

Indicadores de calidad sanitaria y fenotipificación de *Salmonella enterica* aislada de pollo crudo comercializado en el área urbana de Mérida, Venezuela

Sanitary quality indicators and phenotyping of *Salmonella enterica* isolated from raw chickens marketed in urban area of Mérida, Venezuela.

Noreldy Molina^{1,2}, Beatriz Millán^{1,2}, María Araque²

Resumen

Objetivo: Evaluar la calidad sanitaria del pollo crudo que se expende en supermercados del área urbana del estado Mérida, Venezuela, y caracterizar fenotípicamente las cepas aisladas de *Salmonella enterica*.

Materiales y métodos: Se estudiaron 45 muestras de pollo crudo (15 correspondieron a pollo sin aliños, 15 con aliños y 15 de origen industrial). Los indicadores de calidad sanitaria evaluados fueron: bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, utilizando la metodología de la Comisión Venezolana de Normas Industriales. La identificación microbiológica y serológica de *Salmonella* spp. se realizó mediante técnicas convencionales. La sensibilidad antimicrobiana se determinó por concentración inhibitoria mínima (CIM) y, para

la detección de β -lactamasas de espectro expandido (BLEE), se utilizó la prueba del sinergismo del doble disco. La sensibilidad a desinfectantes se determinó por el método de dilución-neutralización.

Resultados: Independientemente de las características de la muestra de pollo crudo (no industrial) y del establecimiento comercial, los indicadores: bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales, *E. coli* y *S. aureus*, superaron significativamente los recuentos límites de aceptabilidad. *Salmonella enterica* se aisló en 20% de las muestras, y las serovariedades Heidelberg (55,6%) y Enteritidis (22,2%) fueron las más frecuentes. Estas variedades serológicas presentaron multirresistencia y producción de BLEE, pero fueron sensibles a los desinfectantes probados.

Correspondencia:

María Araque, M.D., Ph.D., Laboratorio de Microbiología Molecular, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Sector Campo de Oro, Mérida 5101, Venezuela. araquemc@ula.ve

Recibido: 07/06/2010; Aceptado: 30/08/2010

1 Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela.

2 Laboratorio de Microbiología Molecular, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Conclusión: Los pollos crudos con aliños y sin ellos, manufacturados en los establecimientos estudiados, no cumplen con la calidad microbiológica adecuada, lo que hace de ellos un producto perecedero a corto plazo y un nicho favorecedor de patógenos importantes que amenazan la salud de los consumidores.

Palabras clave: calidad sanitaria, pollo, *Salmonella enterica*, Venezuela.

Abstract

Objectives: Evaluate the sanitary quality of raw chicken sold in the urban area of the State of Merida, Venezuela and characterize the phenotype of isolated *Samonella enterica* strains.

Materials and methods: A total of 45 raw chicken samples were studied; 15 of them were without seasoning, 15 were with seasoning, and 15 were industrially processed. The following sanitary quality indicators were assessed: Mesophiles Aerobic Bacteria (MAB), total coliforms, *E. coli* and *S. aureus*, and the Venezuelan Commission of Industrial Norms methodology was used for that purpose. Microbiological and serological identification of *Salmonella* was carried out using conventional techniques. Antimicrobial susceptibility was determined by minimal inhibitory concentration (MIC) and the detection of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) was carried out by using the double disc synergy test. Susceptibility to disinfectants was determined by the dilution-neutralization method. Results. Regardless of the (not industrial) samples' characteristics and/or the commercial establishment, it was determined that the ranges for MAB, total coliform, *E. coli* and *S. aureus* counts significantly exceeded limits of acceptability. Strains of *Salmonella enterica* were isolated in 20% of the samples,

whose distribution showed that serovars Heidelberg (55.6%) and Enteritidis (22.2%) were the most frequent. These serovars showed multi-resistance to antibiotics and ESBLs production but were susceptible to the tested disinfectants. Conclusion. This study showed that raw chickens, with and without seasoning, processed in the surveyed commercial establishments do not meet the required microbiological quality standards suitable for human consumption. Therefore, these are short-term perishable products and a haven for important pathogens that threaten consumer health.

Keywords: Sanitary quality, chicken, *Salmonella enterica*, Venezuela

Introducción

Las enfermedades transmitidas por alimentos constituyen un importante problema de salud pública mundial por su magnitud, impacto socioeconómico y por el surgimiento de patógenos emergentes⁽¹⁾. Se estima que entre 15% y 20% de dichas enfermedades están directamente asociadas al consumo de carne de pollo o sus derivados^(2,3).

La inocuidad microbiológica de los alimentos es una condición indispensable para garantizar la salud de los consumidores⁽⁴⁾. En el caso de los productos avícolas, las operaciones de beneficio tales como escaldadura, desplumadura, evisceración y despiezo, constituyen los puntos sensibles de contaminación microbiana. Asimismo, la contaminación cruzada de equipos y utensilios, y la manipulación del producto, sirven de vías de transmisión para microorganismos patógenos, especialmente *Salmonella* spp.⁽⁵⁾.

En Venezuela, la incidencia de las enfermedades transmitidas por alimentos por *Salmonella* spp. es poco conocida, excepto algunos casos que se encuentran

documentados en el Sistema Regional de Información para la Vigilancia de la Enfermedades Transmitidas por Alimentos (SIR-VIETA) ⁽⁶⁾. Sin embargo, paradójicamente se aíslan con frecuencia cepas de *Salmonella* causantes de diarreas, especialmente en la población infantil, las cuales pudieran tener características microbiológicas y serológicas semejantes a las cepas de *Salmonella* que circulan en los alimentos y, específicamente, las encontradas en el pollo ⁽⁷⁻⁹⁾.

Por otra parte, es importante destacar que el uso indiscriminado de los antibióticos, tanto en animales como en el hombre, así como de los biocidas en la saneamiento de la industria de alimentos, ha favorecido la selección, circulación y transmisión de cepas de *Salmonella* multirresistentes a los agentes antimicrobianos y a los desinfectantes ^(10,11). Por consiguiente, la cadena alimentaria, especialmente en su fase primaria o inicial, ha jugado un papel preponderante en el incremento del riesgo epidemiológico de las enfermedades transmitidas por alimentos y en la diseminación de genes de resistencia en la población bacteriana.

Por lo antes expuesto, el objetivo de este estudio fue evaluar la calidad sanitaria de la carne de pollo crudo que se expende bajo diversas presentaciones en supermercados del área urbana del estado Mérida, Venezuela, y caracterizar fenotípicamente las cepas de *Salmonella enterica* aisladas en estas muestras.

Materiales y métodos

Recolección de las muestras. Se recolectaron 45 muestras de pollo crudo, distribuidas de la siguiente manera: 15 sin aliños, 15 con aliños (no industriales) y 15 de empaques preparados de tipo industrial. Estas muestras se obtuvieron de tres supermercados ubicados en las zonas norte (supermercado

A), centro (supermercado B) y sur (supermercado C), del área urbana del Distrito Libertador del estado Mérida, Venezuela.

La cantidad de muestra recolectada osciló entre 250 g y 500 g por presentación. El muestreo se llevó a cabo durante el período de julio a septiembre de 2009. La recolección se realizó cada 15 días en cinco oportunidades en forma simultánea para cada establecimiento. La programación de la recolección se organizó de acuerdo con la disponibilidad del producto para la venta al público y a la obtención de muestras provenientes de diferentes lotes de elaboración.

Los establecimientos comerciales fueron seleccionados de acuerdo con el registro de la Cámara de Industria y Comercio de la región y clasificados como supermercados por la misma entidad. Las características de estos supermercados fueron: áreas de operación entre 1.000 y 1.400 m², infraestructura e instalaciones de servicios modernas, estar incluidos dentro de la categoría de comercios de consumo masivo variado, tener condiciones óptimas para el expendio de alimentos según regulaciones para el otorgamiento del permiso sanitario y estar ubicados en zonas urbanas de fácil acceso para la población.

Determinación de indicadores de calidad sanitaria. El procesamiento de las muestras de carne de pollo para la determinación de calidad sanitaria, se realizó según la norma N° 1116 de la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) ⁽¹²⁾. A partir de 10 g de cada muestra de pollo homogeneizados en 90 ml agua con peptona al 0,1% (dilución 10⁻¹), se prepararon 5 diluciones (10⁻² a 10⁻⁵). De cada una de estas diluciones se tomó un ml y se inocularon los siguientes medios por duplicado: placas con agar de conteo estándar (HiMedia, Mumbai, India) para la determinación de bacterias aerobias

mesófilas⁽¹³⁾, placas rehidratables para el recuento de coliformes, *Escherichia coli* [RIDA Count *E. coli* / Coliformes, R-Biopharm AG (certificación AOAC 110402)] y *Staphylococcus aureus* (RIDA Count *S. aureus*, R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany).

Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (UFC/g muestra). El conteo de coliformes, *E. coli* y *S. aureus* se realizó de acuerdo con las recomendaciones del proveedor (R-Biopharm AG).

La interpretación de los resultados del análisis de la calidad microbiológica de las muestras de carne pollo, específicamente para los datos de bacterias aerobias mesófilas, se realizó de acuerdo con los parámetros establecidos por la norma N° 2343 (COVENIN)⁽¹⁴⁾. Para el resto de los indicadores evaluados (coliformes totales, *E. coli* y *S. aureus*), se utilizaron normas vigentes en otros países latinoamericanos⁽¹⁵⁻¹⁸⁾ y de la Unión Europea⁽¹⁹⁾.

Teniendo en cuenta las normas antes señaladas, los resultados fueron expresados de la siguiente manera: aceptables cuando los valores se ubicaron dentro de los límites normales descrito por la norma y, rechazables, cuando los datos superaron los rangos establecidos en ésta.

Aislamiento de cepas de *Salmonella* spp.

Para la determinación de cepas de *Salmonella* en carne de pollo se siguieron las recomendaciones de la *Food and Drug Administration* (FDA) de los Estados Unidos⁽²⁰⁾ y la norma N° 1291 (COVENIN)⁽²¹⁾. A todas las cepas de *Salmonella* aisladas se les detectaron por ensayos de amplificación PCR el gen *invA* (no se incluyen los resultados). Se pesaron 25 g de cada muestra de pollo y se homogeneizaron en 225 ml de caldo con lactosa. Estos caldos se incubaron a 35 °C

por 24 horas. Luego se realizaron dos diluciones (1:10), una en caldo Rappaport Vassiliadis (Oxoid Ltd, Cambridge, England) y otra en tetratiónato (Merck, Darmstadt, Germany), y se incubaron a 44 °C y 37 °C, respectivamente, por 18 a 24 horas. Cada uno de estos caldos se subcultivaron en medios selectivos (HiMedia): agar Hektoen entérico, agar xilosa lisina desoxicolato y agar sulfito de bismuto, los cuales se incubaron a 35 °C por 24 horas. Por cada medio selectivo se seleccionaron cinco colonias típicas o sospechosas de *Salmonella* spp. y se sometieron individualmente a una batería inicial de pruebas bioquímicas. Posteriormente, la identificación de las cepas fue confirmada utilizando las galerías API 20E (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France), de acuerdo con las especificaciones del proveedor.

La identificación serológica de las cepas de *Salmonella* se hizo mediante ensayos de aglutinación con antisueros polivalente O y específicos para los serogrupos (Remel Wellcolex Colour *Salmonella*, Lenexa, KS, USA). La serotipificación definitiva de las cepas de *Salmonella* se llevó a cabo en el laboratorio de referencia oficial, el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas, Venezuela, de acuerdo con las pautas internacionales aprobadas por la Organización Mundial de la Salud.

Pruebas de sensibilidad antimicrobiana.

La sensibilidad antimicrobiana de las cepas de *Salmonella* se determinó utilizando la técnica de concentración inhibitoria mínima (CIM) en agar Mueller Hinton (BBL, Cockeysville, Md, USA), de acuerdo con los criterios de *Clinical and Laboratory Standards Institute*⁽²²⁾. Los antimicrobianos evaluados fueron: ampicilina (Valmorca, Mérida, Venezuela), cefazolina (Genven, Caracas, Venezuela), cefadroxilo (Vivax Pharmaceuticals, Caracas, Venezuela), cefotaxima (Genven), ceftazidima (Valmorca), piperacilina/tazobactam (Wyeth-Lederle, Pearl River, NY, USA), az-

treonam (Bristol-MyersSquibb, Princeton, NJ, USA), meropenem (Richet, B.A, Argentina), ciprofloxacina (Bayer, Leverkusen, Germany), gentamicina (Farmachem, Mendrisio, Switzerland), tobramicina (Valmorca), amikacina (Vivax Pharmaceuticals), netilmicina (Shering-Plough, Bloomfield, NJ, USA), trimetoprim/sulfametoxazol (Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ, USA), doxiciclina (Calox Internacional, Caracas, Venezuela) y cloramfenicol (Laboratorios BioGer, Caracas, Venezuela).

Todas las cepas con resistencia a los antibióticos β -lactámicos de amplio espectro fueron evaluadas fenotípicamente para la presencia de β -lactamasas de espectro expandido (BLEE), utilizando la prueba del sinergismo del doble disco ⁽²³⁾. Los discos utilizados en esta prueba fueron (BBL): amoxicilina/ácido clavulánico (75/10 μ g), ceftazidima (30 μ g), ceftriaxona (30 μ g), cefotaxima (30 μ g) y aztreonam (30 μ g). Para las pruebas de sensibilidad y la prueba del sinergismo del doble disco se utilizó como cepa control *E. coli* ATCC 25922 (BLEE negativa).

Prueba de sensibilidad a desinfectantes.

La sensibilidad de las cepas de *Salmonella* frente a los desinfectantes, se determinó utilizando el método de dilución-neutralización de acuerdo con la técnica normalizada por la Asociación Francesa de Normalización (AFNOR) ⁽²⁴⁾ y la Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR) ⁽²⁵⁾.

Los desinfectantes evaluados fueron: bromuro de lauril-dimetil bencilamonio 0,16% vol/vol (Gerdex: Rodeneza, C.A, Caracas, Venezuela), hipoclorito de sodio 5% vol/vol (uso comercial) y ácido acético 5% vol/vol (uso doméstico). El rango de diluciones evaluadas fueron: 1:20 (50.000 ppm), 1:50 (20.000 ppm) y 1:100 (10.000 ppm). Los tiempos de acción estudiados para los tres desinfectantes fueron 30 segundos, 1, 2, 3, 5, 10 y 15 minutos a 20 °C.

Los ensayos se realizaron en caldo Letheen (HiMedia), a partir de un inóculo inicial estandarizado de 1 a 3 x 10⁸ UFC/ml. Como control de la viabilidad bacteriana se empleó la cepa de *S. Typhi* LabMM-8. La inhibición bacteriana o efecto biocida se consideró positivo cuando las UFC/ml iniciales disminuyeron en 5 unidades logarítmicas (10⁵) en 5 minutos de contacto con el desinfectante a 20 °C. El factor de reducción (Log₁₀) se calculó dividiendo el número de UFC/ml sobrevivientes después del ensayo entre el número de UFC/ml utilizadas en las pruebas de control.

Resultados

En la tabla 1, se presentan los resultados de la determinación de los indicadores sanitarios estudiados en las muestras de pollo de crudo. Los resultados obtenidos indican que, independientemente del lugar de expendio del producto, casi todas las muestras de pollo con aliños y sin ellos (no industriales) fueron consideradas rechazadas para el recuento de bacterias aerobias mesófilas, de acuerdo con los valores de referencia descritos en la normativa nacional (COVENIN), los cuales indican como rango aceptable 6,70 a 7,70 Log₁₀ UFC/g.

Aunque en Venezuela no se han definido los criterios para categorizar los recuentos de coliformes totales, *E. coli* y *S. aureus* en pollo, los resultados obtenidos de estas determinaciones fueron comparados con las normativas de otros países. De manera que los valores obtenidos para coliformes totales en la mayoría de las muestras (no industriales) superaron los criterios de aceptabilidad para las normas de Argentina, Nicaragua y Perú (2-2,69; 2,70-3 y 0-2 Log₁₀ UFC/g, respectivamente).

En cuanto a los resultados obtenidos para las determinaciones de *E. coli*, se pudo observar que, aproximadamente, 10 de las 15

Tabla 1. Determinación de los indicadores sanitarios en las muestras de carne de pollo crudo

Tipo de muestra	Origen*	BAM			Coliformes totales			<i>Escherichia coli</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
		Rango	Nº/%		Rango	Nº/%		Rango			Rango	Nº/%	
		Log ₁₀ UFC/g	Ac	R	Log ₁₀ UFC/g	Ac	R	Log ₁₀ UFC/g	Ac	R	Log ₁₀ UFC/g	Ac	R
Pollo con aliños	A	6,58 - 8,26	1/20	4/80	0 - 5,18	1/20	4/80	0 - 4,34	4/80	1/20	4,32 - 6,60	0/0	5/100
	B	7,76 - 7,93	0/0	5/100	0 - 7,49	1/20	4/80	0 - 0	5/100	0/0	4,56- 5,68	0/0	5/100
	C	6,89 - 8,42	1/20	4/80	3,43 - 5,15	0/0	5/100	0 - 4,32	1/20	4/80	0 - 4,99	1/20	4/80
Pollo sin aliños	A	6,10 - 6,75	5/100	0/0	0 - 4,90	1/20	4/80	0 - 4,88	2/40	3/60	0 - 4,46	1/20	4/80
	B	6,95 - 7,95	2/40	3/60	5,20 - 6,95	0/0	5/100	0 - 4,04	2/40	3/60	0 - 5,68	1/20	4/80
	C	6,07 - 8,11	1/20	4/80	0 - 6,74	2/40	3/60	0 - 4,48	3/60	2/40	0 - 4,43	1/20	4/80
Pollo empacado industrial	A	2,08 - 6,19	5/100	0/0	0 - 0	5/100	0/0	0 - 0	5/100	0/0	0 - 0	5/100	0/0
	B	3,90 - 6,17	5/100	0/0	0 - 3,08	4/80	1/20	0 - 3,08	4/80	1/20	0 - 4,78	3/60	2/40
	C	4,16 - 6,56	5/100	0/0	0 - 0	5/100	0/0	0 - 0	5/100	0/0	0 - 0	5/100	0/0

* Ubicación del establecimiento comercial (supermercado) donde la cepa fue aislada: A, zona norte; B, zona centro; C, zona sur.

BAM: bacterias aerobias mesófilas; Ac: aceptable; R: rechazado

muestras de pollo con aliños tuvieron valores aceptables para este indicador, de acuerdo con las normas de los países antes señalados e incluso con los de Panamá y la Comisión Europea (3; 1,69-2,70 Log₁₀ UFC/g, respectivamente). Por el contrario, más de la mitad de las muestras de pollo sin aliños mostraron resultados que superaron los valores de aceptabilidad para el recuento de *E. coli*.

La mayoría de las muestras de pollo con aliños o sin ellos fueron consideradas como rechazadas al comparar los resultados de los recuentos para *S. aureus* con las normativas de Argentina, Nicaragua y Perú (2-2,69; 2,70-3; 0-2, Log₁₀ UFC/g, respectivamente). Todas las muestras de pollo industrial provenientes de los supermercados estudiados presentaron valores para bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales, *E. coli* y *S. aureus* aceptables, independientemente de la norma con la cual se compararon. Sólo en el caso del supermercado B, cuatro muestras de pollo procesado industrialmente presentaron valores superiores a los permitidos

para los siguientes indicadores: coliformes totales y *E. coli* (1/20, respectivamente) y *S. aureus* (2/40).

Paralelamente, las muestras de pollo fueron analizadas microbiológicamente para la caracterización de las cepas de *Salmonella*. El 20% de las muestras procesadas (9/45) fueron positivas para este enteropatógeno. Seis de estas cepas (13,33%) se encontraron en muestras de pollo sin aliños en los tres supermercados estudiados (dos cepas en cada supermercado) y tres fueron aisladas de pollo con aliños (6,66%), dos cepas en el supermercado A y una en el establecimiento C (no se presentan los datos).

Las cepas fueron identificadas como *S. enterica*: seis pertenecían al subgrupo B, dos al D1 y una al E1 (tabla 2). Se reconocieron cuatro serovariedades: Heidelberg (5/55,6%), Enteritidis (2/22,2%), Typhimurium (1/11,1%) y Meleagridis (1/11,1%). En el supermercado A, se encontraron las serovariedades Enteritidis y Heidelberg en

Tabla 2. Identificación microbiológica y serológica de cepas de *Salmonella* spp. aisladas de carne de pollo crudo

Origen*	Tipo de muestra	Cepa N°	Perfil API 20E	Especie	Serogrupo	Serovariedades
A	Pollo SA	170	670455257	<i>S. enterica</i>	D1	Enteritidis
A	Pollo CA	175	670455257	<i>S. enterica</i>	B	Heidelberg
A	Pollo CA	179	670455257	<i>S. enterica</i>	B	Heidelberg
A	Pollo SA	218	670455257	<i>S. enterica</i>	D1	Enteritidis
B	Pollo SA	182	670455257	<i>S. enterica</i>	B	Heidelberg
B	Pollo SA	288	670455257	<i>S. enterica</i>	B	Heidelberg
C	Pollo SA	105	670455257	<i>S. enterica</i>	B	Heidelberg
C	Pollo CA	120	670475257	<i>S. enterica</i>	B	Typhimurium
C	Pollo SA	300	670475257	<i>S. enterica</i>	E1	Meleagridis

* Ubicación del establecimiento comercial (supermercado) donde la cepa fue aislada: A, zona norte; B, zona centro; C, zona sur
 Pollo SA: pollo sin aliños; Pollo CA: pollo con aliños.

muestras de pollo con aliños y sin ellos en igual proporción (dos para cada uno), mientras que en muestras de pollo sin aliñar del supermercado B, sólo se identificó la serovariedad Heidelberg. En las muestras provenientes del supermercado C, se encontraron tres de las cuatro serovariedades identificadas (Heidelberg, Typhimurium y Meleagridis).

Todas las cepas fueron sensibles al meropenem y al grupo de aminoglucósidos probados y resistentes al trimetoprim/sulfametoxazol con CIM superiores a 16/304 µg/ml. El 66,67% de las cepas mostraron resistencia a ampicilina, cefazolina con rangos inhibitorios de 16 µg/ml o mayores y a dociciclina con CIM mayores de 8 µg/ml, siguiéndole en orden de frecuencia la resistencia a cefradroxilo y cefotaxima (55,56%). En tercer lugar, con 44,44%, se ubicaron las cepas con resistencia a ceftazidima y aztreonam (tabla 3).

En la tabla 4, se observa que seis cepas presentaron patrones de resistencia múltiple, los cuales se distribuyeron de la siguiente manera: dos cepas (Heidelberg y Meleagridis) fueron resistentes a tres antibióticos de

Tabla 3. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) en serovariedades de *Salmonella enterica* aisladas de carne de pollo crudo a 16 antibióticos

Antibiótico	CIM	N° de cepas			Resistencia (%)
		S	I	R	(n=9)
Ampicilina	2 - \geq 128	3	0	6	66,67
Piperacilina/tazobactam	4 - \geq 128	4	4	1	11,11
Cefazolina	2 - \geq 128	3	0	6	66,67
Cefadroxilo	16 - 128	0	4	5	55,56
Cefotaxima	0,25 - \geq 256	4	0	5	55,56
Ceftazidima	0,25 - 32	4	1	4	44,44
Aztreonam	0,5 - 64	5	0	4	44,44
Meropenem	0,062 - 0,125	9	0	0	0
Amikacina	2 - 8	9	0	0	0
Gentamicina	0,5 - 1	9	0	0	0
Netilmicina	1 - 4	9	0	0	0
Tobramicina	0,25 - 0,5	9	0	0	0
Ciprofloxacina	0,062 - 4	6	1	2	22,22
Doxiciclina	2 - 64	2	1	6	66,67
Cloranfenicol	\leq 0,25 - \geq 128	8	0	1	11,11
Trimetoprim/sulfametoxazol	$>$ 16/304	0	0	9	100

S: sensible; I: intermedia; R: resistente

grupos diferentes (cefazolina, doxicilina y trimetoprim-sulfametoxazol), y cinco cepas, todas serovariedad Heidelberg, demostraron combinaciones de resistencia a ampicilina, piperacilina/tazobactam, cefalosporinas (primera, segunda y tercera generación), aztreonam, ciprofloxacina, doxiciclina y trimetoprim/sulfametoxazol. A cuatro cepas de la serovariedad Heidelberg y una Enteritidis (cepas número 105, 175, 179, 288 y 170, respectivamente) con resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro, se les detectó fenotípicamente la producción de β -lactamasas de espectro expandido. Del mismo modo, se evaluó el efecto inhibitorio de tres desinfectantes representados por el hipoclorito de sodio (NaClO), el bromuro de lauril-dimetil-bencil-amonio y el ácido acético (CH₃COOH). En todas las cepas se logró disminuir sustancialmente las UFC/ml en cinco o más órdenes de magnitud para cada desinfectante en las tres diluciones evaluadas (1:20, 1:50 y 1:100) en un tiempo de cinco o menos minutos (tabla 5).

Discusión

En este estudio se utilizaron varios indicadores microbiológicos para valorar la calidad sanitaria del pollo crudo con aliños y sin ellos (no industriales), que se expende en tres diferentes supermercados ubicados en el área urbana del estado Mérida, Venezuela. Los resultados obtenidos demostraron que, independientemente del establecimiento comercial, los valores obtenidos para bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales y *S. aureus* en la mayoría de las muestras de pollo con aliños, superaron significativamente los recuentos límites de aceptabilidad, no sólo los vigentes para Venezuela, sino también los criterios válidos para otros países de Latinoamérica ⁽¹⁵⁻¹⁸⁾ y Europa ⁽¹⁹⁾. Sin embargo, se pudo observar que casi todas las muestras de pollo con aliños provenientes de los supermercados A y B, demostraron recuentos de *E. coli* aceptables.

Por el contrario, cuando se analizaron las muestras de pollo sin aliños (no industrial), casi la mitad de éstas tuvieron elevados recuentos de bacterias aerobias mesófilas y, en su mayoría, estas mismas muestras fueron consideradas como rechazadas para los indicadores coliformes totales, *E. coli* y *S. aureus*.

Estos resultados avalan el hecho de que durante el procesamiento artesanal de alimentos, los riesgos de contaminación bacteriana aumentan debido a la realización de un mayor número de etapas en forma manual, es decir, una manipulación extensiva favorece los riesgos de contaminación cruzada ⁽²⁾. Es probable que en las muestras analizadas, algunas de las etapas con probabilidades de contaminación microbiológica hayan sido la desolladura, el despiezo, la condimentación o el empaque del pollo. Además, el recuento elevado en los indicadores microbiológicos predice el deterioro precoz del producto estudiado.

Por el contrario, cuando los mismos criterios microbiológicos fueron aplicados a las muestras de pollo crudo de origen industrial, se observó que todas las muestras resultaron aceptables para las determinaciones realizadas, excepto algunas muestras provenientes del supermercado B que, de acuerdo con las normas aplicadas, demostraron valores superiores de recuento para coliformes totales, *E. coli* y *S. aureus*.

Al respecto, la presencia de *S. aureus* en un alimento es indicativa de una probable contaminación por fuentes humanas (manipuladores de alimentos), así como de deficientes prácticas de limpieza, desinfección y control de temperaturas. Por tanto, existe el riesgo de que, con recuentos elevados de este microorganismo en alimentos, se encuentren cepas productoras de enterotoxinas capaces de producir intoxicación alimentaria.

Tabla 4. Perfiles de resistencia y detección de β -lactamasas de espectro expandido en serovariedades de *Salmonella enterica* aisladas de carne de pollo crudo

Origen ¹	Cepa N°	Serovariedad	Perfil de resistencia	BLEE PSDD
A	170	Enteritidis	AMP-CFD-CFX-TMP/SLF	+
A	175	Heidelberg	AMP-CFZ-CFD-CFX-CTZ-AZT-CPF-DXC-TMP/SLF	+
A	179	Heidelberg	AMP-CFZ-CFD-CFX-CTZ-AZT-CPF-DXC-TMP/SLF	+
A	218	Enteritidis	AMP-TMP/SLF	NA
B	182	Heidelberg	CFZ-DXC-TMP/SLF	NA
B	288	Heidelberg	AMP-PPC/TAZ-CFZ-CFD-CFX-CTZ-AZT-DXC-TMP/SLF	+
C	105	Heidelberg	AMP-CFZ-CFD-CFX-CTZ-AZT-DXC-TMP/SLF	+
C	120	Typhimurium	CLF-TMP/SLF	NA
C	300	Meleagridis	CFZ-DXC-TMP/SLF	NA

¹ Ubicación del establecimiento comercial (supermercado) donde la cepa fue aislada: A, zona norte; B, zona centro; C, zona sur
 AMP: ampicilina; CFZ: cefazolina; CFD: cefadroxilo; CFX: cefotaxima; CTZ: ceftazidima; AZT: aztreonam; PPC/TAZ: piperacilina/tazobactam; CLF: cloramfenicol; DXC: doxiciclina; CPF: ciprofloxacina; TMP/SLF: trimetoprim/sulfametoxazol; BLEE PSDD: -lactamasa de espectro expandido prueba del sinergismo del doble disco; NA: no aplicable; +: detección positiva.

En investigaciones previas se han reportado resultados similares a los encontrados en este estudio, en el que la deficiente calidad sanitaria de algunos productos avícolas que se expenden comercialmente constituye un riesgo para la salud de los consumidores ^(3,26-29).

Aunque el análisis de las diferentes etapas del proceso que conllevan al producto final que se expende en los supermercados seleccionados no fue objeto de estudio en este trabajo, los resultados obtenidos a partir de los indicadores microbiológicos estudiados, puso en evidencia la deficiente calidad microbiológica y los posibles riesgos que tienen las muestras analizadas para la salud de los consumidores. De hecho, en las muestras de pollo procesadas (no industriales) se logró aislar cepas de *S. enterica* en 20%, de las cuales las serovariedades Heidelberg y Enteritidis fueron las más frecuentes. Resultados similares fueron reportados por Boscán *et al.* ⁽³⁾ y Pérez *et al.* ⁽³⁰⁾, quienes aislaron *Salmonella* en 23% de las muestras de pollo provenientes de plantas

procesadoras de este tipo de carne.

En Venezuela no se conoce con exactitud la frecuencia de las serovariedades de *Salmonella* en muestras de alimentos. Sin embargo, Boscán *et al.* ⁽³⁾, en un estudio realizado en muestras de pollo beneficiado, reportaron la serovariedad Heidelberg como la segunda más frecuentemente aislada (31%). Por otra parte, Foley *et al.* ⁽³¹⁾ hicieron una revisión sobre la seroprevalencia de *Salmonella* en alimentos de origen animal desde el año 1997; encontraron que la serovariedad Heidelberg se aísla en más de 50% de los pollos infectados y es la tercera más frecuentemente aislada en brotes de infección por alimentos en humanos en Estados Unidos.

Las serovariedades Enteritidis y Typhimurium fueron aisladas en este estudio en un 22,2% y 11,1%, respectivamente. Estas serovariedades clásicamente son las que con mayor frecuencia se encuentran en muestras humanas ^(7-9,32). Por primera vez en Venezuela, *S. Meleagridis* se ha reportado en muestras

de pollo crudo (no industrial) para consumo humano. Zaidi *et al.* ⁽³³⁾, en un trabajo de revisión realizado en Yucatán, México, en el período 2000-2002, encontraron *Salmonella* Meleagridis en el primer lugar en muestras de carne de cerdo (15,2%) y bovina (27,9%) y en un cuarto lugar en piezas de pollo (9,8%) comercializadas al detal.

Es importante destacar que la presencia de *Salmonella* spp. en alimentos de origen avícola altera la inocuidad del producto ^(26,27). Este peligro microbiológico puede incrementarse al tratarse de cepas multirresistentes, producto del uso indiscriminado de antimicrobianos para tratar las infecciones en aves o para promover el engorde del animal.

En este estudio, el 100% de las cepas fueron resistentes a trimetoprim/sulfametoxazol y, de ellas, más de la mitad, presentaron diversas combinaciones de resistencia a otros antibióticos. En cinco cepas (cuatro Heidelberg y una Enteritidis) que incluyeron en sus

patrones de resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro, se detectó fenotípicamente BLEE. Miriagou *et al.* ⁽³⁴⁾ afirman que desde los años 80 se han detectado diversos serotipos de *Salmonella* productoras de BLEE y sugieren que una variedad de plásmidos que portan genes que codifican para estas enzimas se han establecido en *Salmonella* en todo el mundo. Al respecto, O'Mahony *et al.* ⁽³⁵⁾ identificaron un integrón de clase 1 en plásmidos de conjugación aislados de *Salmonella* Typhimurium y Anatum multirresistentes provenientes de diversas muestras de alimentos en Colombia. Patchanee *et al.* ⁽¹¹⁾ señalan que el incremento de la resistencia de *S. Heidelberg* a cefalosporinas de tercera generación, puede estar condicionada por el uso del ceftiofur, una cefalosporina de uso veterinario.

Por otra parte, los resultados de este estudio permitieron evidenciar que todas las cepas de *Salmonella* aisladas fueron inhibidas por los tres desinfectantes probados (hipoclorito

Tabla 5. Susceptibilidad de serovariedades de *S. enterica* a tres desinfectantes*

Origen ¹	Cepa	<i>S. enterica</i>	Desinfectantes Diluciones Factor de reducción en Log ₁₀ ²								
			NaClO			BLBA			CH ₃ COOH		
			1/20	1/50	1/100	1/20	1/50	1/100	1/20	1/50	1/100
A	170	Enteritidis	6,30	6,11	5,28	5,91	5,23	4,68	5,68	5,02	4,23
A	175	Heidelberg	6,42	6,20	5,72	6,18	5,49	4,80	6,24	5,12	4,35
A	179	Heidelberg	6,37	6,10	5,23	6,42	5,47	4,72	6,02	4,94	4,01
A	218	Enteritidis	6,24	6,08	5,11	6,19	5,80	5,02	5,88	4,91	3,98
B	182	Heidelberg	5,93	5,39	4,87	5,76	5,69	4,92	6,08	4,95	4,02
B	288	Heidelberg	6,30	5,97	5,02	5,69	5,02	4,02	5,67	4,39	3,82
C	105	Heidelberg	6,67	6,21	5,68	6,20	5,94	4,79	5,93	4,95	3,97
C	120	Typhimurium	5,96	5,32	4,73	5,84	5,14	4,26	5,77	4,78	3,26
C	300	Meleagridis	6,21	5,92	4,77	5,95	5,23	4,36	5,83	4,81	3,33

* Los resultados corresponden a la actividad del desinfectante durante 5 minutos a 20 °C. ¹ Ubicación del establecimiento comercial (supermercado) donde la cepa fue aislada: A, zona norte; B, zona centro; C, zona sur. ² Se calculó dividiendo el n° de ufc/ml sobrevivientes después del ensayo entre el n° de ufc/ml utilizadas en las pruebas de control. NaClO: hipoclorito de sodio; BLBA: bromuro de laurildimetil bencilamonio; CH₃COOH: ácido acético.

de sodio, bromuro de lauril-dimetil-bencilamonio y ácido acético), incluso a diluciones mayores a las utilizadas rutinariamente. Por lo tanto, la utilización de estos desinfectantes a las concentraciones adecuadas, conjuntamente con buenas prácticas en la manufactura de los productos avícolas, podrían disminuir la carga microbiana y, eventualmente, evitar los problemas de contaminación cruzada con *Salmonella* spp., entre otros enteropatógenos.

Los hallazgos obtenidos en esta investigación permitieron determinar que el pollo crudo con aliños y sin ellos, manufacturados en los establecimientos comerciales estudiados, no cumplen con la calidad microbiológica adecuada para ser considerados un alimento inocuo. La detección de diversas serovariedades de *Salmonella* en las muestras analizadas hace que el producto no sea apto para el consumo humano, por constituir un vehículo de alto riesgo para la salud de los consumidores. Por consiguiente, de no aplicarse medidas preventivas inmediatas, existe el riesgo potencial de aparición de brotes de diarreas o salmonelosis en la población consumidora de este alimento.

En conclusión, este estudio proporciona una valiosa información epidemiológica preliminar que revela la necesidad de intensificar los controles higiénico-sanitarios, así como la adopción de buenas prácticas de manufactura y la aplicación de procedimientos basados en los principios de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP) en toda la cadena alimentaria. Además, la implementación de estrategias que garanticen el uso adecuado de los agentes antimicrobianos en la medicina veterinaria, y la utilización de desinfectantes en los protocolos de higiene y saneamiento en las industrias o comercio de alimentos, ayudarán a conte-

ner y minimizar la selección, transmisión y diseminación de genes de resistencia en la población bacteriana.

Agradecimientos

Los autores agradecen a las siguientes instituciones: Fundación para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología del estado Mérida, Venezuela (FUNDACITE-Mérida) Contratos CFN° 09-04 y 07-10, Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología e Innovación FONACIT (Contrato N° 200900446) y Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad de Los Andes (CDCHT-ULA) N° CVI ADG-02-97, por el apoyo y financiamiento del proyecto.

Referencias

1. Quevedo F. Enfermedades emergentes y reemergentes transmitidas por alimentos. Cien Inv. 2002;5:25-35.
2. Alexandre M, Pozo C, González V, Martínez M, Prat S, Fernández A, et al. Detección de *Salmonella enteritidis* en muestras de productos avícolas de consumo humano en la Región Metropolitana. Rev Méd Chile. 2000;128:1075-83.
3. Boscán L, Arzálluz A, Ugarte C, Sánchez D, Díaz D, Wittum T, et al. Aislamiento de salmonellas de importancia zoonótica en vísceras de pollo beneficiados en el estado Zulia, Venezuela. Rev Cientif FCV-LUZ. 2005;15:576-82.
4. Organización para la Agricultura y la Alimentación. FAO. Inocuidad y calidad de los alimentos. Buenas prácticas y garantía de calidad. 2008. Fecha de consulta: 21 de febrero de 2009. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/agn/agns>.
5. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. ICMSF. Microorganismos de los alimentos. Características de los patógenos microbianos, Zaragoza: Ed. Acribia; 1996.
6. Sistema Regional de Información para la Vigilancia de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos. SIRVETA. 2004. Fecha de consulta: 30 de marzo 2008. Disponible en: URL: <http://www.panalimentos.org/sirveta/e/index.htm>.
7. Graham SM. Salmonellosis in children in developing and developed countries and populations. Curr Opin Infect Dis. 2002;15:507-12.
8. Zaidi M, López C, Calva E. Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: epidemiología, vacunas y biología molecular. Rev Latinoam Microbiol. 2006;48:121-5.

9. Araque M. Nontyphoid *Salmonella* gastroenteritis in pediatric patients from urban areas in the city of Mérida, Venezuela. *J Infect Dev Ctries*. 2009;3:28-34.
10. Mata C, Oropeza R, Araque M. Patrones de resistencia y presencia de integrones de clase 1 en cepas de *Salmonella enterica* aisladas de pacientes pediátricos provenientes de varias regiones de Venezuela. *Rev Fac Farm*. 2007;49:2-8.
11. Patchanee P, Zewde BM, Tadesse DA, Hoet A, Gebreyes A. Characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg isolated from humans and animals. *Foodborne Pathog Dis*. 2008;5:839-51.
12. Comisión Venezolana de Normas Industriales. COVENIN norma N° 1116. Alimentos. Identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico. 1989. Fecha de consulta: 06 de mayo de 2008. Disponible en: URL: <http://portal.sencamer.gob.ve>.
13. Comisión Venezolana de Normas Industriales. COVENIN norma N° 902. Alimentos. Método para recuento de bacterias aerobias en placas de Petri 1987. Fecha de consulta: 18 de abril de 2008. Disponible en: URL: <http://portal.sencamer.gob.ve>.
14. Comisión Venezolana de Normas Industriales. COVENIN norma N° 2343. Pollo Beneficiado. 2004. Fecha de consulta: 02 de marzo de 2008. Disponible en: URL: <http://portal.sencamer.gob.ve>.
15. Norma técnica obligatoria nicaragüense. NTON 03 041-03. Pollo beneficiado listo para cocinar (pollo crudo) entero y en cortes, y sus menudos. 1999. Fecha de consulta: 10 de agosto de 2008. Disponible en: URL: http://www.bvspania.org.ni/doc/regulacion/compendio_normas.pdf.
16. Norma Técnica Peruana. NTP 201.054. Carne y productos cárnicos. Aves para consumo. Definiciones, requisitos y clasificación de las carcasas y carne de pollo, gallinas, gallos, pavos, patos y gansos. 2001. Fecha de consulta: 06 de agosto de 2008. Disponible en: URL: <http://www.gacetaoficial.gob.pa/pdfTemp/25936/7874.pdf>.
17. Código Alimentario Argentino. SAGPyA N° 79/04 y 500/04 artículos 156 trís. 2005. Fecha de consulta: 20 de agosto de 2008. Disponible en: URL: http://www.ub.edu.ar/revistas_digiales/Ciencias/Vol5Numero3/cientificas.htm.
18. Dirección General de Normas y Tecnología Industrial-Comisión Panameña de Normas Industriales y Técnicas. DGN-TI-COPANIT 33-480. Carnes de ave, pollo, gallina y gallo procesado listo para cocinar (crudo), entero, en cortes y sus menudos. 2007. Fecha de consulta: 02 de septiembre de 2008. Disponible en: URL: http://www.ub.edu.ar/revistas_digiales/Ciencias/Vol5Numero3/cientificas.htm.
19. Comisión Europea. Criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. 2005. Fecha de consulta: 13 de agosto de 2008. Disponible en: URL: http://www.ub.edu.ar/revistas_digiales/Ciencias/Vol5Numero3/cientificas.htm.
20. Food and Drug Administration. FDA. *Salmonella*. Chapter 5. Bacteriological analytical manual on line. 2005. Fecha de consulta: 26 de enero 2008. Disponible en: URL: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html>.
21. Comisión Venezolana de Normas Industriales. COVENIN norma N° 1291. Aislamiento e identificación de *Salmonella* en alimentos 1ª revisión. FONDONORMA. 2004:1-34
22. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 19th informational supplement. Document M100-S19. Wayne, PA: CLSI: 2009.
23. Jarlier V, Nicolas M, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis*. 1998;10:867-77.
24. Asociación Francesa de Normalización. AFNOR. Antiséptiques et désinfectants. NF T72-150. 3ª ed. París: AFNOR; 1995.
25. Asociación Española de Normalización y Certificación. Antisépticos y desinfectantes químicos. AENOR. Actividad bactericida básica. Método de ensayo y requisitos. UNE-EN 1040. Madrid: AENOR; 1997.
26. Durango J, Arrieta G, Máttar S. Presencia de *Salmonella* spp. en un área del Caribe colombiano: un riesgo para la salud pública. *Biomédica*. 2004;24:89-96.
27. Uribe C, Suárez M. Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. *Colombia Médica*. 2006;37:151-8.
28. Valero K, Safadi S, Bermúdez A, Ávila Y, Sandrea L, García A. Comparación de la calidad microbiológica de hamburguesa de pollo elaborada en forma artesanal e industrial. *Rev Científ FCV-LUZ*. 2008;18:624-30.
29. León A, Infante D, Noguera C, Herrera A, Valdillo P. Detección de *Salmonella* spp. en pollos congelados en el Estado Aragua. *Veter Trop*. 1996;21:75-84.
30. Pérez C, Rivera S, Pirela de VA, Ricon H, Mavarez Y, Román R. Aislamiento de *Salmonella* en canales de aves y evaluación de la efectividad de diferentes medios de enriquecimiento y selectivos. *Rev Científ FCV-LUZ*. 2004;14:177-85.
31. Foley SL, Lynne AM, Nayak R. *Salmonella* challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *J Anim Sci*. 2008;86:E149-62.
32. Ríos M, Araya P, Fernández A, Tognarelli J, Hormazábal JC, Fernández J. Subtipificación molecular de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis en el período post epidémico. *Rev Méd Chile*. 2009;137:71-5.
33. Zaidi M, McDermott PF, Fedorka-Cray P, Leon V, Canche C, Hubert SK, et al. Nontyphoidal *Salmonella* from human clinical cases, asymptomatic children, and raw retail meats in Yucatán, México. *Clin Infect Dis*. 2006;42:21-8.
34. Miriagou V, Tassios PT, Legakis NJ, Tzouvelelis LS. Expanded-spectrum cephalosporin resistance in non-typhoid *Salmonella*. *International J Antimicrob Agents*. 2004;23:547-55.
35. O'Mahony R, Quinn T, Drudy D, Walsh C, Whyte P, Mattar S, et al. Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella* from food sources in Colombia: evidence for an unusual plasmid-localized class 1 integron in serotypes Typhimurium and Anatum. *Microb Drug Resist*. 2006;12:269-77.