser eficaces. Las bacterias resistentes se introducen en la cadena alimentaria a través de los animales destinados al consumo y es otra de las nuevas amenazas a que se enfrenta la medicina moderna (OMS, 2015).

S. aureus es resistente a meticilina debido principalmente a la adquisición del gen *mecA* que codifica la proteína supernumeraria PBP2a con afinidad disminuida para la mayoría de los antibióticos beta-lactámicos (Chambers, 1997). En Europa y Estados Unidos, desde hace 10-15 años aproximadamente, el número de reportes de infecciones por MRSA asociado a la comunidad (CA-MRSA por sus siglas en inglés) se ha incrementado (DeLeo & Chambers, 2009; Otter & French, 2010). La mayoría de las cepas CA-MRSA pertenecen a líneas clonales no relacionadas a MRSA asociado a la atención médica (HA-MRSA por su sigla en inglés). Adicionalmente, ha surgido un clon específico de MRSA vinculado a la producción animal, el cual fue reportado por primera vez en Holanda en el año 2003 (Vos et al. 2005; de Neeling et al. 2007). Dicho clon fue llamado MRSA asociado al ganado (LA-MRSA por sus siglas en inglés) y perteneció al secuenciotipo (ST) 398 (MRSA ST398) (Huijsdens et al. 2006). En Holanda, a fines del año 2008, el 42% de todas las cepas de MRSA identificadas en humanos pertenecieron a este clon (Verkade, 2014). En el año 2005 en Estados Unidos se reportaron 8.987 casos de infecciones invasivas por MRSA en nueve comunidades diferentes, de los cuales 1.234 (13,7%) fueron CA-MRSA, 85% fueron HA-MRSA y el 1,3% fueron infecciones no clasificadas (Klevens et al. 2007). La incidencia de MRSA en Italia se encontraba entre 30,3 y 34,4% siendo de las más altas en Europa (Vos et al. 2005). En la década del 90, Kluytmans et al. (1995) describió el primer brote de ETA causado por MRSA en el cual ocurrieron 5 muertes de un total 21 pacientes diagnosticados. Otros estudios realizados en Holanda y Canadá también han revelado un alta prevalencia (20 a 40%) de MRSA en cerdos (de Neeling et al. 2007; Khanna et al. 2008).

Una investigación realizada en EEUU mostró que MRSA, aunque en una tasa baja, está presente en carnes y por tanto en la cadena alimentaria de dicho país. El trabajo consistió en estudiar la prevalencia de *S. aureus* en 120 muestras de carne extraídas en 30 comercios de venta de comidas de 7 cadenas de supermercados en Baton Rouge, Louisiana. En el 40% de las muestras de carne examinadas se recuperó *S. aureus*, siendo el 5% de las cepas resistentes a meticilina. Los resultados de este trabajo concluyeron que en la mayoría (73%) de los comercios había carne contaminada por *S. aureus*, y el 10% correspondieron a MRSA. La alta prevalencia de *S. aureus* y el aislamiento de clones MRSA en los productos cárnicos en los puntos de venta, plantea un problema en la salud pública y representa una amenaza potencial para los consumidores y personas que manipulan alimentos (Pu et al. 2009).

Como se mencionó anteriormente, *Staphylococcus aureus* puede producir numerosas exotoxinas, dentro de las cuales se encuentra la toxina 1 responsable del Síndrome de Shock tóxico (TSST-1). Respecto a este tema, Sospedra et al. (2012) estudiaron la presencia del gen *tst* en 53 cepas de *S. aureus* aisladas de las manos de manipuladores y del ambiente de restaurantes en España. Las cepas fueron recuperadas de 908 muestras extraídas de diferentes superficies como paños de cocina, manos de los trabajadores, tablas de cortar, mesadas de acero inoxidable y feteadoras. El 5,8% de las mesadas, el

10,1% de los paños de cocina, el 6,5% de las tablas de picar, el 3,4% de las feteadoras y el 8,4% de las manos de los trabajadores se encontraron contaminadas con *S. aureus*, detectándose solamente una cepa de *S. aureus* productor de TSST-1 en las manos de un manipulador de alimentos.

Salmonella es otro patógeno transmitido por los alimentos que constituye un problema de salud pública, tanto en los países en vía de desarrollo como en los desarrollados. La salmonelosis humana pueden clasificarse en dos grandes grupos: por un lado, las debidas a serotipos estrictamente humanos (tifoideos), que causan habitualmente síndromes invasivos severos con presencia de bacterias en la sangre, y las debidas a serotipos no-tifoideos, que provocan diarrea, vómitos y fiebre y son responsables de TIAs. La duración y entidad de esta enfermedad es variable, dependiendo del estado general del huésped, pudiendo ocasionalmente causar enfermedades generalizadas. En Estados Unidos, se ha estimado que *Salmonella* causa 1,4 millones de casos de ETAs y más de 500 muertes al año (CDC, 2005). Cada año, aproximadamente 40.000 infecciones por *Salmonella* son confirmadas por cultivo, serotipificación y reportadas por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC). Se estima que el 96% de la totalidad de los casos son causados por el consumo de alimentos contaminados (Mead et al. 1999). En Europa, *Salmonella* es la segunda causa más reportada de enfermedades transmitidas por los alimentos en humanos. En el año 2012, 91.034 personas fueron infectadas con *Salmonella* (aproximadamente 22,2 personas de cada 100.000) (EFSA, 2014).

Salmonella puede colonizar el tracto gastrointestinal de los animales sin producir manifestaciones clínicas. Por lo cual, las carcasas de estos animales pueden contaminarse con *Salmonella* al momento de la faena, y de esta manera llegar al consumidor (Meyer et al. 2010). En Uruguay, la reglamentación nacional establece la ausencia de *Salmonella* spp. en carne; sin embargo es escaso el conocimiento sobre su presencia en las superficies en contacto la misma.

Upadhyaya et al. (2012) estimaron la prevalencia de *Salmonella* spp. en el ambiente de los puntos de venta de carnes de Katmandú. En este trabajo se analizaron 492 muestras (164 tablas de picar, 164 cuchillos y 164 mesadas) de 82 carnicerías. La prevalencia de *Salmonella* spp. encontrada fue de 40,2%, no detectándose diferencias significativas entre los tipos de superficies estudiadas (36,0% en las tablas, 32,9% en los cuchillos y 25% en las mesadas). En este estudio se identificaron como factores asociados a la contaminación por *Salmonella* spp. al estado higiénico de las carnicerías, el tipo de carnicería, la cantidad de manipuladores, la cantidad de cuchillos en uso y los diferentes tipos de carnes a la venta.

Otro trabajo realizado por Arslan and Eyi (2010) en Bolu (Turquía) estudió la ocurrencia de *Salmonella* spp. en los productos cárnicos en los puntos de venta y la susceptibilidad de las cepas a ciertos agentes antimicrobianos. En este trabajo, se analizaron 225 muestras de productos cárnicos (carne de ave, carne de vacuno y carne vacuna picada) extraídos en 8 puntos de venta. Los resultados mostraron que en el 22,2% de las muestras se recuperó *Salmonella*. Dicho patógeno fue detectado en el 29,3% de las muestras de carne de ave, en el 21,3% de las muestras de carne picada y en el 16% de las

muestras de carne vacuna. Asimismo, las cepas aisladas fueron examinadas respecto a los patrones de resistencia antimicrobianos. De las 50 cepas de *Salmonella* aisladas, el 62% mostró un perfil de resistencia a 3 o más agentes antimicrobianos.

A nivel regional, Leotta et al. (2014) realizaron un estudio con el objetivo de aislar y caracterizar *Salmonella* spp. a partir de carne bovina molida y muestras ambientales obtenidas en carnicerías de Berisso (Argentina). Para este trabajo se tomaron 110 muestras de carne molida y 432 esponjados de mesadas, cuchillos, picadoras y manos de manipuladores de 110 carnicerías. *Salmonella* spp. fue aislada de 49 muestras, 15 (13,6%) de carne y 34 (7,9%) de ambiente, entre las cuales se incluyeron 10 (9,3%) mesadas, 7 (6,5%) cuchillos, 14 (13,0%) picadoras y 3 (2,8%) de manos de carniceros.

En Uruguay existe poca información disponible respecto a las ETAs. Desde 1995, año en que se implementó el programa V.E.T.A (vigilancia de las enfermedades transmitidas por alimentos), se ha constatado un aumento en el número de brotes denunciados. El Departamento de Vigilancia Epidemiológica del Ministerio de Salud Pública estudió cinco brotes en el año 1995 y cuarenta y un brotes en el año 1999, constatándose en dicho lapso un predominio de brotes de origen bacteriano, siendo *Salmonella* spp. el agente más frecuentemente aislado. *Salmonella* entérica serovar Enteritidis ha desplazado a *Salmonella* Typhimurium como causa más frecuente de infección esporádica o de brotes de enfermedad de origen alimentario. *S.* Enteritidis se aisló esporádicamente hasta 1994 en seres humanos, animales y alimentos, pero en el año 1995 se confirmó el primer brote de dimensiones considerable que afectó a un importante número de personas, distribuidas en una amplia área geográfica. A partir de este suceso este agente comenzó a aislarse con mayor frecuencia. En 1996, *S.* Enteritidis representó el 10% de las cepas recibidas en el laboratorio del Centro Nacional de *Salmonella*, pasando a ser en 1997 el serotipo más frecuente, hasta situarse durante el año 2000, en el 79,6% del total de cepas estudiadas (Acuña et al. 2002).

En el año 2000, en Uruguay se tipificaron 239 cepas, 163 *S.* Enteritidis, 34 *S.* Typhimurium y 42 pertenecientes a otros serotipos, mostrando ese año un claro predominio de estos serotipos como agentes de enfermedad en el hombre. De un total de 178 cepas aisladas de muestras humanas 152 fueron *S.* Enteritidis y 26 *S.* Typhimurium, siendo Enteritidis el serotipo más frecuente con un porcentaje de aislamientos muy elevado (85%). Actualmente, la mayoría de las cepas estudiadas en el Centro Nacional de *Salmonella* corresponden a *S.* Typhimurium.¹

Asimismo, en el año 2011, en Uruguay se notificaron 39 brotes de ETA afectando un total de 295 personas. En el 53% del total de los brotes estudiados se identificó *Salmonella* como agente causal y en el 4% se identificó Norovirus, no lográndose identificar el agente en el 43% de los casos restantes (MSP, 2011).

¹ Información no publicada cedida por el Dr. Gustavo Varela del Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene de la Facultad de Medicina, Universidad de la República.

Por otra parte, en Uruguay, durante el período 1993-2001 fueron declarados 12 brotes de intoxicación estafilocócica, con un total de 164 afectados sin fallecimientos, según datos recogidos del Sistema de Información Regional para la Vigilancia Epidemiológica de las ETA. En 9 brotes se identificaron lácteos como alimento responsable, siendo carnes rojas y aves los implicados en los 3 restantes (Acuña et al. 2002).

En los últimos 10 años se estudiaron en el Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene 43 muestras de materia fecal obtenidas de niños con diagnóstico de SUH. En 7 de los 30 niños en los que hubo crecimiento se recuperaron 8 cepas de STEC. Uno de estos niños presentó co-infección por 2 serogrupos STEC diferentes, O26 y O145. Un aislamiento no fue serotipificado y fue productor de *stx2*; solo una de las 7 cepas restantes fue de serotipo O157:H7 (*stx2/stx2vh-a; eaeγ1*). De las otras 6, una fue de serotipo O111:HNM (*stx1/2; eaeγ2*); dos fueron O145:HNT (*stx2; eaeβ2*) y tres fueron de serogrupo O26; dos O26:H11 *stx1, eae β* y *β1* respectivamente; una O26:HNM (*stx 1/ 2; eae β1*). Todas las cepas STEC poseían los genes *eae* (intimina) y *ehxA* (Entero-hemolisina) asociados con la virulencia y fueron sensibles a todos los antimicrobianos ensayados.²

Teniendo en cuenta los datos presentados y la poca información existente a nivel nacional, se consideró de importancia para el Uruguay como país productor y consumidor de carnes, contar con datos actuales respecto a los niveles de contaminación microbiológicos y presencia de patógenos bacterianos reconocidos existentes en las carnicerías.

² Información no publicada cedida por el Dr. Gustavo Varela del Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene de la Facultad de Medicina, Universidad de la República.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

Cada vez más las Enfermedades Transmitidas por Alimentos, se presentan como un desafío, sobre todo para países como Uruguay con marcada vocación productora y exportadora de alimentos. En Uruguay, como ya se mencionó, se observa una tendencia en aumento en la incidencia de los brotes de E.T.A. desde el año 1993. El factor identificado con mayor frecuencia fue la materia prima contaminada y solamente en los brotes en los que el agente causal fue *S. aureus*, se identificó al hombre como fuente probable de infección (Acuña et al. 2002).

En Uruguay el consumo de carnes sin industrializar ocupa el lugar más destacado dentro de la canasta del consumidor, siendo el principal y más tradicional aporte proteico de la misma, con una ingesta per cápita de 98,6 kg por habitante por año (INAC, 2015).

La contaminación de la carne puede ocurrir en diferentes etapas a lo largo de la cadena alimentaria (producción, procesamiento, distribución, comercialización, etc.). Las malas prácticas de higiene en las plantas de faena y el manejo inadecuado de la carne en etapas posteriores se encuentran asociados con la presencia de agentes patógenos en la carne y en los equipos (Abdullahi et al. 2006). Esta contaminación puede incrementarse en los puntos de venta cuando la carne toma contacto con los equipos (como tablas, balanzas, cuchillos, ganchos, etc.), el personal y los consumidores, constituyendo un riesgo potencial para la salud.

Por estos motivos y dada la importancia que reviste el consumo de carnes en el Uruguay es de vital importancia contar con información respecto a la situación actual de los niveles de contaminación microbiológica ambiental existente en las carnicerías. Este trabajo tuvo como objetivo determinar la prevalencia de la contaminación microbiológica ambiental presente en las superficies que se encuentran habitualmente en contacto directo o indirecto con los productos cárnicos, en las carnicerías del Departamento de Montevideo.

Considerando que Uruguay dispone de poca información sobre la contaminación ambiental existente en los puntos de venta de productos cárnicos, este estudio se enfocó en la identificación de algunos microorganismos indicadores y patógenos presentes en la carne y manipuladores de alimentos (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp.); limitando el estudio al departamento de Montevideo donde reside el 41% de la población nacional y donde se cuenta con el mayor caudal de datos.

Los microorganismos seleccionados fueron: *Staphylococcus aureus* como indicador de contaminación por manipulación humana y *Escherichia coli* como indicador potencial de contaminación fecal. También se buscó *Salmonella* spp. por ser el microorganismo más frecuentemente recuperado en brotes de ETA, y *Escherichia coli* productora de toxina shiga (STEC) por su baja dosis infectiva y por la severidad de los cuadros que produce. En las cepas de *S. aureus* además se buscó el gen *mecA*, de manera de evaluar el rol de la carne en la difusión de cepas resistentes y de los genes responsables.

5.1 Objetivo general

El objetivo general de esta investigación fue determinar la contaminación microbiológica presente en las superficies en contacto con los productos cárnicos e identificar los factores asociados a la misma en las carnicerías del departamento de Montevideo-Uruguay.

5.2 Objetivos específicos

1. Determinar la prevalencia de *E. coli*, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus* en las superficies que se encuentran habitualmente en contacto directo o indirecto con los productos cárnicos en las carnicerías del Departamento de Montevideo.
2. Identificar potenciales factores de riesgo asociados a la presencia de dichos agentes.
3. Verificar la aplicación de las prácticas necesarias para disminuir la contaminación ambiental y asegurar la inocuidad y calidad de los productos cárnicos.

6. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

Se realizó un estudio de las carnicerías de forma de establecer la prevalencia de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en las superficies que se encuentran habitualmente en contacto con los productos cárnicos.

Debido a que el 41% de la población nacional reside en el Departamento de Montevideo y que su estructura respecto al inventario de carnicerías (incluyendo su localización y caracterización) es bien conocida, el presente estudio se enfocó en este departamento.

Para la realización del muestreo las carnicerías se agruparon según su nivel socio-económico en tres áreas establecidas por el Instituto Nacional de Estadística (INE).

La extracción de las muestras ambientales se enfocó en cuatro tipos de superficies: mesadas de trabajo, tablas de cortar, mangos de cuchillos y picadoras de carne. Para esto se contó con la colaboración del Instituto Nacional de Carnes (INAC) quien aportó los recursos necesarios para la obtención de las mismas. Las muestras fueron procesadas en el Departamento de Bacteriología y Virología de la Facultad de Medicina de la Universidad de la República.

En cada visita se realizó una encuesta epidemiológica para identificar los diferentes factores asociados con los niveles de contaminación detectados.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Muestreo

7.1.1 Marco de muestreo. Como fuente de información para los diferentes cálculos se utilizó la base de datos oficial de las carnicerías de Montevideo, la cual pertenece al Instituto Nacional de Carnes (INAC). Al momento de la estimación del tamaño de muestra (2011), el departamento de Montevideo contaba con un total de 653 carnicerías habilitadas y en funcionamiento.

7.1.2 Tamaño de muestra. Debido a que los niveles de contaminación de las diferentes superficies en las carnicerías eran desconocidos, el tamaño de muestra fue determinado asumiendo el peor escenario que se corresponde con un porcentaje del 50% de establecimientos con alguna contaminación ambiental y que la proporción se estimaría con un error máximo de 12% para un nivel de confianza del 95%. Basado en estos supuestos se determinó un “ n_i ” de 67 que luego de ser ajustado para una población finita da un tamaño de muestra de 61 establecimientos decidiéndose tomar una muestra de 63 carnicerías.

7.1.3 Selección de carnicerías. Las carnicerías fueron estratificadas en tres áreas geográficas (AG) según el nivel socio-económico de la población residente en las mismas, definidas éstas por el Instituto Nacional de Estadísticas (INE). Las áreas geográficas fueron denominadas como: AG1, corresponde al nivel socio-económico alto y medio alto; AG2, corresponde al nivel socio-económico medio y AG3 corresponde al nivel socio-económico medio bajo y bajo (Costas G. y Herrera V, 2008) (Figura 1). La muestra se trató de distribuir en las tres áreas en forma igualitaria como estrategia para obtener estimaciones con errores potencialmente similares a un mismo nivel de confianza, para cada área geográfica.

Una vez estratificadas las carnicerías fueron seleccionadas en forma aleatoria dentro de cada estrato (los números aleatorios fueron generados a través del software Intercooled Stata).

Debido a un error de clasificación se muestrearon 3 carnicerías de la Seccional Policial 15 como parte del AG3 cuando en realidad pertenecían a al AG2. Esta situación determinó que se seleccionaran aleatoriamente 3 nuevas carnicerías en el AG3, para cumplir con el objetivo de un mínimo de 21 carnicerías por área geográfica. De esta forma la muestra incluyó 21 carnicerías en las zonas AG1 y AG3, y 24 en la restante (AG2).

7.1.4 Procedimiento de muestreo. Los establecimientos seleccionados se visitaron entre los meses de diciembre 2012 y junio 2013. En todas las carnicerías se tomaron muestras de cuatro tipos de superficies que se encuentran habitualmente en contacto directo o indirecto con los productos cárnicos y con las manos de los manipuladores: mesadas de trabajo, tablas, mangos de cuchillos y picadoras de carne. Las mismas fueron recogidas siempre por la misma persona (P.C.L) utilizando guantes estériles descartables entre

superficies. Para cada muestra se utilizó, un hisopo de algodón estéril previamente humedecido en suero fisiológico estéril. Los hisopos fueron rotados de 10 a 15 veces sobre cada superficie a ser muestreada (Hoet et al. 2011).

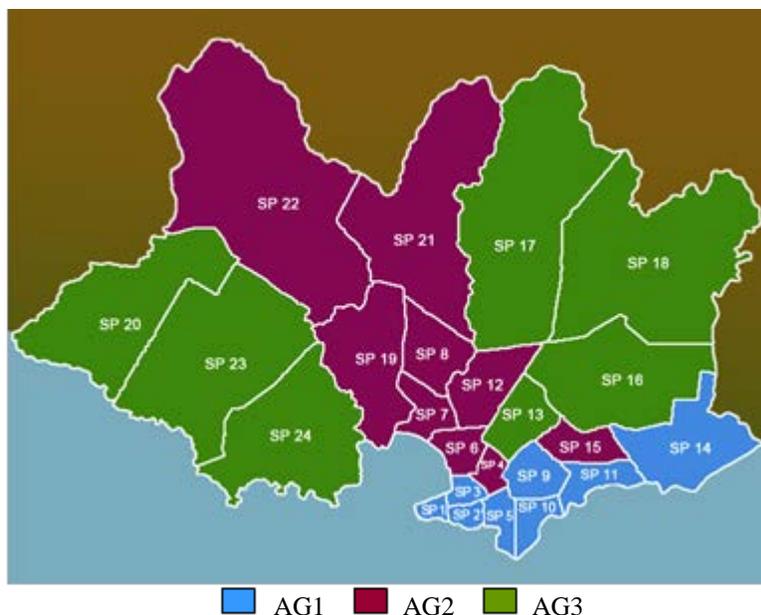


Figura 1. Seccionales Policiales (SP) que componen las tres áreas socioeconómicas del departamento de Montevideo. AG1: área socio-económica alta y media-alta; AG2: área socio-económica media; AG3: área socio-económica media-baja y baja.³

Para el caso de las mesadas y tablas de trabajo, las muestras se tomaron utilizando un hisopo por cada medio metro cuadrado de superficie. Para el caso de los mangos de cuchillos, las muestras se tomaron de la totalidad de la superficie, utilizando un hisopo por mango. Para el caso de las picadoras de carne las muestras se tomaron de la totalidad de la superficie de salida de la carne picada, utilizando un hisopo por cada equipo presente en cada carnicería.

Las muestras extraídas en cada carnicería se agruparon en “pooles” por tipo de superficie. Asimismo, cada tipo de superficie se analizó en forma individual por carnicería.

Los hisopos fueron colocados en 10 ml de caldo digerido tróptico de soja (TSB) para la recuperación de *E. coli* y *S. aureus* y en 10 ml de caldo Tetratonato (TT) con el agregado de 0,2 ml de una solución de ioduro de potasio (0,3 gramos/ml) y cristales de yodo (0,25 gramos/ml) para la detección de *Salmonella* spp. Los tubos inoculados de esa forma fueron transportados rápidamente al laboratorio a temperatura ambiente y se procesaron según se describe a continuación.

³ Fuente: INAC, Serie Técnica N°45, Mayo 2008.

7.2 Estudio microbiológico. Aislamiento e identificación de microorganismos

7.2.1 *Staphylococcus aureus*

La técnica utilizada para la detección de *S. aureus* fue la descrita por Hoet et al. 2011 modificada como se describe a continuación. Los tubos con caldo TSB inoculados se incubaron a 37° C y en aerobiosis por 18 a 24 hs. Luego se realizaron re-aislamientos en placas de agar Baird-Parker (Difco) suplementadas con el agregado de yema de huevo y telurito de potasio (Difco) que se incubaron por 24 hrs en aerobiosis a 37° C. Se analizaron hasta 3 colonias sospechosas de *S. aureus* por placa (colonias convexas, brillantes, de tamaño mediano con centro negro, borde irregular y doble halo concéntrico; el interno opalescente debido a la acción de lecitinasas y el externo traslúcido producido por lipasas; figura 2). A cada una de estas colonias se le realizó: prueba de catalasa, tinción de Gram y observación al microscopio, test de coagulasa en lámina (“clumping factor”) con plasma citratado de conejo y determinación de la actividad DNasa en placas de agar ADN con verde de metilo (Pardo et al. 2013).

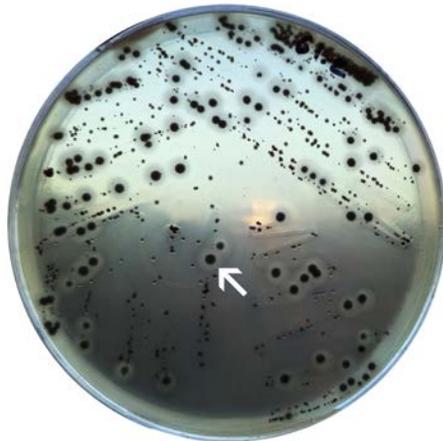


Figura 2. Morfología típica de las colonias sospechosas de *S. aureus* en agar Bird Parker suplementado con yema de huevo y telurito de potasio.

Las cepas de *S. aureus* recuperadas fueron conservadas por siembra en profundidad en tubos con cierre hermético conteniendo medio de cultivo semisólido (agar nutritivo 11,5 gramos por litro y caldo nutritivo [Difco] 4,0 gramos por litro) y protegidas de la luz para realizar posteriormente la detección por PCR del gen de virulencia que codifica para la toxina del Síndrome de Shock Tóxico 1 (TSST-1) y para el gen *mecA* responsable de la resistencia a meticilina. Para la detección de dichos genes se seleccionó al azar una colonia por superficie cuando las 2 o 3 de las recuperadas correspondieron a *S. aureus*.

7.2.1.1 Reacción en cadena polimerasa (PCR)

La extracción del ADN se realizó según el protocolo interno utilizado por el laboratorio de Medicina Veterinaria Preventiva de la Universidad Estatal de Ohio según se describe a continuación.

En una cabina libre de ADN, se colocaron 95 µl de agua ultrapura (milli-Q®) en tubos estériles de 1,5 ml para microcentrifuga previamente rotulados con el número de muestra correspondiente y se agregaron 5 µl de una solución de Achromopeptidasa (Sigma-Aldrich® St. Louis, MO) a una concentración de 10U/µl. En otro sector del laboratorio, utilizando un ansa estéril se transfirieron 2 o 3 colonias de *S. aureus* a cada tubo, se colocaron en un baño termostatizado a 50° C y se incubaron durante 10 minutos. Luego los tubos se colocaron en un termo-bloque, se mantuvieron a 94° durante 10 minutos y se centrifugaron a 13.500 rpm por 5 minutos. El sobrenadante (80-90 µl) se transfirió a microtubos estériles nuevos previamente rotulados y se conservaron a una temperatura de -20° C hasta su procesamiento por PCR.

Cuatro µL de cada sobrenadante se usaron como molde en las reacciones de amplificación. Para la técnica de PCR múltiple se utilizó la mezcla comercial de enzima y nucleótidos (illustra™ pureTaq Ready-To-Go PCR Beads, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) con el agregado de Cl₂Mg para obtener una concentración final de 3.5 mM en un volumen final de 25 µL.

En cada reacción se utilizaron 3 pares de cebadores para la amplificación de sectores correspondientes a los siguientes genes: 16s, *tst* y *mecA* (Cuadro 1). El gen que codifica para la subunidad 16s del ARNr se utilizó como control interno de la reacción de amplificación. La concentración final de cada uno de los cebadores fue de 0,2 µM (Pardo et al. 2009).

Cuadro 1. Cebadores utilizados para el estudio de las cepas de *S. aureus*.

Gen	Cebador	Secuencia nucleotídica 5´-3´	Temperatura de annealing	Tamaño del amplicon
16s	Staph750R	CCACCTTCCTCCGGTTTGTCACC	54°C	756 pb
	Staph756F	AACTCTGTTATTAGGGAAGAACA		
<i>tst</i>	TSST-1 R	TACTAATGAATTTTTTTATCGTA AGCCCTT	54°C	179 pb
	TSST-1 F	TTCACTATTTGTAAAAGTGTCAG ACCCACT		
<i>mecA</i>	<i>mecA</i> 1	GTAGAAATGACTGAACGTCCGAT AA	54°C	310 pb
	<i>mecA</i> 2	CCAATTCCACATTGTTTCGGTCT AA		

El programa de PCR utilizado fue el siguiente: un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 5 minutos; seguido por pasos de: 95° C por 1 minuto, 54° C por 1 minuto, 72° C por 1 minuto, estos 3 se repitieron en ese orden por 35 ciclos; y luego un paso de

extensión final a 72° C por 10 min. La reacción fue realizada en un termociclador Gene Amp® PCR System 2700 Applied Biosystem.

Se utilizaron las siguientes cepas control: ATCC 25923 (16s positiva, *tst* y *mecA* negativa), IH36 resistente a meticilina portadora del gen *mecA* y la cepa productora de TSST-1⁴ (confirmada en el “Center for Disease Control and Prevention”; CDC, Atlanta, EUA).

Las muestras fueron corridas en geles de agarosa al 2% en TBE 0,5X por la técnica de electroforesis sumergida, teñidos en una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml), observados y fotografiados bajo luz ultravioleta.

7.2.2 *Escherichia coli*

Para la recuperación de *E. coli* se utilizó la técnica descrita por Mollenkopf et al. (2011). Los tubos con TSB se incubaron a 37° C en aerobiosis por 24 hs. Luego con ansa, una alícuota fue sembrada en placas de agar Mac Conkey e incubadas por 24 hrs a 37° C. Por cada placa se analizaron hasta 3 colonias sospechosas de *E. coli* (lactosa positivas, centro rosado intenso). La identificación inicial se realizó utilizando las siguientes pruebas bioquímicas: producción de indol, decarboxilación de la ornitina y utilización de citrato. Las mismas se incubaron por 24-48 hrs en estufa a 37° C.

Las cepas de *E. coli* recuperadas (indol positivas, citrato negativas, ornitina variable) fueron conservadas sembradas en profundidad, en tubos con cierre herméticos conteniendo medio de cultivo semisólido y protegidas de la luz para realizar posteriormente la detección por PCR de los genes que codifica para la toxina Shiga tipo 1 y 2. Para la detección de dichos genes se seleccionó al azar una colonia por superficie cuando 2 o las 3 correspondieron a *E. coli*.

7.2.2.1 Reacción de cadena en polimerasa (PCR)

La extracción del ADN se realizó según protocolo utilizado por el laboratorio de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene de la Facultad de Medicina de la Universidad de la República. Tres o 4 colonias de *E. coli* se resuspendieron en 150 µl de agua ultrapura Milli-Q, se calentaron a 100° C durante 10 minutos, se enfriaron a 4-5° C durante 10 minutos y luego se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se conservó a -20° C hasta su procesamiento (Varela et al. 2008).

Cuatro µL de cada sobrenadante se usaron como molde en las reacciones de amplificación. Para la técnica de PCR múltiple se utilizó la mezcla comercial (illustra™ pureTaq Ready-To-Go PCR Beads, GE Healthcare, Buckinghamshire,

⁴ Cepa control cedida gentilmente por la Dra. Teresa Camou del laboratorio central del Ministerio Salud Pública

Reino Unido), con el agregado de Cl_2Mg para obtener una concentración final de 3,5 mM en un volumen final de 25 μL .

En cada reacción se utilizaron 3 pares de primers para la amplificación de sectores correspondientes a los siguientes genes: 16s, *stx1* y 2 (Cuadro 2). Las concentraciones finales utilizadas fueron 0,6 μM , 4,0 μM y 1,0 μM respectivamente (Varela et al. 2008).

Cuadro 2. Cebadores utilizados para el estudio de las cepas de *E. coli*.

Gen	Cebadores	Secuencia nucleotídica (5`-3`)	Temperatura de annealing	Tamaño del amplicón
16s	<i>E. coli</i> R	ACCGCTGGCAACAAAGGATA	54°C	401 pb
	<i>E. coli</i> F	CCCCCTGGACGAAGACTGAC		
<i>stx1</i>	STX1 R	AGCGATGCAGCTATTAATAA	54°C	130 pb
	STX1 F	GAAGAGTCCGTGGGATTAGG		
<i>stx2</i>	STX2 R	GCTCTGGATGCATCTCTGGT	54°C	349 pb
	STX2 F	TTAACCAACAACCCACCGGGCAGT		

El programa de PCR utilizado fue el siguiente: un paso de desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos; seguido de: 95° C por 1 minuto, 54° C por 1 minuto, 72° C por 1 minuto, estos 3 por 35 ciclos; y luego una extensión final a 72° C por 10 min. La reacción se realizó en un termociclador Gene Amp PCR System 2700 Applied Biosystem.

Las cepas control utilizadas fueron ATCC 25922 (*stx1/2* negativa) y *E. coli* O157:H7 cepa IH 23 portadora de los genes *stx1* y 2.

Las muestras fueron corridas en geles de agarosa al 2% por la técnica de electroforesis sumergida, luego teñidos en una solución de bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), observados y fotografiados bajo luz ultravioleta.

7.2.3 *Salmonella* spp.

Para la recuperación de *Salmonella* spp. se utilizó la técnica descrita por Mollenkopf et al. (2011). Los tubos con caldo Tetrionato inoculados fueron incubados en estufa a 42°C por 24 hs. Un ml fue sembrado en 10 ml de caldo Rappaport-Vassilliadis e incubados en estufa a 42° C por 24-48 hrs. Luego tomando con ansa una alícuota de cada tubo con Rappaport-Vassilliadis fue sembrado en placas de agar *Salmonella-Shigella* (SS) e incubado por 24 hrs a 37°C. Las colonias sospechosas de *Salmonella* (colonias lactosa negativas con centro negro; ver figura 3) se estudiaron utilizando las siguientes pruebas bioquímicas: producción de indol, decarboxilación de la ornitina y de la lisina, utilización de citrato, producción de ácido fenil-pirúvico a partir de fenilalanina;

producción de gas sulfhídrico y utilización de lactosa y sacarosa, producción de CO₂ en tubos de agar triple azúcar hierro (TSI). Las cepas sospechosas fueron remitidas al Centro Nacional de *Salmonella* para su estudio posterior.



Figura 3. Morfología típica de colonias sospechosas de *Salmonella* spp en agar *Salmonella-Shigella*.

La cepa control utilizada⁵ fue *Salmonella* Enterica subsp. enteritica serovar Enteritidis del Laboratorio de *Salmonella* del Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene de la Facultad de Medicina de la Universidad de la República.

7.3 Encuesta epidemiológica

Se realizó un estudio epidemiológico para identificar algunos potenciales factores de riesgo asociados con los niveles de contaminación y verificar las buenas prácticas utilizadas. Para esto, en cada una de las visitas se realizó una encuesta que incluyó información respecto al tipo de carnicería (tradicional o supermercado), volumen de venta, antigüedad de las instalaciones y su estado de mantenimiento, cantidad y competencia del personal, estado de los equipos, variedad de productos que comercializa, manejo de los productos, higiene de las instalaciones, frecuencia de limpieza y desinfección, mantenimiento de la cadena de frío, entre otros (Anexo I – Encuesta Epidemiológica).

7.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó de acuerdo al diseño (muestreo estratificado con asignación de la muestra en forma no proporcional) y se utilizaron las rutinas de muestreo complejo de Stata (StataCorp. 2015. Stata Survey Data Reference Manual: Release 14. College Station, TX: StataCorp LP. ISBN-13: 978-1-59718-167-9, Skinner C.J., 1989), determinándose las prevalencias con sus intervalos de confianza del 95% considerando en el análisis el peso de los estratos en función de la probabilidad de selección de cada carnicería. Asimismo, para evaluar la existencia de asociación entre

⁵ Cepa control cedida por la Sra. Gladys González del Laboratorio de *Salmonella* del Departamento de Bacteriología y Virología

las variables estudiadas y analizar diferencias entre frecuencias se realizó la prueba de chi cuadrado de Pearson. El chi cuadrado de Person fue corregido por el diseño del muestreo con la corrección de segundo orden de Rao & Scott (1984) y convertido al estadístico F.

8. RESULTADOS

8.1 Consideraciones generales

Se estudiaron 66 carnicerías ubicadas en el Departamento de Montevideo, 21 pertenecientes al área socio-económica alta y media-alta (AG1), 24 al área socio-económica media (AG2) y 21 al área socio-económica media-baja y baja (AG3). En cada carnicería se estudiaron 4 superficies: mesadas de trabajo, tablas de cortar, mangos de cuchillos y picadoras de carne, procesándose un total de 264 muestras (cada una compuesta por un “pool” de muestras del mismo tipo de superficie pertenecientes a la misma carnicería). Para todas las superficies se analizó individualmente la presencia de *S. aureus*, *E. coli* y *Salmonella* spp.

Las carnicerías fueron consideradas positivas cuando se demostró la presencia al menos una superficie contaminada con alguno de los agentes estudiados. En función de la muestra se estimó que el 86,88% (58/66) de las carnicerías de Montevideo tendrían contaminación microbiológica. En este sentido, el 65,07% (44/66) de las carnicerías tendría *S. aureus*, recuperándose un total de 146 cepas de 79 superficies; y el 74,86% (50/66) *E. coli*, recuperándose un total de 298 cepas en 143 superficies. En ninguno de los establecimientos estudiados se logró recuperar *Salmonella* spp. (Cuadro III).

Cuadro III. Porcentaje estimado y límites de confianza del 95% de carnicerías con presencia de *S. aureus* y *E. coli* en el Departamento de Montevideo.

	Resultado % (n)	IC 95%	
<i>S. aureus</i>	65,07 (44)	52,99	75,47
<i>E. coli</i>	74,86 (50)	62,63	84,11
Total	86,88 (58)	76,03	93,25

Nota: “n” corresponde a la cantidad de carnicerías positivas a los microorganismos estudiados en las 66 carnicerías investigadas. El “n” total corresponde a la cantidad de carnicerías con presencia de al menos uno de los agentes estudiados.

En relación a los diferentes tipos de superficies analizadas, se consideró positiva una superficie cuando se logró recuperar de la misma al menos una cepa del microorganismo buscado. Los resultados mostraron diferencias significativas ($p=0,003$) a favor de la presencia de *S. aureus* en los mangos de los cuchillos respecto al resto de las superficies. No se detectaron diferencias significativas en los distintos tipos de superficies en relación a la presencia de *E. coli* (Cuadro IV).

Cuadro IV. Porcentaje estimado de *S. aureus* y *E. coli* según los diferentes tipos de superficies analizadas.

	Presencia <i>S. aureus</i> % (n)	Presencia <i>E. coli</i> % (n)
Mesadas	26,07 (18)	53,46 (36)
Tablas	32,34 (22)	61,10 (41)
Mangos de cuchillos	42,47 (29)*	52,76 (35)
Picadora de carne	14,06 (10)	45,50 (31)

Nota: “n” corresponde a la cantidad de superficies positivas a los microorganismos estudiados en las 66 carnicerías investigadas.

*Indica diferencia estadísticamente significativa

La información general obtenida en la encuesta epidemiológica en cada carnicería visitada se resume en la Cuadro V.

Cuadro V. Descripción de las carnicerías encuestadas según el área socio-económica donde se encontraban ubicadas.

	Tradicional			Supermercado		
	AG1	AG2	AG3	AG1	AG2	AG3
Distribución de la muestra/estratos % (n)	71,43 (15)	91,67 (22)	76,19 (16)	28,57 (6)	8,33 (2)	23,81 (5)
Mediana del Número de clientes/día	60	80	110	ne	ne	ne
Mediana venta carne kg/mes	4.000	4.000	5.500	ne	ne	ne
N° personal promedio	4	3	3	7,5	13	6
Porcentaje de personal con más de 1 año de experiencia % (n)	86,67 (13)	100 (22)	100 (16)	100 (6)	100 (2)	100 (5)

Nota: AG1 = área socio-económica alta y media alta; AG2 = área socio-económica media; AG3 = área socio-económica media baja y baja; n= cantidad de carnicerías en la muestra; ne = No estimada.

8.2 Resultados según agente bacteriano

8.2.1 *Staphylococcus aureus*

Si consideramos el nivel socio-económico y analizamos las carnicerías según el área geográfica donde se encontraban ubicadas, observamos que el porcentaje que mostró contaminación por *S. aureus* en el AG1 fue de 71,43% (48,18% - 87,05%), en el AG2 45,83% (26,83% - 66,13%) y en el AG3 fue de 85,71% (62,59 - 95,56%). El test estadístico utilizado, mostró diferencias significativas entre dichas zonas ($p = 0.0205$).

Si analizamos la cantidad de superficies contaminadas por *S. aureus* en las carnicerías en función del área socio-económica, observamos que el 19,05% de las ubicadas en el AG3 presentaron los 4 tipos de superficies contaminadas mientras que las pertenecientes a AG1 y AG2 presentaron el 0 % y el 4,17 %, respectivamente (Cuadro VI).

Cuando analizamos las carnicerías que no tuvieron ninguna superficie contaminada vemos que las ubicadas en las áreas AG1 y AG2 mostraron un porcentaje de 28,57% y 54,17%, respectivamente; en cambio las ubicadas en AG3 mostraron un 14,29% (Cuadro VI). La prueba de chi cuadrado ajustada por el diseño mostró diferencias significativas ($p= 0,0342$) en la cantidad de superficies contaminadas entre las diferentes área socio-económicas.

Cuadro VI. Distribución del número de superficies contaminadas con *S. aureus* según el área socio-económica donde se encontraban ubicadas las carnicerías.

AG	Número de superficies contaminadas con <i>S. aureus</i>					Total % (n)
	0 % (n)	1 % (n)	2 % (n)	3 % (n)	4 % (n)	
AG1	28,57 (6)	38,10 (8)	28,57 (6)	4,76 (1)	0 (0)	100 (21)
AG2	54,17 (13)	33,33 (8)	8,33 (2)	0 (0)	4,17 (1)	100 (24)
AG3	14,29 (3)	28,57 (6)	28,57 (6)	9,52 (2)	19,05 (4)	100 (21)
Total	34,93 (22)	33,48 (22)	20,36 (14)	4,17 (3)	7,06 (5)	100 (66)

Nota: AG1 = área socio-económica alta y media alta; AG2 = área socio-económica media; AG3 = área socio-económica media baja y baja y n = cantidad de superficies positivas a *S. aureus*.

Teniendo en cuenta que las carnicerías del AG1 y AG2 presentaron similitudes en cuanto a la mediana (percentil 50) de kilogramos de carne que venden por mes y el número de clientes (Cuadro V); las mismas fueron agrupadas (AG1-2) con el objetivo de darle mayor poder a las pruebas de hipótesis y mejorar los valores estimados. En este caso, el 43,03% (29,35% - 57,87%) de las carnicerías ubicadas en AG1-2 fueron negativas a *S. aureus* en contraste con las ubicadas en el AG3 que presentaron el 14,29% (4,42% - 37,41%), mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p=0,0271$) entre los dos grupos. Además, el 19,05% (7,01% - 42,34%) de las carnicerías ubicadas en el AG3 presentaron las 4 superficies contaminadas, mientras que las carnicerías del AG1-2 presentaron el 2,35% (0,31% - 15,73%). La prueba de chi cuadrado ajustada por el diseño mostró diferencias significativas ($p=0,0252$) entre las áreas geográficas, las carnicerías ubicadas en el AG3 presentaron mayor probabilidad de tener una alta contaminación con las 4 superficies positivas en comparación con las del AG1-2 (Cuadro VII y Figura 4).

Cuadro VII. Comparación de la cantidad de superficies contaminadas con *S. aureus* por carnicería según el área socio-económica tomando AG1 y AG2 como un solo estrato.

Frecuencia de superficies contaminadas con <i>S. aureus</i>						
AG	0 % (n)	1 % (n)	2 % (n)	3 % (n)	4 % (n)	Total % (n)
AG1-2	43,03 (19)	35,40 (16)	17,14 (8)	2,07 (1)	2,35 (1)	100 (45)
AG3	14,29 (3)	28,57 (6)	28,57 (6)	9,52 (2)	19,05 (4)	100 (21)
Total	34,93 (22)	33,48 (22)	20,36 (14)	4,17 (3)	7,06 (5)	100 (66)

Nota: AG1-2 = área socio-económica alta, media alta y media; AG3 = área socio-económica media baja y baja; n = cantidad de superficies positivas a *S. aureus*.

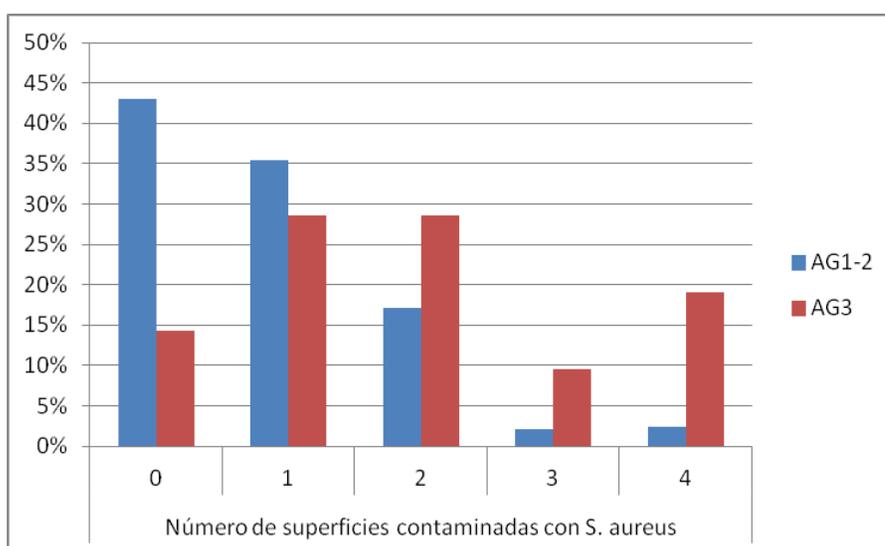


Figura 4. Porcentaje de superficies contaminadas con *S. aureus* por carnicería según el área socio-económico considerando AG1 y AG2 como un solo grupo. AG1 y AG2 = área socio-económica alta, media alta y media; AG3 = área socio-económica media baja y baja.

Si analizamos los diferentes tipos de superficies examinadas según el área socio-económico donde estaban ubicadas las carnicerías observamos que las del AG3 presentaron una proporción mayor de contaminación por *S. aureus* en todos los tipos de superficies, mostrando diferencias estadísticamente significativas en los mangos de los cuchillos ($p=0,0487$) y picadoras de carne ($p= 0,0237$) (Cuadro IIX).

Cuadro IIX. Porcentaje estimado de carnicerías con presencia de *S. aureus* y límites de confianza del 95% por área socio-económica según el tipo de superficie analizada y nivel de significación entre estratos (p).

Superficies	AG1		AG2		AG3		p /entre estratos
	%	IC95%	%	IC95%	%	IC95%	
Mesadas	28,57	12,95-51,82	12,50	3,89-33,49	42,86	23,31-64,91	0,0828
Tablas	23,81	8,65-47,15	25,00	11,30-46,60	52,38	31,02-72,91	0,1058
Mangos cuchillo	47,62	27,09-68,98	25,00	11,30-46,60	61,90	39,30-80,31	0,0487*
Picadora carne	9,52	2,25-32,54	4,17	0,54-25,92	33,33	16,23-56,33	0,0237*

Nota: AG1 = área socio-económica alta y media alta; AG2 = área socio-económica media; AG3 = área socio-económica media baja y baja.

*Indica diferencia estadísticamente significativa.

Al agrupar los estratos AG1 y AG2 se observa que además de los mangos de los cuchillos y las picadoras de carne, también hay diferencias significativas en las tablas ($p=0,0323$); y una marcada tendencia de las mesadas ($p= 0,0529$) de las carnicerías ubicadas en el AG3 a presentar una mayor contaminación por *S. aureus* que las del AG1-2 (Cuadro IX).

Cuadro IX. Porcentaje estimado de carnicerías con presencia de *S. aureus* según el tipo de superficie tomando AG1 y AG2 como un solo estrato y el nivel de significación entre estratos.

Superficies	AG1-2		AG3		Todas		p /entre estratos
	n	%	n	%	n	%	
Mesadas	9	19,49	9	42,86	18	26,07	0,0529
Tablas	11	24,48	11	52,38	22	32,34	0,0323*
Mangos cuchillo	16	34,84	13	61,90	29	42,47	0,0454*
Picadora carne	3	6,50	7	33,33	10	14,06	0,0067*

Nota: AG1-2 = área socio-económica alta, media alta y media; AG3 = área socio-económica media baja y baja y n = cantidad de superficies positivas a *S. aureus*.

*Indica diferencia estadísticamente significativa.

Se estimó que el 6,85% (2,89 – 15,37) de las carnicerías de Montevideo tendrían cepas de *S. aureus* portadoras del gen *tst*. De las 79 cepas de *S. aureus* analizadas (1 cepa por superficie), 6 fueron portadoras del gen *tst* y 4 presentaron el gen *mecA* (Figura 5). Las 6 cepas portadoras del gen *tst* se recuperaron en 5 carnicerías, 4 correspondieron al AG3 (una de ellas con 2 superficies contaminadas: tabla y mango de los cuchillos) y 1 al AG1. Las superficies contaminadas en las carnicerías ubicadas en el AG3 fueron tablas, mesadas y mangos de cuchillos, mientras que la superficie contaminada en la carnicería ubicada en el AG1 fue la picadora de carne.

Asimismo, se estimó que el 5,46% (1,70 – 16,16) de las carnicerías de Montevideo presentarían cepas de *S. aureus* portadoras del gen *mecA*. Las 4 cepas que presentaron el gen *mecA* se detectaron en 3 carnicerías, 2 ubicadas en el AG1 (una con 2 superficies contaminadas) y 1 ubicada en el AG2. Las superficies contaminadas en las carnicerías ubicadas en el AG1 fueron mesadas y mangos de cuchillos, mientras que en el AG2 las superficies contaminada fueron únicamente las mesadas.

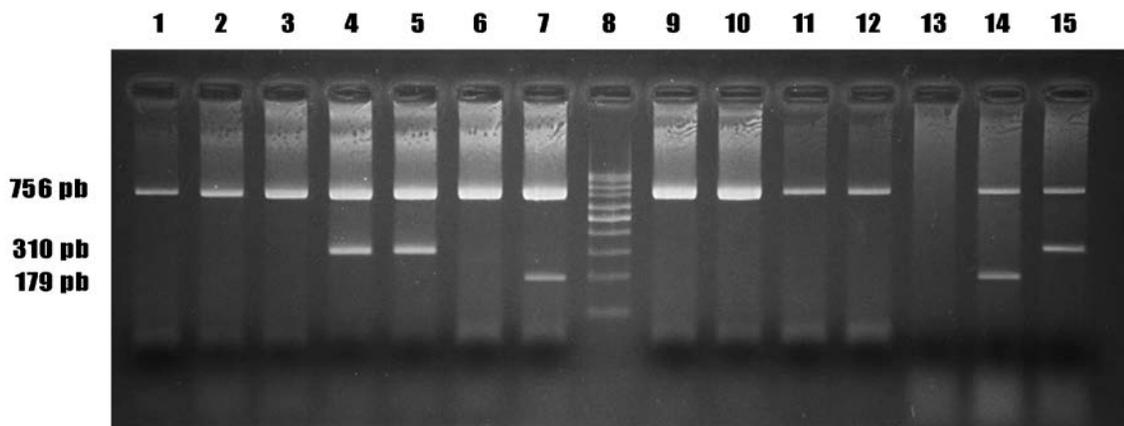


Figura 5. Detección de los genes *mecA* y *tst* mediante PCR múltiple y electroforesis en gel de agarosa al 2%. Carriles 1, 2, 3, 6, 9, 10 y 11: cepas de *S. aureus* *tst* y *mecA* negativas; carriles 4 y 5: cepas de *S. aureus* *mecA* positivas; carril 7: cepa de *S. aureus* *tst* positiva; carril 8: marcador de peso 100 pb; carril 12: cepa control de *S. aureus* *tst* y *mecA* negativas; carril 13: control de mezcla; carril 14: cepa control de *S. aureus* *tst* positiva y carril 15: cepa control de *S. aureus* *mecA* positiva.

8.2.2 *Escherichia coli*

El porcentaje de carnicerías que presentaron contaminación por *E. coli* en el AG1 fue de 71,43% (48,18% - 87,05%), en el AG2 de 66,67% (45,24% - 82,88%) y en el AG3 fue de 90,48% (67,46% - 97,75%). El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las distintas zonas.

Si en el análisis consideramos la cantidad de superficies contaminadas por *E. coli* y el área socio-económica, observamos que el 42,86% (23,31% - 64,91%) de las carnicerías ubicadas en el AG3 presentaron las 4 superficies estudiadas contaminadas, en comparación con los establecimiento de las áreas AG1 y AG2 que presentaron el 14,29% (4,44% - 37,41%) y el 16,67% (6,14% - 37,96%) respectivamente. Si observamos las carnicerías que no tuvieron ninguna superficie contaminada vemos que las ubicadas en las áreas AG1 y AG2 mostraron un porcentaje mayor 28,57% (12,95% - 51,82%) y 33,33% (17,12% - 54,75%) respectivamente, en comparación con el AG3 que mostró un 9,52% (2,24% - 32,54%) (Cuadro X). En este caso, la prueba de chi cuadrado tampoco mostró diferencias significativas pero sugiere una tendencia ($p= 0,0581$).

Cuadro X. Frecuencia de superficies contaminadas con *E. coli* según el área socio-económica donde se encuentran ubicadas las carnicerías.

Frecuencia de superficies contaminadas con <i>E. coli</i> .						
AG	0 % (n)	1 % (n)	2 % (n)	3 % (n)	4 % (n)	Total % (n)
AG1	28,57 (6)	0 (0)	23,81 (5)	33,33 (7)	14,29 (3)	100 (21)
AG2	33,33 (8)	4,17 (1)	33,33 (8)	12,50 (3)	16,67 (4)	100 (24)
AG3	9,52 (2)	14,29 (3)	9,52 (2)	23,81 (5)	42,86 (9)	100 (21)
Total	25,14 (16)	5,72 (4)	23,65 (15)	22,20 (15)	23,30 (16)	100 (66)

Nota: AG1 = área socio-económica alta y media alta; AG2 = área socio-económica media; AG3 = área socio-económica media baja y baja y n = cantidad de superficies positivas a *E. coli*.

Al igual que hicimos para *S. aureus*, con el objetivo de darle mayor poder a las pruebas de hipótesis y mejorar los valores de estimación, las carnicerías ubicadas en el AG1 y AG2 se analizaron como un solo estrato (AG1-2). Si observamos los resultados obtenidos vemos que el 31,26% (19,05% - 46,77%) de las carnicerías ubicadas en el AG1-2 no presentaron ninguna superficie contaminada en contraste con las del AG3 que tuvo un 9,52% (2,24% - 32,54%). En el otro extremo, el 42,86% de las carnicerías en el AG3 presentaron las 4 superficies contaminadas, en contraposición con las carnicerías del AG1-2 que presentaron un 15,63% (7,39% - 30,07%). La prueba de chi cuadrado ajustada por el diseño mostró diferencias significativas ($p=0,0163$) entre las áreas geográficas, teniendo los establecimientos del AG3 casi tres veces más probabilidad de presentar las 4 superficies contaminadas que las carnicerías ubicadas en AG1-2 (Cuadro XI y Figura 6).

Cuadro XI. Comparación de la cantidad de superficies contaminadas por carnicería según el área geográfica analizando las correspondientes a AG1 y AG2 como un solo estrato.

Frecuencia de superficies contaminadas con <i>E. coli</i>						
AG	0 % (n)	1 % (n)	2 % (n)	3 % (n)	4 % (n)	Total % (n)
AG1-2	31,26 (14)	2,35 (1)	29,19 (13)	21,56 (10)	15,63 (7)	100 (45)
AG3	9,52 (2)	14,29 (3)	9,52 (2)	23,81 (5)	42,86 (9)*	100 (21)
Total	25,14 (16)	5,72 (4)	23,65 (15)	22,20 (15)	23,30 (16)	100 (66)

Nota: AG1-2 = área socio-económica alta, media alta y media; AG3 = área socio-económica media baja y baja; n = cantidad de superficies positivas a *E. coli*.

*Indica diferencias estadísticamente significativas.

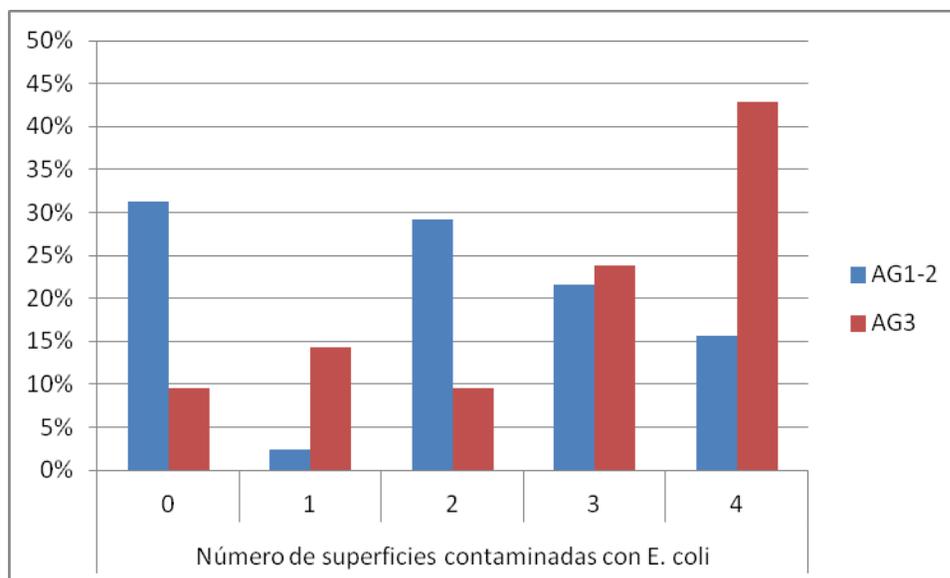


Figura 6. Porcentaje de superficies contaminadas con *E. coli* por carnicería según el área socio-económica considerando el AG1 y AG2 como un solo grupo. AG1-2 = área socio-económica alta, media-alta y media; AG3 = área socio-económica media-baja y baja.

Si analizamos los diferentes tipos de superficies examinadas según el área socio-económica donde estaban ubicadas las carnicerías observamos que el AG3 presentó una proporción mayor de *E. coli* en todos los tipos de superficies. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los estratos pero se observó una tendencia de mayor contaminación ($p=0,0521$) en las picadoras de carne de las carnicerías ubicadas en el AG3 (Cuadro XII).

Cuadro XII. Porcentaje estimado de la presencia de *E. coli* y límites de confianza del 95% por área socio-económica según el tipo de superficie analizada y nivel de significación entre estratos (p).

Superficies	AG1		AG2		AG3		p /entre estratos
	%	IC95%	%	IC95%	%	IC95%	
Mesadas	42,86	23,31-64,91	45,83	26,83-66,13	76,19	52,85-90,13	0,0760
Tablas	61,90	39,30-80,31	50,00	30,29-69,71	76,19	52,85-90,13	0,2177
Mangos cuchillo	52,38	31,02-72,91	50,00	30,29-69,71	57,14	35,09-76,69	0,8957
Picadora carne	47,62	27,09-68,98	29,17	14,14-50,74	66,67	43,67-83,77	0,0521

Nota: AG1 = área socio-económica alta y media alta; AG2 = área socio-económica media; AG3 = área socio-económica media baja y baja.

Al agrupar los estratos AG1 y AG2 observamos que las mesadas y las picadoras de carne de las carnicerías ubicadas en el AG3 presentaron una contaminación significativamente mayor que las de AG1-2 (Cuadro XIII).

Cuadro XIII. Porcentaje estimado de carnicerías con mesadas y picadoras de carne positivos a *E. coli* por área socio-económico tomando AG1 y AG2 como un solo grupo y el nivel de significación entre estratos.

Superficies	AG1-2		AG3		Todas		p /entre estratos
	n	%	n	%	n	%	
Mesadas	20	44,54	16	76,19	36	53,46	0,0216*
Picadora carne	17	37,19	14	66,67	31	45,50	0,0314*

Nota: AG1-2 = área socio-económica alta, media alta y media; AG3 = área socio-económica media baja y baja; n = cantidad de superficies positivas a E. coli.

**Indica diferencia estadísticamente significativa.*

Ninguna de las 79 cepas seleccionadas dio resultado positivo para los genes *stx1/2*.

8.3 Encuesta epidemiológica

Parte 1. Información general

Tipo de carnicería. Si observamos los resultados según el tipo de carnicería analizada y los microorganismos identificados, vemos que el 100% de los supermercados fueron positivos a la presencia de *S. aureus* mostrando una diferencia significativa ($p= 0.0038$) respecto a las carnicerías tradicionales, que resultaron positivas en un 46,05% (IC 95%, 30,54% - 56,69%).

Los resultados no mostraron diferencias significativas para el caso de *E. coli*.

Volumen de venta. Si observamos los resultados microbiológicos y los comparamos con el volumen de venta mensual, vemos diferencias significativas ($p=0,045$) en los niveles de contaminación por *S. aureus* en las carnicerías que presentaron un mayor volumen de venta (Figura 7).

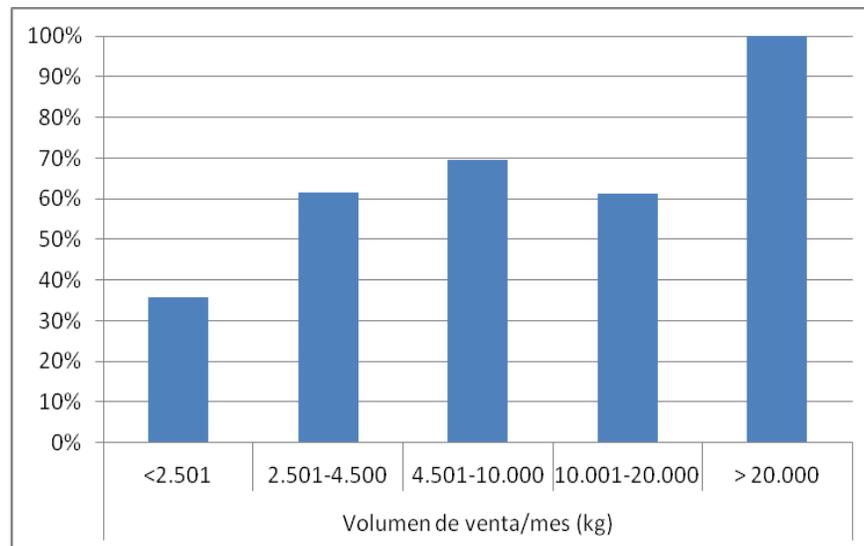


Figura 7. Porcentaje estimado de carnicerías con presencia de *S. aureus* según el volumen de venta mensual (kg).

El análisis de los resultados no mostró asociación estadísticamente significativa entre el volumen de venta y la presencia de *E. coli*.

Parte 2. Instalaciones

El 100% de las carnicerías visitadas contaban con instalaciones para el lavado de manos, baños para el personal y agua potable proveniente de OSE (Obras Sanitarias del Estado).

Asimismo, la totalidad de las paredes y pisos de los locales estaban construidos con materiales lavables. El análisis de los resultados mostró que no hubo asociación entre las variables antigüedad, mantenimiento general de las instalaciones, material y estado de

mantenimiento de las paredes, pisos, techos, zócalos sanitarios, desagües, forma de accionamiento (manual o automático) de los lavamanos y disponibilidad de agua caliente, y la presencia de *S. aureus* o *E. coli*.

Parte 3. Personal

Los resultados mostraron que no existió asociación estadística entre la presencia de *S. aureus* y *E. coli* y la cantidad de personal que manipula los productos cárnicos, la edad del personal, los años de experiencia y el nivel educativo.

Sin embargo, cuando analizamos el nivel educativo en las tres áreas socio-económicas, observamos que el porcentaje de personal con formación especializada y educación primaria es similar en los tres estratos, mostrando diferencias significativas ($p= 0,007$) en la cantidad de personal sin educación formal y con educación secundaria. Respecto a esto, el área socio-económica baja y media baja presentó el porcentaje (9,28%) más alto de personal sin educación formal en comparación con las otras dos áreas que presentaron un 2,86 y 2,17% respectivamente.

Cuando analizamos el nivel educativo en los tres estratos según el tipo de carnicería no se consideraron los supermercados, pues utilizan los mismos criterios de reclutamiento en todas las áreas y diluyen las diferencias entre las mismas. De esta manera, los resultados mostraron que las carnicerías tradicionales del AG3 además de presentar el mayor porcentaje de personal sin educación formal (16,36%) también presentaron el menor porcentaje (7,27%) de personal con educación secundaria en comparación con las otras dos áreas (AG1=27,59% y AG2=20,00%), observándose diferencias significativas ($p= 0,014$) en el nivel educativo del personal que trabaja en las carnicerías tradicionales de los tres estratos. Asimismo, se observó que el porcentaje del personal con formación especializada en manipulación de alimentos fue de 1,72 % en el AG1, 1,43% en el AG2 y 0% en el AG3 del personal (Figura 8).

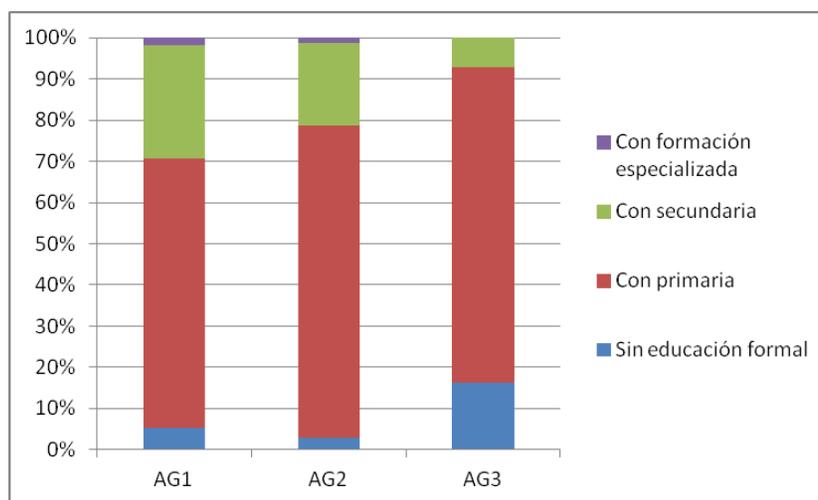


Figura 8. Nivel educativo del personal en las carnicerías tradicionales de los estratos AG1 (área socio-económica alta y media alta); AG2 (área socio-económica media) y AG3 (área socio-económica media baja y baja).

Parte 4. Superficies en contacto con los productos cárnicos

Los resultados mostraron que no existió asociación entre la presencia de *S. aureus* y el tipo de material de las superficies que se encuentran en contacto con los productos cárnicos y su frecuencia de limpieza.

Para el caso de *E. coli*, los resultados mostraron una tendencia de menor contaminación en las superficies de madera, detectándose diferencias significativas ($p=0,0342$) en las tablas de picar, donde se observó que las de teflón (politetrafluoroetileno) presentaron niveles de contaminación más altos en comparación con las de madera (Cuadro XIV).

Respecto al resto de las superficies analizadas, los resultados no mostraron asociación entre la presencia de *E. coli* y el tipo de material y frecuencia de limpieza de las mismas.

Cuadro XIV. Estimación de la presencia de *E. coli* en las superficies analizadas según el tipo de material del equipamiento y la frecuencia de limpieza.

Variable		Frecuencia	Resultados % (n)	IC95%	Valor P
Mesadas					
Material	A. inox.	48 (72,73%)	55,49 (27/48)	41,06-69,04	0.5997
	Otros	18 (27,27%)	48,09 (9/18)	26,44-70,49	
Frecuencia limpieza	>1/día	40 (60,61%)	49,31 (20/40)	33,79-64,95	0.4120
	Diario	26 (39,39%)	59,88 (16/26)	40,29-76,75	
	<1/día	0 (%)			
Tablas					
Material	Teflón	32 (48,48%)	73,73 (24/32)	55,34-86,41	0,0342*
	Madera	19 (28,79%)	63,27 (12/19)	39,35-82,06	
	Ambos	15 (22,73%)	32,62 (5/15)	13,63-59,76	
Frecuencia limpieza	>1/día	35 (53,03%)	62,10 (22/35)	44,78-76,80	0,7392
	Diario	27 (40,91%)	57,57 (15/27)	38,73-74,44	
	<1/día	4 (6,06%)	77,11 (3/4)	24,58-97,21	
Mangos de cuchillos					
Material	Plástico	62 (93,94%)	54,93 (34/62)	41,93-67,30	0,1617
	Madera	4 (6,06 %)	20,91 (1/4)	2,63-72,16	
Frecuencia limpieza	>1/día	28 (42,42%)	64,97 (18/28)	45,31-80,59	0,2470
	Diario	32 (48,48%)	42,98 (14/32)	26,74-60,87	
	<1/día	6 (9,09 %)	48,90 (3/6)	15,33-83,49	
Picadora de carne					
Material	A. inox.	17 (25,76%)	51,98 (9 /17)	28,65-74,48	0,5494
	Otro mat.	49 (74,24%)	43,33 (21/49)	30,27-57,40	
Frecuencia limpieza	>1/dia	16 (24,24%)	53,28 (9/16)	29,83-75,37	0,7551
	Diario	37 (56,06%)	41,97 (16/37)	27,07-58,49	
	<1/dia	13 (19,70%)	45,63 (6/13)	21,16-72,41	

Nota: A. inox.= acero inoxidable.

*Indica diferencia estadísticamente significativa.

Parte 5. Productos cárnicos y condiciones de almacenamiento

El 100% de las carnicerías vendían carne bovina, ovina, aviar y porcina. Los resultados no mostraron diferencia significativa entre las carnicerías que comercializaban otros alimentos no cárnicos en los locales y la presencia de *S. aureus* y *E. coli*.

Respecto a las condiciones de almacenamiento de los productos cárnicos, tampoco se encontró asociación entre las temperaturas de almacenamiento y la presencia de *S. aureus* y *E. coli* en las superficies de contacto. En este punto, cabe aclarar que solo el 1,34% de las carnicerías visitadas presentaban los productos con temperaturas mayores a 10°C.

Parte 6. Higiene

Respecto al estado de higiene de las instalaciones se observó que el 10,32% (4,91% - 20,43%) de las carnicerías presentó un muy buen estado de higiene, el 61,01% (48,32% - 72,36%) presentó un estado bueno, el 26,97% (17,34% - 39,41) presentó un estado regular, el 1,69% (0,22% - 11,61%) un estado malo y ninguna presentó un estado muy malo. Asimismo, el 95,83% (87,52 – 98,69%) declaró que realiza desinfección, en su gran mayoría con hipoclorito.

Respecto a la frecuencia de higiene de manos el 100% de las personas encuestadas declaró lavarse las manos antes de comenzar a trabajar, cada vez que manipulaban algún elemento que no fuera carne y luego de ir al baño. El 68,18% respondió que no realizaba higiene de las manos cuando manipulaban diferentes tipos de carne.

Los resultados mostraron que no hubo diferencia significativa entre el estado de higiene de las instalaciones ni la frecuencia de lavado de manos entre las tres áreas socio-económicas. Tampoco se pudo demostrar asociación entre el estado de higiene de las instalaciones, cámaras, vitrinas, baños, vestuarios, frecuencia de limpieza, desinfección y la presencia de *S. aureus* y *E.coli* en las carnicerías.

9. DISCUSIÓN

Para mejorar la calidad higiénico-sanitaria de las carnicerías, de los productos comercializados y reducir el impacto de las enfermedades transmitidas por alimentos cárnicos, es importante conocer la prevalencia de las bacterias potencialmente patógenas o indicadoras de contaminación presentes en las superficies de contacto con la carne (Hassan et al, 2010). En este sentido, la detección y cuantificación de organismos indicadores son ampliamente utilizados para evaluar la eficacia en la aplicación de las prácticas de higiene. Dentro de éstos indicadores se incluye a *S. aureus*, *E. coli*, y otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Kusumaningrum et al. 2002; Moore & Griffith, 2002).

Los resultados globales de este estudio mostraron que el 86,88% de las carnicerías de Montevideo tendrían al menos uno de los microorganismos buscados (*S. aureus* o *E. coli*) en alguna de las superficies muestreadas. Es de esperar que si no cambian las condiciones y se repitiera el estudio el valor verdadero de carnicerías con alguno de estos agentes esté entre 76,03% y 93,25%, con un nivel de confianza del 95%. A nivel nacional no se dispone de datos previos, sin embargo estos resultados mostraron una cifra elevada de contaminación, lo que indicaría un déficit general en los procesos de limpieza y desinfección utilizados y fallas en las prácticas de manipulación y de lavado de manos aplicadas por los carniceros.

La prevalencia encontrada en las carnicerías del departamento de Montevideo de *S. aureus* fue 65,06% y de *E. coli* 74,86%. No se encontraron trabajos científicos donde estuviera publicada la prevalencia de éstos microorganismos por establecimiento, lo que no permitió comparar nuestra situación con la de otros países. Sin embargo, si observamos el porcentaje de *S. aureus* (29,92%) y de *E. coli* (54,17%) detectado en las superficies de contacto con la carne, observamos que son valores muy similares a los encontrados por Hassan et al. (2010) en las carnicerías de la ciudad de Karachi-Pakistan donde las enfermedades transmitidas por alimentos han aumentado como consecuencia de condiciones sanitarias inadecuadas, falta de higiene en general, pobreza y hacinamiento como sostienen los propios autores. En dicho trabajo se identificó *S. aureus* en 34,4% y *E. coli* en 55,6% de los cuchillos, tablas, picadoras de carne y balanzas de las carnicerías.

Otro estudio, realizado por Gurmu y Gebretinsae (2013) en carnicerías de Mekelle – Etiopía también demostró la existencia de una alta probabilidad de contaminación de la carne a partir de las superficies de trabajo. El microorganismo aislado con mayor frecuencia en las superficies en contacto con la carne fue *E. coli* (32%) seguido por *Staphylococcus* spp (28%) y *Salmonella* spp (20%). En dicho estudio el porcentaje de contaminación por *E. coli* (50%) y *Staphylococcus* spp. (20%) en las mesadas, así como la presencia de éste último en las manos de los manipuladores y los cuchillos (40%) son similares a los resultados encontrados en nuestro trabajo (53,46% de *E. coli* y 26,07% de *S. aureus* en mesadas, 42,47% de *S. aureus* en mangos de cuchillos).

Por otra parte, Little et al (1999) estudiaron 212 muestras de superficies en 105 carnicerías en Inglaterra y Escocia con matanza según la ley islámica detectando contaminación por *S. aureus* en 41 superficies (19%) y por *E. coli* en 78 (37%). En nuestro trabajo analizamos 264 muestras de superficies y hallamos 79 superficies (29,92%) contaminadas con *S. aureus* y 143 superficies (54,17%) contaminadas por *E. coli*. Nuevamente, estos hallazgos sugieren problemas de higiene y de prácticas de manipulación en las carnicerías de Montevideo analizadas.

Los trabajos anteriormente citados demuestran la presencia de microorganismos potencialmente patógenos en las superficies de contacto con los productos cárnicos. En nuestro estudio se determinó que los mangos de cuchillos fueron la superficie más contaminada (42,47%) por *S. aureus* ($p=0,003$). Asimismo, Gurmu y Gebretinsae (2013) detectaron el mismo porcentaje de contaminación por *Staphylococcus* spp. en los cuchillos (20%) y en las manos de operarios (20%) en carnicerías de la ciudad de Mekelle-Etiopía. En este sentido, es razonable concluir que la fuente más probable de contaminación de dicha superficie fueron las manos de los carniceros. Nosotros no estudiamos las manos de los manipuladores, sin embargo, si asumimos que la mayoría de las cepas de *S. aureus* identificadas en nuestro estudio son de origen humano y que la contaminación de ambas superficies es muy similar, podemos afirmar que los resultados de nuestro trabajo coinciden con lo publicado por otros autores que identifican a los manipuladores como la principal fuente de contaminación por este microorganismo y plantean la importancia del rol que cumplen en la transmisión de este patógeno (Loeto et al. 2007). Estos resultados sugieren la existencia de contaminación cruzada entre los manipuladores y las superficies de contacto con la carne. Sin embargo, al comparar los resultados con la información de la encuesta, no se encontró asociación entre la frecuencia de lavado de manos y la presencia de *S. aureus*, sugiriendo la utilización de procedimientos de higiene ineficaces. Esta información no fue recabada en la encuesta epidemiológica realizada. Estos datos pueden interpretarse como falta de capacitación en buenas prácticas de manipulación de alimentos, higiene de manos e instalaciones, coincidiendo con lo afirmado por Hassan et al. (2010).

Los resultados obtenidos en las diferentes áreas socio-económicas, mostraron que el área socio-económica baja y medio-baja (AG3) presentó una prevalencia significativamente mayor ($p=0,0205$) de *S. aureus* (85,71%) en comparación con las otras dos áreas. Asimismo, cuando analizamos la cantidad de superficies contaminadas por este microorganismo y el área socio-económica, observamos que el AG3 presentó un porcentaje (19,05%) significativamente mayor ($p=0,0342$) de carnicerías con las 4 superficies contaminadas por este patógeno. Estos resultados indican que la probabilidad de contaminación de los productos cárnicos por *S. aureus* es considerablemente mayor en las carnicerías ubicadas en el área socio-económica baja y media-baja. Esto podría deberse a diferencias en las prácticas de manipulación y lavado de manos entre los carniceros de las tres áreas geográficas. Esto podría relacionarse con la información obtenida en la encuesta donde se encontró que ninguno de los carniceros que trabajan en el área socio-económica baja y media-baja presentó formación especializada en manipulación de alimentos. Respecto a este tema, el porcentaje encontrado en las tres áreas socio-económicas fue muy bajo (1,72 % en el AG1; 1,43% en el AG2 y 0% en el

AG3) lo que muestra la necesidad de realizar capacitaciones específicas en manipulación de los productos cárnicos en las tres áreas.

Es importante destacar que se estima que el 6,85% (5/66) de las carnicerías de Montevideo estarían contaminadas con cepas de *S. aureus* portadoras del gen *tst*. Las 6 cepas de *S. aureus* portadoras de este gen, fueron identificadas en los cuatro tipos de superficies estudiadas y en su mayoría (5/6) aisladas de carnicerías ubicadas en el área socio-económica baja y medio-baja. Esta cifra parece ser elevada cuando la comparamos con los resultados del estudio realizado por Sospedra et al. (2012) que identificó estos cultivos únicamente en las manos de un manipulador de alimentos. Estas cepas son responsables de casos severos de Síndrome de Shock Tóxico (SST) menstrual y no menstrual. Estos últimos son secundarios a infecciones de piel y tejidos blandos; heridas quirúrgicas o de otro tipo, o a casos previos de neumonía viral. En USA la producción de TSST-1 se observa principalmente en cepas de la clona USA200 (complejo clonal 30) y relacionadas, y son responsables del 50% de los casos de SST no menstruales. El otro 50% es causado por cepas USA400 productoras de TSST-1, SEB o SEC. En general la TSST-1 no provoca efectos nocivos sobre la salud de quien consume alimentos contaminados con estas cepas. Sin embargo, los alimentos podrían actuar como vehículo para la difusión masiva de estos agentes en la población susceptible (Schlievert et al. 2004) y además marcadores de la presencia de cepas con otros genes de virulencia como enterotoxinas (SEs).

Por otro lado, se estimó que el 5,46% (3/66) de los establecimientos estarían contaminados con cepas portadoras del gen *mecA*. Las 4 cepas portadoras de este gen fueron identificadas en dos de las superficies estudiadas: mesadas y mangos de cuchillos y aisladas de carnicerías ubicadas en las áreas socio-económicas media, alta y media-alta (AG1 y 2). Estas cepas producen enfermedades de severidad variable que van desde procesos supurados de piel y tejidos blandos hasta cuadros más severos como bacteriemia, osteomielitis y neumonía (Pardo et al. 2013). La presencia del gen *mecA*, responsable de la resistencia a la mayoría de los antibióticos beta-lactámicos, plantea un problema adicional en el momento de elegir el tratamiento antimicrobiano adecuado. Los resultados de este estudio, coinciden con lo publicado por otros autores (Lim et al. 2010; Pu et al. 2009), e indican por primera vez en nuestro país, que cepas de MRSA están presentes en la cadena cárnica y desde allí podrían diseminarse tanto en la comunidad general como en el ambiente hospitalario.

Considerando que el reservorio más importante de *S. aureus* son las fosas nasales y los dedos de las personas, y que el 15-40% de la población humana es portadora de este microorganismo de forma asintomática, es necesario prestar especial atención a los manipuladores de alimentos portadores de este microorganismo, ya que estos pueden contaminar los alimentos o las superficies de trabajo a través de sus manos si la manipulación no se realiza con debido cuidado (Polledo et al. 1985). Estos hechos y el nivel de contaminación encontrado con *S. aureus* (65,07%) en nuestro estudio remarcan la necesidad de profundizar en la capacitación del personal para mejorar las prácticas de lavado de manos y los cuidados que deben tomar cuando tienen procesos infecciosos supurados.

Asimismo, el aislamiento de cepas portadoras de genes asociados a virulencia y resistencia a los antimicrobianos plantea un problema adicional que debe ser atendido. La circulación de estas cepas en el ambiente donde se comercializa la carne favorecería su diseminación a través de este tipo de alimento, más aún considerando que Uruguay tiene un consumo de carne per cápita de 98,6 kg por habitante por año, con el consiguiente riesgo de infección para las personas que consumen o manipulan los productos cárnicos, sobre todo aquellas que presentan algún tipo de inmunodepresión.

Otro microorganismo utilizado como indicador de contaminación en los alimentos es *E. coli*. Según lo establecido por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), la identificación de *E. coli* en las carcasas bovinas es útil como indicador para determinar si los procedimientos de faena y desosado son eficaces para prevenir la contaminación por materia fecal (USDA/ FSIS, 1996). Además, es un muy buen indicador para evaluar buenas prácticas de manufactura durante el procesamiento de la carne en etapas posteriores en la cadena. Durante el procesamiento de la carne cruda en las carnicerías, la carga microbiana en los distintos cortes se redistribuye entre los nuevos trozos. También puede aumentar como consecuencia de la contaminación cruzada con otras superficies como los cuchillos, tablas de cortar, personal y equipamiento (Martinez-Chavez et al. 2015) o por problemas en el control de la temperatura.

La prevalencia de *E. coli* en las carnicerías encontrada en este trabajo fue de 74,86%, no detectándose diferencias significativas ($p=0,1847$) entre los diferentes estratos socio-económicos. Esto puede deberse a que realmente no exista diferencia como lo indica el valor de P o que debido al número de muestras analizadas no lo podamos detectar estadísticamente. Sin embargo, el 90,48% de las carnicerías del área socio-económica baja y media-baja (AG3) presentaron por lo menos una superficie contaminada. Cuando analizamos la cantidad de superficies observamos que el 42,86% de las carnicerías ubicadas en el área socio-económica baja y media-baja presentaron las 4 contaminadas en comparación con las otras 2 áreas que solo presentaron un 14,29% y 16,67%, respectivamente. Esta diferencia tampoco fue significativa pero mostró una fuerte tendencia ($p=0,0581$). Al aumentar el tamaño de muestra (agrupando el AG1 y AG2) observamos que las carnicerías ubicadas en el área socio-económica baja y media-baja (AG3) presentaron más probabilidad de presentar las 4 superficies contaminadas que las carnicerías ubicadas en las áreas socio-económicas alta, media y media-alta. Estos resultados indican que el nivel de contaminación por *E. coli* en las carnicerías ubicadas en el área socio-económica baja y media-baja es significativamente mayor ($p=0,0163$) a la encontrada en las otras 2 áreas, lo que podría indicar una higiene inadecuada en las carnicerías del AG3. Sin embargo, al comparar estos resultados con la información obtenida en la encuesta, observamos que no hubo diferencia significativa en el estado de higiene de las instalaciones entre las tres áreas.

Al analizar las diferentes superficies contaminadas por *E. coli*, se determinó que las mesadas ($p=0,0216$) y las picadoras de carne ($p=0,0314$) del área socio económica baja y medio-baja tuvieron un nivel de contaminación significativamente mayor respecto a las otras 2 áreas. Asimismo, las picadoras de carne de las carnicerías ubicadas en el área socio-económica media, baja y medio-baja también presentaron un nivel de

contaminación significativamente mayor para *S. aureus* ($p= 0,0067$), lo que sugiere una limpieza deficiente en este tipo de superficie. Sin embargo, al comparar estos resultados con la información recabada en la encuesta, no se encontró asociación entre la frecuencia de limpieza de los diferentes tipos de superficie analizada y la presencia de *E. coli* o *S. aureus*, sugiriendo que más allá de la frecuencia de limpieza de las diferentes superficies analizadas quizás la diferencia se explique por la utilización de procedimientos de higiene ineficaces, así como de productos y elementos de limpieza de calidad inadecuada.

Adicionalmente, respecto al material de las superficies en contacto con la carne, se detectó una tendencia de menor contaminación de la madera por *E. coli* respecto a otros materiales (como el acero inoxidable y diferentes tipos de plásticos), detectándose un nivel de contaminación significativamente mayor ($p=0,0342$) por *E. coli* en las tablas de teflón en comparación con las de madera. Estos datos coinciden con lo publicado por Milling et al. (2005) que sugieren que la madera tendría un mejor efecto higiénico que el plástico debido a sus propiedades antibacterianas.

Según la información arrojada por la encuesta el 95,83% de las carnicerías realizan desinfección, en su mayoría con hipoclorito. Si comparamos esta información con los resultados microbiológicos, vemos que no hay asociación entre la contaminación microbiológica y la utilización de soluciones desinfectantes en la limpieza de las instalaciones, lo que sugiere que las prácticas de sanitización utilizadas no están siendo efectivas. Los errores pueden ser variados, desde la utilización de concentraciones y tiempos de contacto insuficientes, hasta la mezcla con detergentes u otras sustancias inactivantes, así como el exceso de materia orgánica en las superficies a desinfectar, entre otras.

Por otro lado, ninguna de las cepas de *E. coli* recuperadas en este trabajo portó los genes *stx1* ni *stx2*. Este resultado coincide con lo publicado por Hassan et al. (2010) que detectó *E. coli* O157:H7 en carnes pero no logró recuperarla de las superficies de contacto analizadas. Esto podría deberse a que el número de STEC en las muestras de superficies fuera menor al encontrado en la carne, lo que haría más difícil su recuperación (Brusa et al. 2012), a que los medios de enriquecimiento usados en nuestro estudio no fueron los recomendados para la recuperación de STEC o que portaran variantes de los genes *stx* no detectados por los cebadores utilizados (Brusa et al. 2013; Varela et al. 2008; Chinen et al. 2001). En este sentido, el hecho de no detectar STEC en este trabajo no demuestra la ausencia de estas cepas en las carnicerías de Montevideo. Brusa et al. (2013) recuperaron STEC O157 y no-O157 en los productos cárnicos (STEC 25,5% y no-O157 52,2%) y superficies de contacto con la carne como mesadas, cuchillos, picadora de carne y manos de los operarios (STEC 4,4% y no-O157 50,5%) en las carnicerías de la ciudad de Berisso en Buenos Aires-Argentina. Por otro lado, en dicho estudio al igual que en las carnicerías ubicadas en el área socio-económica baja y media-baja (AG3) de nuestro trabajo, se identificó a las picadoras de carne como la superficie con mayor nivel de contaminación por *E. coli* (6,6% STEC O157 y 61,1% STEC no-O157). Considerando ésto y observando los resultados encontrados por Varela et al. (2008) donde se detectó un 1,8% (4/220) de muestras de carne picada con presencia de STEC del serotipo O157:H7 en las carnicerías de los Departamentos de

Montevideo, Maldonado y Soriano, no podemos descartar la presencia de estas cepas en el ambiente de las carnicerías.

Diferentes investigaciones han detectado *Salmonella* spp. en las superficies en contacto con la carne, lo cual no coincide con los resultados obtenidos en este estudio (Leotta et al. 2014; Upadhyaya et al. 2012). En Argentina, desde el año 2014, se lleva adelante el Programa Carnicerías Saludables con el objetivo de conocer la frecuencia de bacterias patógenas (*Salmonella* spp. *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 y no-O157) en carne bovina molida y muestras ambientales. En dicho trabajo, *Salmonella* Enterica, fue identificada en 49 muestras, 15 (13,6%) de carne y 34 (7,9%) de ambiente, entre las cuales se incluyen 10 (9,3%) mesadas, 7 (6,5%) cuchillas, 14 (13,0%) picadoras y 3 (2,8%) manos de carniceros (Leotta et al. 2014). Otro trabajo realizado por Upadhyaya et al. (2012) en 82 carnicerías de Katmandu, estimó la prevalencia de *Salmonella* spp. en superficies en contacto con la carne (tablas de picar, cuchillos y mesadas) obteniendo un 40,2% de carnicerías positivas. En dicho estudio se encontró un 36,0% de las tablas, un 32,9% de los cuchillos y un 25,0% de las mesadas con presencia de *Salmonella* spp., no detectándose diferencia significativa entre las diferentes superficies.

Por otro lado, en el estudio realizado por Hassan et al. (2010) en las carnicerías de Karachi-Pakistan, a pesar de haber recuperado *Salmonella* spp. en 24 de 342 muestras de carne no logró recuperarla de ninguna de las 90 superficies en contacto con la carne analizadas (cuchillos, tablas, picadoras de carne y balanzas). En nuestro trabajo no se analizaron muestras de carne y al igual que el mencionado trabajo tampoco logramos recuperar *Salmonella* spp. de las superficies en contacto con la carne. Por lo tanto, los resultados de este estudio no demuestran la ausencia de *Salmonella* spp. en las carnicerías del departamento de Montevideo, sino que sugieren que dicho microorganismo se encuentra en bajas concentraciones en comparación con los otros microorganismos detectados (competencia por nichos en alimentos, sustancias antibacterianas como las bacteriocinas y microcinas, etc.). La ausencia de *Salmonella* spp. en este estudio puede explicarse también debido a diferencias en la sensibilidad de la técnica utilizada por nosotros.

De esta manera, del análisis de nuestros resultados y de los del trabajo realizado por Hassan et al. (2010) se concluye que para aumentar la probabilidad de recuperación de *Salmonella* y STEC, y demostrar su presencia en las carnicerías sería recomendable analizar además muestras de carne.

Este es el primer estudio realizado en Uruguay en esta área que demuestra la existencia de altos niveles de contaminación por *S. aureus* y *E. coli* en las superficies de contacto con los productos cárnicos, lo cual podría incrementar la probabilidad de contaminación cruzada de la carne a través del contacto con las superficies de trabajo y por ende, el riesgo de los consumidores y manipuladores.

De los resultados de este trabajo se concluye, que sería recomendable que las carnicerías contaran con Procedimientos operativos estandarizados de limpieza y desinfección (POES) documentados, y llevaran planillas de control que permitan verificar su

cumplimiento y garantizar su continuidad en el tiempo. Es necesaria la formación de los carniceros en buenas prácticas de manipulación de la carne, profundizando en la eficacia de los procedimientos para el lavado de manos, y la realización de cursos especializados para carniceros donde se incluya un módulo sobre limpieza y desinfección de superficies.

Esta información permitirá establecer una línea de base respecto a la situación actual en las carnicerías de Montevideo y focalizar las medidas de prevención y control necesarias para disminuir la contaminación en las superficies de contacto con la carne, contribuyendo de esta forma a la disminución de ETAs asociadas a productos cárnicos.

10. CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran una alta prevalencia de *S. aureus* y *E. coli* en las superficies de contacto con la carne en las carnicerías del departamento de Montevideo. Esto sugiere que los microorganismos encontrados en los puntos de venta podrían ser una importante fuente de contaminación horizontal de la carne mostrando fallas en la aplicación de las buenas prácticas de higiene en las superficies de contacto con la carne y los manipuladores de la misma.

El área socio-económica baja (AG3) presentó una prevalencia significativamente mayor de número de superficies contaminadas con *S. aureus* y *E. coli*, lo que muestra la necesidad de capacitar a los manipuladores que trabajan en las carnicerías ubicadas en ésta área en buenas prácticas de higiene como forma de prevenir la transmisión de estos microorganismos. Asimismo, las carnicerías ubicadas en esta área presentaron las picadoras de carne con un nivel de contaminación significativamente mayor para ambos microorganismos.

La superficie con mayores niveles de contaminación por *S. aureus* fueron los mangos de cuchillos, lo que sugieren la existencia de contaminación cruzada entre los manipuladores y las superficies de contacto con la carne, demostrando la importancia de las buenas prácticas de lavado de manos y el rol fundamental que cumplen los manipuladores como fuente más probable de contaminación de dicha superficie y por ende también de los productos cárnicos.

La presencia de los genes *mecA* y *tst* en las cepas de *S. aureus* recuperadas en los puntos de venta de carne plantean un potencial problema para la salud pública. Respecto a esto, sería de importancia realizar análisis microbiológicos complementarios (como detección de *mecC*, electroforesis de campos pulsados, MLST, etc.) que permitan diferenciar las cepas humanas de las de origen animal (LA-MRSA). También realizar otros estudios para detectar la presencia de genes que codifican para enterotoxinas estafilococcicas (SEs) responsables de cuadros agudos de intoxicación alimentaria.

En este trabajo no se logró detectar *Salmonella* spp. ni cepas de *E. coli* con los genes *stx1/2* en ninguna de las carnicerías analizadas. Sería interesante continuar con el estudio de las cepas de *E. coli* recuperadas y buscar la presencia de otros genes de virulencia presentes en los virotipos STEC y EPEC atípicos, ambos con reservorio bovino reconocido, y también genes asociados a la resistencia antimicrobiana.

De los resultados de este trabajo se desprende la necesidad de capacitación de los carniceros en buenas prácticas de manipulación e higiene. Esto contribuirá a disminuir la contaminación en las superficies de contacto con la carne, favoreciendo de esta forma a la disminución de ETAs asociadas a productos cárnicos.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdullahi I.O, Umoh V.J, Ameh J.B, Galadima M. (2006). Some hazards associated with the production of a popular roasted meat (tsire) in Zaria, Nigeria. *Food Control*, 17:348–352.
2. Acton D. S., Tempelmans Plat-Sinnige M.J, van Wamel W, de Groot N, van Belkum A. (2009). Intestinal carriage of *Staphylococcus aureus*: how does its frequency compare with that of nasal carriage and what is its clinical impact? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 28:115–127.
3. Acuña A.M, Alfonso A, Algorta G, Delvey A, Bentancor L, Chabalgoity A, Chiparelli H, Da Silva A, Deambrosis N, Ferrari A.M, Gadea P, Gularte E, Legani M, Lindner C, Macedo M, Martínez A, Mateos S, Mattera A, Medina D, Montano A, Odizzio M, Pírez M. C, Repiso M. V, Rodríguez G, Salvatella R, Savio M, Schelotto F, Torres M. E, Varela G, Vicentino W. (2002). Enfermedades transmitidas por alimento en Uruguay. *Panalimentos OPS/OMS*.
4. Amigo N, Mercado E, Bentancor A, Singh P, Vilte D, Gerhardt E, Zotta E, Ibarra C, Manning S.D, Larzábal M, Angel Cataldi A. (2015). Clade 8 and Clade 6 Strains of *Escherichia coli* O157:H7 from Cattle in Argentina have Hypervirulent-Like Phenotypes. *PLoS ONE* 10(6): e0127710. doi:10.1371/journal.pone.0127710
5. Arslan Seza and Eyi Ayla. (2010). Occurrence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* species in retail meat products. *J. Food Prot.* 73:1613-1617.
6. Balaban N. and Rasooly A. (2000). Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 61:1–10.
7. Bettelheim K.A (2003). Non O-157 Verotoxin-producing *Escherichia coli*. A problem, paradox and paradigm. *Exp. Biology and Medicine*. 228:333-344.
8. Blanco M, Padola NL, Kruger A, Sanz ME, Blanco JE, Gonzalez EA, Dahbi G, Mora A, Bernardez MI, Etcheverria AI, Arroyo GH, Lucchesi PM, Parma AE, Blanco J. (2004). Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *Int Microbiol.* 7(4):269-276.
9. Bosilevac J M, Guerini M.N, Brichta-Harhay D.M, Terrance M.A, Koochmaraie M. (2007). Microbiological Characterization of Imported and Domestic Boneless Beef Trim Used for Ground Beef, USA. *J. Food Prot.* 70:440-449.
10. Brusa V, Aliverti V, Aliverti F, Ortega E, de la Torre J.H, Linares L.H, Sanz M.E, Etcheverria A.I, Padola N.L, Galli L, Peral García P, Copes J, Leotta G.A. (2012). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef retail markets from Argentina. *Front Cell Infect Microbiol.* 2: 171.
11. Centers for Disease Control. (2005). National Antimicrobial Resistance Monitoring System: Enteric Bacteria. Human Isolates Final Report. 28. <http://www.cdc.gov/narms/annual/2005/NARMSAnnualReport2005.pdf>
12. Centers for Disease Control. (2003). Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illness. *MMWR MorbMortal Wkly Rep.* 52:340-343.
13. Chambers H.F. (1997). Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Review* 10:781-791.
14. Chinen I, Tanaro J.D, Miliwebsky E, Lound L.H, Chillemi G, Ledri S, Baschkier A, Scarpin M, Manfredi E. y Rivas M. (2001). Isolation and Characterization of

- Escherichia coli* O157:H7 from Retail Meats in Argentina. J. Food Protect. 64:1346-1351.
15. Costas G. y Herrera V. (2008). ¿Cómo? ¿Cuándo? ¿Dónde? ¿Qué? Comercialización de carnes y menudencias en Montevideo 2000/2007. Serie técnica INAC N°45.
 16. DeLeo F.R, Chambers H.F. (2009). Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomic era. J. Clin. Invest. 119:2464-2474.
 17. de Neeling A.J, van den Broek M.J, Spalburg E.C, van Santen-Verheувel M.G, Dam-Deisz W.D, Boshuizen H.C, van de Giessen A.W, van Duijkeren E, Huijsdens X.W (2007). High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. Vet Microbiol. 122:366-372.
 18. Dinges M, Orwin P, Schlievert P. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Reviews.13:16–34.
 19. European Food Safety Authority (EFSA). (2014). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. EFSA Journal, 12(2):3547.
 20. Gómez D, Miliwebsky E, Fernandez Pascua C, Baschkier A, Manfredi E, Zotta M, Nario F, Piquin A, Sanz M, Etcheverria A, Padola N, Parma A, Rivas M. (2002). Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productora de verotoxina de hamburguesas congeladas y quesos blandos. Rev. Argent. Microbiol. 34(2):66-71.
 21. Gurmu E.B, Gebretinsae H. (2013). Assessment of Bacteriological Quality of Meat Cutting surfaces in selected Butcher shops of Mekelle city, Ethiopia. J Environ Occup Sci. 2(2): 61-66.
 22. Hassan Ali N, Farooqui A, Khan A, Yahya Khan A, Kazmi S.U. (2010). Microbial contamination of raw meat and its environment in retail shops in Karachi, Pakistan. J Infect Dev Ctries; 4(6):382-388.
 23. Hoet A. E, Johnson A, Nava-Hoet R. C, Bateman S, Hillier A, Dyce J, Gebreyes W. A, Wittum T. E. (2011). Environmental Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Veterinary Teaching Hospital During a Nonoutbreak Period. Vector Borne Zoonosis Dis. 11:609-615.
 24. Huijsdens X.W, van Dijke B.J, Spalburg E, van Santen-Verheувel M.G, Heck M.E, Pluister G.N, Voss A, Wannet W.J, de Neeling A.J. (2006). Community-acquired MRSA and pig-farming. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 5:26
 25. Hussein H.S, Bollinger LM. (2005). Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle. J. Food Prot. 68(10):2224-2241.
 26. Instituto Nacional de Carnes (INAC). Principales indicadores del consumo de carnes en Uruguay, Abril 2015. <http://www.inac.gub.uy/innovaportal/file/11573/1/cierre-2014-consumo.pdf>
 27. Jiang X.P, Doyle M.P (1999). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Enteritidis on currency. J. Food Protect. 62:805-807.
 28. Jones T.F, Kellum M.E, Porter S.S, Bell M, Schaffner W. (2002). An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Emerg Infect Dis. 8:82–84.
 29. Karmali M.A. (1989) Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Clinical Microbiological Reviews 2:15-38.
 30. Kasowski E, Gackstetter G, Sharp T. (2002). Foodborne Illness: New Developments Concerning an Old Problem. Current Gastroenterology Reports. 4:308–318.

31. Kennedy A.D, Otto M, Braughton K.R, Whitney A.R, Chen L, Mathema B, Mediavilla J.R, Byrne K.A, Parkins L.D, Tenover F.C, Kreiswirth B.N, Musser J.M, DeLeo F.R. (2008). Epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: recent clonal expansion and diversification. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:1327-1332.
32. Khanna T, Friendship R, Dewey C, Weese J.S. (2008). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. Vet. Microbiol. 128:298-303.
33. Klevens R.M, Morrison M.A, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison L.H, Lynfield R, Dumyati G, Townes J.M, Craig A.S, Zell E.R, Fosheim G.E, McDougal L.K, Carey R.B, Fridkin S.K. (2007). Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in United States. JAMA 298:1763-1771.
34. Kluytmans J, Van Leeuwen W, Goessens W, Hoolis R, Messer S, Herwaldt L, Bruining H, Heck M, Rost J, Van Leeuwen N, Van Belkum A, Verbrugh H. (1995). Food-initiated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by pheno-and genotyping. J.Clin Microbiol. 33:1121-1128.
35. Kusumaningrum H, Van Putten M, Rombouts F, Beumer R. (2002). Effects of antibacterial dishwashing liquid on foodborne pathogens and competitive microorganisms in kitchen sponges. J. Food Prot. 65:61-65.
36. Lim S.K, Nam H-M, Park H-J, Lee H-S, Choi M-J, Jung S-C, Lee J-Y, Kim Y-C, Song S-W, Wee S-H. (2010). Prevalence and Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Raw Meat in Korea. J. Microbiol. Biotechnol. 20(4): 775-778.
37. Leotta G, Linares L, Ortega E, Adriani C (2014). Carnicerías saludables. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/carne_y_subproductos/162-carnicerias_saludables.pdf Último acceso: 3 de Diciembre 2015, 10:12 hrs
38. Little C, Gillespie I, de Louvois J, Mitchell R. (1999). Microbiological investigation of halal butchery products and butcher's premises. Commun Dis Public Health 2:114-118.
39. Loeto D, Matsheka M.I, Gashe B.A. (2007). Enterotoxigenic and Antibiotic Resistance Determination of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Food Handlers in Gaborone, Botswana. J. Food Prot. 70:2764-2768.
40. Martínez-Chávez L, Cabrera-Díaz E, Pérez-Montaña J.A, Garay-Martínez L.E, Varela-Hernández J.J, Castillo A, Lucia L, Ávila-Novoa M.G, Cardona-López M.A, Gutiérrez-González P, Martínez-González N.E. (2015). Quantitative distribution of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* on beef carcasses and raw beef at retail establishments. Int. J. Food Microbiol. 210:149-155.
41. Mead P.S, Slutsker L., Dietz V, McCaig L.F, Bresee J.S, Shapiro C. (1999). Food related illness and death in the United States, Emerging Infect. Dis 5:607-625.
42. Meyer C, Thiel S, Ullrich U. and Stolle A. (2010). Salmonella in Raw Meat and By-Products from Pork and Beef. J. Food Protect. 73:1780-1784.
43. Milling A, Kehr R, Wulf A, Smalla K. (2005). Survival of bacteria on wood and plastic particles: Dependence on wood species and environmental conditions. Holzforschung. 59:72-81.
44. Ministerio de Salud Pública, Dirección General de la Salud, División Epidemiología. (2011). Boletín Epidemiológico.

- <http://www.msp.gub.uy/busqueda/msp/Boletin%20epidemiologico%202011>. Acceso 13 de Abril de 2015.
45. Mollenkopf D F., Kleinhenz Katie E., Funk Julie A., Gebreyes Wondwossen A. and Wittum Thomas E. (2011). *Salmonella* Enterica and *Escherichia coli* Harboring *bla_{CMY}* in Retail Beef and Pork Products. *Foodborne Pathog. Dis.* 8(2):333-336.
 46. Moore G, Griffith C. (2002). A comparison of surface sampling methods for detecting coliforms on food contact surfaces. *Food Microbiol.* 19:65-73.
 47. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), Organización Mundial de la Salud (OMS). (2002). Conferencia Paneuropea sobre Calidad e Inocuidad de los alimentos, Información estadística sobre enfermedades transmitidas por los alimentos en Europa – Peligros microbiológicos y químicos, Hungría.
 48. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura (FAO) y la Alimentación, Organización Mundial de la Salud (OMS) (2015), <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>. Acceso 22 de Setiembre de 2015.
 49. Otter J.A and French G.L. (2010) Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet Infect. Dis.* 10:227-239.
 50. Padola N.L, Sanz M.E, Blanco J.E, Blanco M, Blanco J, Etcheverria A.I, Arroyo G.H, Usera M.A, Parma A.E. (2004). Serotypes and virulence genes of bovine Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. *Vet Microbiol* 100(1-2):3-9.
 51. Pardo L, Machado V, Mollerach M, Mota M.I, Tuchscher L.P.N, Gadea P, Gardella N, Sordelli D.O, Vola M, Schelotto F, Varela G. (2009). Characteristics of Community- Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) Strains Isolated from Skin and Soft-tissue Infections in Uruguay. *Int J Microbiol.* 47:21-26.
 52. Pardo L, Vola M, Macedo-Viñas M, Machado V, Cuello D, Mollerach M, Castro M, Pérez C, Varela G, Algorta G. (2013). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children treated in Uruguay. *J Infect Dev Ctries.* 7(1):10-16.
 53. Paton J.C and Paton A. W (1998). Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:450-479.
 54. Polledo J.J.F, García M.L, Moreno B, Menes I. (1985). Importance of food handlers as a source of enterotoxigenic staphylococci. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.* 181:364-367.
 55. Pu S, Han F, Ge B (2009). Isolation and Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains from Louisiana Retail Meats. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:265-267.
 56. Rao J. N. K. and A. J. Scott. (1984). On chi-squared tests for multiway contingency tables with cell proportions estimated from survey data. *Annals of Statistics* 12: 46-60.
 57. Scallan E, Hoekstra R.M, Angulo F.J, Tauxe R.V, Widdowson M.A, Roy S.L, Jones J.L, Griffin P.M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg Infect Dis.* 17:7–15.

58. Schlievert P.M, Tripp T.J, Peterson M.L. (2004). Reemergence of Staphylococcal Toxic Shock Syndrome in Minneapolis-St. Paul, Minnesota, during the 2000-2003 Surveillance Period. *J. Clin. Microbiol.* 42:2875-2876.
59. Scott E, Bloomfield S.F. (1990). The survival and transfer of microbial-contamination via cloths, hands and utensils. *J. App. Bacteriol.* 68:271-278.
60. Sospedra I, Mañes J, Soriano J.M. (2012). Report of toxic syndrome toxin 1 (TSST-1) from *Staphylococcus aureus* isolated in food handlers and surfaces from foodservices establishments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 80:288-290.
61. Upadhyaya M, Poosaran N, Fries R. (2012). Prevalence and Predictors of *Salmonella* spp. in Retail Meat Shops in Kathmandu. *J. Agric. Sci. Technol.* 1094-1106.
62. United States Department of Agriculture (USDA), Food Safety and Inspection Service (FSIS). (1996). Nationwide Federal Plant Raw Ground Beef Microbiological Survey (1993-1994) Accesible en: <http://www.fsis.usda.gov/OPHS/baseline/rwgrbeef.pdf>
63. Verkade E, Kluytmans J. (2014). Livestock-associated *Staphylococcus aureus* CC398: Animal reservoirs and human infections. *Infection, Genetics and Evolution* 21:523-530.
64. Varela G, Chinen I, Gadea P, Miliwebsky E, Mota M.I, Gonzalez S, Gonzalez G, Gugliada M.J, Carbonari C.C; Algorta G, Bernad  M, Sabelli R, Pardo L, Rivas M, Schelotto F. (2008). Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de casos clínicos y de alimentos en Uruguay. *Rev. Argent. Microbiol.* 40: 93-100.
65. Voss A, Loeffen F, Bakker J, Klaassen C, Wulf M. (2005) Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg.Infect. Dis.* 11:1965-1966.

ANEXO I

ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA

Nº de carnicería: _____

Estudio transversal epidemiológico sobre contaminación microbiológica ambiental en carnicerías de Montevideo-Uruguay”

Encuesta epidemiológica

Parte 1: Información general

1.1 Fecha de visita:	1.5 Ubicación de la carnicería
1.2 Horario de visita:	<input type="checkbox"/> AG1 <input type="checkbox"/> AG2 <input type="checkbox"/> AG3
1.3 Horario de apertura:	1.5.1 Seccional policial
1.4 Extensión horaria:	
1.6 Tipo de carnicería:	Tradicional <input type="checkbox"/> Supermercado <input type="checkbox"/>
1.7 Hay clientes al momento de la visita?	Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Cuantos? _____
1.8 Que cantidad promedio de clientes atienden por día?	
1.9 Cuantos kilos de carne venden por día?	
1.10 Cuantas veces por semana repone stock?	
1.11 Quienes son los proveedores?	
1.12 Quienes son los distribuidores?	

Parte 2: Instalaciones

2.1 Antigüedad (años):				
2.2 Cual es el estado de mantenimiento general de las instalaciones?				
<input type="checkbox"/> Muy bueno	<input type="checkbox"/> Bueno	<input type="checkbox"/> Regular	<input type="checkbox"/> Malo	<input type="checkbox"/> Muy malo
2.3 El material de las paredes es lavable?		<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No Material: _____		
2.3.1 Cual es el estado de mantenimiento de las paredes?				
<input type="checkbox"/> Muy bueno	<input type="checkbox"/> Bueno	<input type="checkbox"/> Regular	<input type="checkbox"/> Malo	<input type="checkbox"/> Muy malo
2.4 El material de las pisos es lavable?		<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No Material: _____		
2.4.1 Cual es el estado de mantenimiento de las pisos?				
<input type="checkbox"/> Muy bueno	<input type="checkbox"/> Bueno	<input type="checkbox"/> Regular	<input type="checkbox"/> Malo	<input type="checkbox"/> Muy malo
2.5 El material de los techos/cielorrasos es lavable?		<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No Material: _____		
2.5.1 Cual es el estado de mantenimiento de las techos/cielorrasos?				
<input type="checkbox"/> Muy bueno	<input type="checkbox"/> Bueno	<input type="checkbox"/> Regular	<input type="checkbox"/> Malo	<input type="checkbox"/> Muy malo
2.6 El local tiene zócalo sanitario?		<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No Material: _____		

2.6.1 Cual es el estado de mantenimiento de los zócalos?				
<input type="checkbox"/> Muy bueno	<input type="checkbox"/> Bueno	<input type="checkbox"/> Regular	<input type="checkbox"/> Malo	<input type="checkbox"/> Muy malo
2.7 El local cuenta con desagües?			<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No
2.7.1 Cual es el estado de mantenimiento de los desagües?				
<input type="checkbox"/> Muy bueno	<input type="checkbox"/> Bueno	<input type="checkbox"/> Regular	<input type="checkbox"/> Malo	<input type="checkbox"/> Muy malo
2.8 El local cuenta con instalaciones para el lavado de manos?			<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No
2.8.1 El lavamanos cuenta con (marque con una cruz todo lo que corresponda):				
<input type="checkbox"/> Jabón líquido	<input type="checkbox"/> Accionamiento no manual	<input type="checkbox"/> Dispositivo para secado de manos. Cual? _____	<input type="checkbox"/> Agua caliente	
<input type="checkbox"/> Jabón en barra				
2.9 El local cuenta con baño para el personal?			<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No
2.10 El local cuenta con vestuarios para el personal?			<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No
2.11 El agua proviene de OSE?			<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No Otra: _____
2.11.1 Tiene buena presión de agua?			<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No Observaciones: _____

Parte 3: Personal

3.1 Cantidad de personas que trabajan:		
3.1.1 Femenino		<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No Cuantos: _____
3.1.2 Masculino		<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No Cuantos: _____
3.2 Uniforme de trabajo		Cuál es el estado de higiene?
Casaca	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Muy bueno <input type="checkbox"/> Bueno <input type="checkbox"/> Regular <input type="checkbox"/> Malo <input type="checkbox"/> Muy malo
Pantalon	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Muy bueno <input type="checkbox"/> Bueno <input type="checkbox"/> Regular <input type="checkbox"/> Malo <input type="checkbox"/> Muy malo
Delantal	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Muy bueno <input type="checkbox"/> Bueno <input type="checkbox"/> Regular <input type="checkbox"/> Malo <input type="checkbox"/> Muy malo
Cofia	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Muy bueno <input type="checkbox"/> Bueno <input type="checkbox"/> Regular <input type="checkbox"/> Malo <input type="checkbox"/> Muy malo
Guantes	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Muy bueno <input type="checkbox"/> Bueno <input type="checkbox"/> Regular <input type="checkbox"/> Malo <input type="checkbox"/> Muy malo
Calzalo lavable	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Muy bueno <input type="checkbox"/> Bueno <input type="checkbox"/> Regular <input type="checkbox"/> Malo <input type="checkbox"/> Muy malo
Especificar color del uniforme:		
3.3 Cada cuanto tiempo se lavan los uniformes?		
3.4 Quien lava los uniformes?		<input type="checkbox"/> Cada uno <input type="checkbox"/> Lavadero <input type="checkbox"/> Otro

3.5 Edad del personal que manipula los productos cárnicos		
<input type="checkbox"/> menor de 30 años Cuantos: _____	<input type="checkbox"/> entre 31 y 50 años Cuantos: _____	<input type="checkbox"/> mayor 51 años Cuantos: _____

3.6 Experiencia del personal que manipula los productos cárnicos			
<input type="checkbox"/> menos de 3 meses	<input type="checkbox"/> entre 3 meses y 1 año	<input type="checkbox"/> entre 1 y 5 años	<input type="checkbox"/> mas de 5 años

3.7 Nivel de educación del personal que manipula los productos cárnicos			
<input type="checkbox"/> Ninguna *	<input type="checkbox"/> Primaria _____*	<input type="checkbox"/> Secundaria _____*	<input type="checkbox"/> Otra _____*

* Aclarar la cantidad de personal

Parte 4: Equipos

Equipos	Cant.	Material /es	Estado de mantenimiento	Estado de higiene	Frecuencia de limpieza	El equipo se desarma?	Que detergente utiliza?	Realiza desinfección?
Sierras eléctricas								
Sierras manuales								
Picadora de carne								
Cuchillos P o C								
Chairas P o C								
Ganchos								
Tablas P o C								
Bandejas								
Mesadas de apoyo								
Cajones								

(*) El estado de los equipos refiere a su mantenimiento y se categoriza como Muy bueno, Bueno, Regular, Malo, Muy malo al igual que para las instalaciones.

P = equipo de uso personal

C = equipo de uso compartido

Parte 5: Productos cárnicos

5.1 Que productos se comercializan en el local?			
Carne vacuna	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	
Carne ovina	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	
Carne aviar	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	
Carne de cerdo	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	
Otros alimentos	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	Cuáles? _____
Otros que no sean alimentos	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	Cuáles? _____

5.2 Manipulación de los alimentos			
Contaminación cruzada ¿es posible?		<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	
Especificar cual según categoría			
5.3 Almacenamiento de alimentos			
5.3.1 Condiciones de almacenamiento			
<input type="checkbox"/> Muy bueno	<input type="checkbox"/> Bueno	<input type="checkbox"/> Regular	<input type="checkbox"/> Malo <input type="checkbox"/> Muy malo
5.3.2 Mantenimiento de la cadena de frío			
5.3.2.1 Temperatura vitrinas (en display)			Cuenta con termómetros?
<input type="checkbox"/> $\leq a 5^{\circ}\text{C}$	<input type="checkbox"/> $\geq 5 y \leq 10^{\circ}\text{C}$	<input type="checkbox"/> $\geq a 10^{\circ}\text{C}$	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No Temperatura: _____
<input type="checkbox"/> $\leq a 5^{\circ}\text{C}$	<input type="checkbox"/> $\geq 5 y \leq 10^{\circ}\text{C}$	<input type="checkbox"/> $\geq a 10^{\circ}\text{C}$	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No Temperatura: _____
5.3.2.2 Temperatura producto en vitrina			
<input type="checkbox"/> $\leq a 5^{\circ}\text{C}$	<input type="checkbox"/> $\geq 5 y \leq 10^{\circ}\text{C}$	<input type="checkbox"/> $\geq a 10^{\circ}\text{C}$	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No Temperatura: _____
5.3.2.3 Temperatura cámara (en display)			Cuenta con termómetros?
<input type="checkbox"/> $\leq a 5^{\circ}\text{C}$	<input type="checkbox"/> $\geq 5 y \leq 10^{\circ}\text{C}$	<input type="checkbox"/> $\geq a 10^{\circ}\text{C}$	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No Temperatura: _____
<input type="checkbox"/> $\leq a 5^{\circ}\text{C}$	<input type="checkbox"/> $\geq 5 y \leq 10^{\circ}\text{C}$	<input type="checkbox"/> $\geq a 10^{\circ}\text{C}$	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No Temperatura: _____
5.3.2.4 Temperatura producto en cámara			
<input type="checkbox"/> $\leq a 5^{\circ}\text{C}$	<input type="checkbox"/> $\geq 5 y \leq 10^{\circ}\text{C}$	<input type="checkbox"/> $\geq a 10^{\circ}\text{C}$	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No Temperatura: _____

5.3.3 Cámara de frío		
Material paredes:	Material piso:	Material techo:
Estado paredes:	Estado piso:	Estado techo:
Higiene paredes:	Higiene piso:	Higiene techo:
Orden:	Sectorización:	

Parte 6: Higiene

6.1 Cual es el estado higiénico general de las instalaciones?				
<input type="checkbox"/> Muy bueno	<input type="checkbox"/> Bueno	<input type="checkbox"/> Regular	<input type="checkbox"/> Malo	<input type="checkbox"/> Muy malo
6.2 Cual es el estado de higiene de la/s cámaras?				
<input type="checkbox"/> Muy bueno	<input type="checkbox"/> Bueno	<input type="checkbox"/> Regular	<input type="checkbox"/> Malo	<input type="checkbox"/> Muy malo
6.3 Cual es el estado de higiene de los vitrinas?				
<input type="checkbox"/> Muy bueno	<input type="checkbox"/> Bueno	<input type="checkbox"/> Regular	<input type="checkbox"/> Malo	<input type="checkbox"/> Muy malo
6.4 Cual es el estado de higiene de los personal?				
<input type="checkbox"/> Muy bueno	<input type="checkbox"/> Bueno	<input type="checkbox"/> Regular	<input type="checkbox"/> Malo	<input type="checkbox"/> Muy malo
6.5 Cual es el estado de higiene de los baños?				
<input type="checkbox"/> Muy bueno	<input type="checkbox"/> Bueno	<input type="checkbox"/> Regular	<input type="checkbox"/> Malo	<input type="checkbox"/> Muy malo
6.6 Cual es el estado de higiene de los vestuarios?				
<input type="checkbox"/> Muy bueno	<input type="checkbox"/> Bueno	<input type="checkbox"/> Regular	<input type="checkbox"/> Malo	<input type="checkbox"/> Muy malo
6.7 Cual es la frecuencia con que se realiza la limpieza de la infraestructura de la zona de elaboración (paredes, pisos)?				
<input type="checkbox"/> 1 vez por día	<input type="checkbox"/> mas de 1 vez por día	<input type="checkbox"/> Semanal	<input type="checkbox"/> Mensual	<input type="checkbox"/> Otro
6.7.1 Se realiza desinfección?		<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No Producto: _____		
6.8 Higiene de manos del personal				
6.8.1 Cual es la frecuencia de higiene de las manos del personal?				
<input type="checkbox"/> Antes de comenzar a trabajar	<input type="checkbox"/> Toda vez que toca algún elemento que no es carne	<input type="checkbox"/> Luego de ir al baño	<input type="checkbox"/> Cuando se ha manipulado previamente carne de otra especie	
6.8.2 Que productos utiliza para el lavado de manos?				
<input type="checkbox"/> Solo jabón	<input type="checkbox"/> Jabón y desinfectante	<input type="checkbox"/> Solo desinfectante	<input type="checkbox"/> Agua caliente	<input type="checkbox"/> Otro
Cual:		Cual:		
6.8.3 Que cantidad de detergente consume mensualmente?				
6.8.4 Que cantidad de desinfectante consume mensualmente?				

Parte 7: Control de plagas

Realizan control de plagas?	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	
El mismo es tercerizado?	<input type="checkbox"/> Si	<input type="checkbox"/> No	Especifique empresa: _____
Que productos utilizan?			

Parte 8: Muestreo

Muestras	Cantidad
1. Mesadas	
2. Tablas	
3. Mangos de cuchillos	
4. Picadora de carne	

Observaciones: