



UNRaf
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE
RAFAELA

RID UNRaf

Repositorio Institucional Digital UNRaf

Avedano, Marina Alejandra

Detección de Campylobacter spp. en milanesas de pollo elaboradas en comercios de la ciudad de Rafaela, año 2024

Licenciatura en Industria Alimentaria

Fecha: 26/12/2024

Obra bajo Licencia:



[Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Cita recomendada: Avedano, M.A. (2024). *Detección de Campylobacter spp. en milanesas de pollo elaboradas en comercios de la ciudad de Rafaela, año 2024* [Tesis de grado]. Universidad Nacional de Rafaela



Universidad Nacional de Rafaela

Práctica supervisada:

“Detección de *Campylobacter* spp. en milanesas de pollo elaboradas en comercios de la ciudad de Rafaela, año 2024”

Estudiante: Avedano, Marina Alejandra

Docente Supervisor: Prof. Ing. Esp. Bernacchia, Andrea Mónica

Tutor Institucional: Téc. Raffín, Rosalía.

Lugar de realización: Rafelab S.A

Año: 2024

Índice

1. Introducción.....	12
1.1 Inocuidad Alimentaria	12
1.2 Enfermedades transmitidas por los alimentos	12
1.3 <i>Campylobacter</i> spp., características generales	13
1.4 Legislación alimentaria.....	16
1.5 Milanesas de pollo	17
1.6 Antecedente	19
2. Hipótesis	20
3. Objetivos.....	20
3.1 Objetivo general.....	20
3.2 Objetivos específicos	20
4. Método y materiales	21
4.1 Verificación del ensayo normalizado	21
4.1.1 Metodología de verificación.....	21
4.1.2 Preparación de inóculos con cepas de referencia	21
4.1.3 Siembra de muestras contaminadas artificialmente	21
4.1.4 Evaluación del eLOD50	22
4.2 Análisis de contaminación de milanesas comercializadas en la ciudad de Rafaela.	23
4.2.1 Selección de comercios, muestreo e identificación de las muestras	23
4.2.2 Recursos necesarios.....	24
4.2.3 Metodología de análisis.....	24
4.2.4 Diagrama del procedimiento	29
5. Resultados de análisis	30
6. Discusión	33
7. Conclusión.....	40
8. Bibliografía.....	41

Índice de figuras

Figura 1: Imagen de microscopia electrónica de <i>Campylobacter jejuni</i> (Public Domain). Fuente: College of Veterinary Medicine	14
Figura 2: Cadena de comercialización de milanesas de pollo. Fuente: Elaboración propia.	17
Figura 3: Preparación de homogeinatos. Fuente: Elaboración propia.	25
Figura 4: Muestras listas para incubar en jarra de anaerobiosis. Fuente: Elaboración propia	25
Figura 5: Muestras listas para ser incubadas en estufa. Fuente: Elaboración propia.	26
Figura 6: Estriado de placas con agar selectivo bajo campana de bioseguridad de clase II.	26
Figura 7: Placas de agar selectivo luego de 48hs de incubación en estufa.....	27
Figura 8: Placa de agar sangre con colonias presuntivas aisladas de <i>Campylobacter</i> spp.	27
Figura 9: Prueba de la oxidasa con tiras reactivas de Merck sobre una colonia aislada en agar sangre.....	28
Figura 10: Porcentaje de prevalencia de <i>Campylobacter</i> spp. en todas las muestras.....	31
Figura 11: Porcentaje de prevalencia de <i>Campylobacter</i> spp. en las muestras analizadas en abril.....	31
Figura 12: Porcentaje de <i>Campylobacter</i> spp. en las muestras analizadas en mayo.	32
Figura 13: Diagrama de Ishikawa. Fuente: Elaboración propia.	36

Índice de tablas

Tabla 1: Clasificación de <i>Campylobacter</i> spp.	13
Tabla 2: Condiciones para el desarrollo de <i>Campylobacter</i> spp.	14
Tabla 3: Criterio microbiológico para <i>Campylobacter</i> spp.	16
Tabla 4: Artículo 302, Capítulo VI.	18
Tabla 5: Diluciones utilizadas para llegar al nivel bajo de inoculación (eLOD50)	21
Tabla 6: Metodología de cálculo para estimar el eLOD50.	22
Tabla 7: Resultados obtenidos para estimar eLOD50.	22
Tabla 8: Determinación de eLOD50	22
Tabla 9: Resultados de muestras analizadas	30
Tabla 10: Resultados de pruebas de confirmación de <i>Campylobacter</i> spp.	30

Índice de Anexos

Anexo I Pruebas bioquímicas para identificar especies de <i>Campylobacter</i> spp.....	43
---	----

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a Rosalía Raffín por su invaluable apoyo. Agradezco también a sus colegas, María Noel Ferrero y Pablo Musso, por brindarme el espacio y las herramientas necesarias para llevar a cabo este proyecto, el cual tiene un profundo significado para mí.

A mi docente supervisora, Andrea Bernacchia, por su compromiso entusiasta desde el primer día y por brindarme una motivación constante a lo largo de este proceso.

Finalmente, a la persona más disciplinada, inteligente y compañera que tengo, mi querido Nicolás, gracias de todo corazón por su apoyo incondicional, su orientación y su motivación, que fueron fundamentales para que pudiera concluir este trabajo.

Declaración

Declaro que el material incluido en esta TFLIA es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo y que este material no lo he presentado en forma parcial en esta u otra institución.



Marina Avedano

D.N.I 36.887.278

Abreviaturas

ETAs – Enfermedades transmitidas por los alimentos

SENASA – Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

BAM – Bacteriological Analytical Manual

CAA – Código Alimentario Argentino

eLOD50 – Límite de detección 50%

BPM – Buenas prácticas de manufactura

“Detección y enumeración de *Campylobacter* spp. en milanesas de pollo elaboradas en comercios de la ciudad de Rafaela, año 2024”

Resumen:

Las bacterias *Campylobacter* están ampliamente distribuidas en la mayoría de los animales de sangre caliente, fundamentalmente en aves destinadas al consumo humano. Existen especies patógenas como *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, etc. que se encuentran vinculadas a enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) y al consumo de aguas contaminadas.

En la industria avícola la producción primaria es controlada por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) donde el principal patógeno que se monitorea es *Salmonella* spp., una bacteria productora de ETAs, potencialmente peligrosa para los consumidores. Los comercios que adquieren esta materia prima para elaborar sus productos, como la milanesa de pollo, deben implementar buenas prácticas de elaboración para evitar la contaminación cruzada al producto final.

El presente trabajo “Detección y enumeración de *Campylobacter* spp. en milanesas de pollo elaboradas en comercios de la ciudad de Rafaela, año 2024” pretendió demostrar que *Campylobacter* spp. es un contaminante frecuente en este tipo de alimentos.

La metodología elegida para detectarlos fue la técnica ISO 10272-1:2017 “Método horizontal para la detección y la enumeración de *Campylobacter* spp.”. Constó de una etapa previa de verificación del método que resultó satisfactoria, llegando al eLOD50 deseado. De acuerdo a este resultado se comenzó con el análisis de las muestras de milanesas.

Los resultados obtenidos del análisis de milanesas, brindaron información estimativa sobre el nivel de contaminación de *Campylobacter* spp. en las milanesas de pollo que se venden en los comercios de la ciudad. Se pudo detectar el género en un 15% del total de las muestras analizadas, identificando un resultado positivo consistente en uno de los comercios evaluados. Se puede relacionar este resultado con deficiencias en las condiciones higiénico-sanitarias o en los procedimientos de manejo de los productos, en consecuencia, resulta fundamental implementar medidas preventivas para reducir la presencia de estos microorganismos y otros indicadores de especies de bacterias patógenas.

Palabras clave:

- *Campylobacter* spp.
- ETAs
- Pollo
- Monitoreo
- Contaminación

“Detection and enumeration of *Campylobacter* spp. in chicken milanesas made in shops in the city of Rafaela, year 2024”

Abstract:

Campylobacter bacteria are widely distributed in most warm-blooded animals, mainly in poultry for human consumption. There are pathogenic species such as *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, etc. that are linked to foodborne diseases (ETAs) and consumption of contaminated water.

In the poultry industry, primary production is controlled by the Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) where the main pathogen monitored is *Salmonella* spp. a bacterium that produces ETAs, potentially dangerous for consumers. Stores that acquire this raw material to manufacture their products, such as chicken milanesa, must implement good manufacturing practices to avoid cross-contamination of the final product.

The present study “Detection and enumeration of *Campylobacter* spp. in chicken milanesas prepared in stores in the city of Rafaela, year 2024” aimed to demonstrate that *Campylobacter* spp. is a frequent contaminant in this type of food.

The methodology chosen to detect them was the ISO 10272-1:2017 technique “Horizontal method for the detection and enumeration of *Campylobacter* spp.”. It consisted of a previous stage of verification of the method that was satisfactory, reaching the desired eLOD50. Based on this result, the analysis of the milanese samples was started.

The results obtained from the analysis of milanesas provided an estimate of the level of contamination of *Campylobacter* spp. in chicken milanesas sold in the city's shops. The genus was detected in 15% of the total samples analyzed, identifying a consistent positive result in one of the shops evaluated. This result can be related to deficiencies in hygienic-sanitary conditions or in product handling procedures, therefore, it is essential to implement preventive measures to reduce the presence of these microorganisms and other indicators of pathogenic bacteria species.

Key words:

- *Campylobacter* spp.
- ETAs
- Chicken
- Monitoring
- Contamination

1. Introducción

1.1 Inocuidad Alimentaria

Es imprescindible para la salud y bienestar de los individuos la inocuidad de los alimentos que ingieren (Anderson, 2015).

Como Inocuidad alimentaria se define a "la garantía de que los alimentos no causarán daño al consumidor, cuando se preparen y/o consuman de acuerdo con el uso al que se destinan" (Organización Mundial de la Salud, 2015).

Solo los alimentos inocuos satisfacen las necesidades alimentarias y contribuyen a que todas las personas tengan una vida activa y saludable. No existe seguridad alimentaria sin inocuidad de los alimentos. Los peligros transmitidos por los alimentos pueden ser de naturaleza química, física o biológica y con frecuencia son invisibles a nuestros ojos. Se tratan de sustancias químicas perjudiciales (por ejemplo: residuos de pesticidas) y de microorganismos (bacterias, virus, parásitos), los cuales encuentran en los alimentos las sustancias nutritivas y las condiciones ambientales necesarias para crecer y multiplicarse (ANMAT, 2023), dando lugar a:

- Fenómenos de alteración microbiana:

Se manifiestan con una descomposición del alimento y la consiguiente modificación de sus caracteres organolépticos: olor, color, sabor, consistencia, etc. (Anderson, 2015).

- Peligrosidad para la salud humana:

Cuando el crecimiento microbiano producido sobre un alimento está integrado por microorganismos patógenos, dicho alimento se convierte en un producto peligroso para la salud del consumidor (Anderson, 2015).

Una defectuosa preparación, cocción o almacenamiento, son las principales causas para el desarrollo de las bacterias.

1.2 Enfermedades transmitidas por los alimentos

Las ETAs son aquellas que resultan de la presencia de bacterias infectivas o sus toxinas en un alimento y que actúan cuando son ingeridas.

En el caso de las enfermedades bacterianas, que son consecuencia del consumo de alimentos contaminados con agentes biológicos, son ocasionadas por la ingestión de ciertas bacterias vivas en una dosis adecuada que, previamente, han logrado crecer y multiplicarse en estos alimentos. Estas bacterias actúan invadiendo el organismo del huésped o liberando toxinas en su tracto intestinal o cualquier otro órgano. Estas enfermedades se denominan infecciones alimentarias (Anderson, 2015). Tiene dos variantes:

1) Infecciones alimentarias:

a) Infecciones invasivas: caracterizadas porque el microorganismo coloniza tejidos y órganos del afectado. Este grupo comprende, virus, protozoos, parásitos y bacterias como *Salmonella*, *Aeromonas*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia* y *Escherichia coli* enteroinvasivas (EIEC).

b) Toxiinfecciones: ocasionadas por bacterias no invasivas, pero capaces de colonizar y multiplicarse en el tracto intestinal del hospedero, donde excretan sus toxinas, tal es el caso de: *Vibrio cholerae*, *Bacillus cereus* (cepas productoras de enterotoxinas), *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* y las variantes enteropatógenas de *Escherichia coli* productoras de enterotoxinas, verotoxinas, o ambas (Rodríguez Torrens, 2015).

2) Intoxicaciones alimentarias:

Son causadas por toxinas producidas por bacterias que se han multiplicado hasta una cierta concentración en el alimento. Las intoxicaciones, en general, se manifiestan más rápidamente que las infecciones alimentarias. Los microorganismos tipo son: *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* (cepas productoras de la toxina emética) y *Staphylococcus aureus* (Rodríguez Torrens, 2015).

1.3 *Campylobacter* spp., características generales

1.3.1 Clasificación general

Campylobacter spp. fue descrita por primera vez en 1886 por el pediatra y bacteriólogo alemán Theodore Escherich (1857-1911) quién también fue el descubridor de la bacteria *Escherichia coli*, bautizada así en su honor en 1919. Durante mucho tiempo se clasificaron entre los vibrios, pero Sebald y Verón propusieron el género *Campylobacter* en 1963 (Enrique Orihuel y otros, 2015).

El género *Campylobacter* comprende 23 especies y este número se va incrementando debido a la identificación de nuevas especies, incluidas *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. lanienae*, *C. sputorum*, *C. mucosalis*, *C. concisus*, *C. curvus*, *C. rectus*, *C. gracilis*, *C. showae*, *C. hominis*, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. laridis*, *C. insulaenigrae*, *C. canadensis*, *C. upsaliensis*, *C. helveticus*, *C. avium*, *C. cuniculorum* y *C. ureolyticus* (Signorini y otros, 2015). Según la novena edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (2000), *Campylobacter* spp. se clasifica de la siguiente manera en Tabla 1:

Tabla 1: Clasificación de *Campylobacter* spp.

Reino	Bacteria
Filo	Protobacteri
Clase	Epsilonbacteria
Orden	Campylobacterales
Familia	Campylobacteraceae

Fuente: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9na edición)

1.3.2 Taxonomía

Las bacterias del género *Campylobacter* se caracterizan por ser de tamaño pequeño, microaerófilas, Gram negativas, no esporuladas, de forma vibrioide o espiral con movilidad oscilatoria y recorrido de ida y vuelta, como se puede observar en la Figura 1 (ICMSF, 1996).



Figura 1: Imagen de microscopía electrónica de *Campylobacter jejuni* (Public Domain). Fuente: College of Veterinary Medicine

En cultivos viejos se observa al microscopio óptico la transformación de los bacilos curvos a cuerpos esféricos o cocoides, con pérdida de su viabilidad, conocidas como formas viables no cultivables. Poseen movilidad debido a la presencia de flagelos monótricos o anfítricos (Edmons, y otros, 1987).

Las bacterias del género *Campylobacter* son termófilas (capaces de crecer a altas temperaturas) y microaerófilas (con niveles bajos de oxígeno). Adquieren energía por oxidación de aminoácidos o ácidos tricarbóxicos y no crecen bien en competencia con otros organismos, son susceptibles a la desecación, el calentamiento, la congelación, desinfectantes y condiciones ácidas (Scotland, Food Standars, 2019). Los parámetros se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2: Condiciones para el desarrollo de *Campylobacter* spp.

Parámetro	Óptimo	Rango
Temperatura (°C)	37– 42°	30 – 45°
Atmósfera	5% O ₂ , 10% CO ₂ , 85% N ₂	3-5% O ₂ , 2-10% CO ₂ , 85% N ₂
Actividad de agua (aw)	0,997	> 0,987
pH	6,5 – 7, 5	4,9 – 9,0
Cloruro de Sodio (ClNa %)	0,5	0 – 1,5

Fuente: *Campylobacter information and guidance*

1.3.3 Características bioquímicas:

Las bacterias *Campylobacter* reducen el nitrato, son incapaces de oxidar o fermentar los carbohidratos, tienen un contenido de guanina y citocina expresado en mol% del 30-38% y, excepto *C. jejuni* subespecie *doylei* y *C. fennelliae* reducen el nitrito. Las especies *C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis* y *C. laridis* son termófilas, creciendo a 42° pero no a 25 °C (ICMSF, 1996).

1.3.4 Distribución e importancia en los alimentos

Campylobacter spp. es un género de microorganismos que se encuentra ampliamente distribuido en la mayoría de animales de sangre caliente; prevalentemente en los destinados al consumo, como aves de corral, vacunos, porcinos, ovinos; al igual que en especies salvajes. No obstante, las aves se destacan por ser las de mayor importancia (Rodríguez y otros, 2019). Hay trabajos que describen su hallazgo en animales de compañía como perros y gatos (Misawa, Kawashima, & Kondo, 2001; Tamborini, y otros, 2012). Estudios realizados en la ciudad de Buenos Aires, Argentina; describieron la presencia de *Campylobacter* spp. con prevalencias del 16,96% en perros, del 20% en gatos y del 40% en aves (ICMSF, 1996).

Las bacterias *Campylobacter* pueden infectar al hombre como consecuencia de contacto directo con animales o indirectamente por medio de agua, leche o carne contaminadas. La Argentina posee una importante producción y consumo de carne de pollo. Las aves de corral han sido reconocidas como los principales reservorios del patógeno, y el consumo de su carne se asocia con la aparición de numerosos brotes de la enfermedad en el mundo. Estudios recientes realizados en nuestro país informan que aproximadamente el 90 % de las canales de pollo en puntos de venta final están contaminadas con estos patógenos (Signorini y otros, 2015).

Campylobacter spp. puede sobrevivir en el agua durante semanas y persistir en aguas estancadas y residuales procedentes de fuentes diversas, como las provenientes de mataderos, plantas de tratamiento de aguas residuales con la posibilidad de llegar a las aguas superficiales, pantanos y agua de consumo. (Martín de Santos y otros, 2012). El agua no clorada ha sido la causa de algunos brotes de enteritis humana.

Un estudio realizado por Oscar J. Jancome muestra, utilizando la técnica de filtración por membrana (Jacome, 2020), una prevalencia del 69% (18/26) del patógeno en muestras de pollos parrilleros, un 6% (3/ 53) en milanesas, un 17% (1/6) en hamburguesas y un 80% (4/5) en menudencias.

El peligro biológico asociado a la presencia de *Campylobacter* spp. en los alimentos, son las especies patógenas que provocan ETAs, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* específicamente, ambas causantes de la enfermedad gastrointestinal campilobacteriosis. Los síntomas más frecuentes son diarrea (frecuentemente sanguinolenta), dolor abdominal, fiebre, dolor de cabeza, náuseas y/o vómitos, que, por lo general, duran de 3 a 6 días. La mayoría de los casos no son fatales, pero podrían ser graves para aquellos pacientes inmunodeprimidos (niños, adultos mayores y personas que padecen algún otro tipo de enfermedad). Además de campilobacteriosis se encuentran infecciones causadas por *Campylobacter* spp. como el síndrome Guillain-Barré, el cual lleva a debilidad muscular progresiva y parálisis. Clínicamente suele ser indistinguible si es causado por *C. jejuni* y *C.coli*. (ICMSF, 1996).

1.4 Legislación alimentaria

1.4.1 Código Alimentario Argentino

En Argentina rige el Código Alimentario Argentino (CAA) como legislación alimentaria vigente. Las pequeñas y medianas empresas y las industrias de alimentos deben cumplir las disposiciones y condiciones generales mencionadas en el capítulo I y II del CAA para elaborar, fabricar y comercializar dentro del país sus productos. Los alimentos que se encuentran en el mercado deben cumplir con los criterios microbiológicos y físicos-químicos de la normativa (CAA, 1969). Los primeros son límites sobre una cantidad específica o la presencia o ausencia de microorganismos en un tipo de alimento, se establecen con el fin de proteger a la población de la mayoría de las enfermedades transmitidas por éstos (ETAs), dado que los microorganismos patógenos son los principales vehículos transmisores de ellas (Organización Mundial de la Salud, 1987). El Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), dictó la Resolución 336/2016; considerando criterios microbiológicos de seguridad sobre la aceptación de los alimentos para carne de ave, huevos crudos, ovoproductos, carne de especies menores y productos de la caza, haciendo referencia a la presencia de microorganismos patógenos como *Salmonella* spp., *Staphylococcus aerus*, entre otros (SENASA, 2016), excluyendo al género *Campylobacter* spp., una familia de microorganismos que, en nuestro país, actualmente no se encuentra controlado por alguna regulación. Asimismo, en otros países existen criterios microbiológicos para *Campylobacter* spp. en carne de ave. La Comisión Europea pone en vigencia el 01 de enero de 2018 el Reglamento (UE) 2017/1495 (Comisión Europea, 2017) de la comisión de 23 de agosto de 2017 que modifica el Reglamento (CE) N° 2073/2005 por lo que se refiere a *Campylobacter* en canales de pollos de engorde. Allí se establece un límite microbiológico de 1.000 ufc/g en canales de pollo, detallado en Tabla 3, con el fin de controlar la contaminación de los canales durante el proceso de sacrificio.

Tabla 3: Criterio microbiológico para *Campylobacter* spp.

Categoría de alimentos	Microorganismos	Plan de muestreo		Límites		Método analítico de referencia	Fase en la que se aplica el criterio	Acción en caso de resultados insatisfactorios
		n	c	m	M			
*2.1.9 Canales de pollos de engorde	<i>Campylobacter</i> spp.	50 (%)	c = 20 A partir del 1.1.2020, c = 15; A partir del 1.1.2025, c = 10	1 000	ufc/g	EN ISO 10272-2	Canales tras la refrigeración	Mejoras en la higiene del sacrificio, revisión de los controles del proceso, del origen de los animales y de las medidas de bioseguridad en las explotaciones de origen»

Fuente: Reglamento (UE) 2017/1495

1.5 Milanesas de pollo

1.5.1 Definición según CAA

El capítulo VI, artículo 354 tris del CAA, define a milanesa como al “producto consistente en una rebanada o un filete de carne que ha sido rebozado o empanado” entre otras aclaraciones.

1.5.2 Cadena de comercialización de milanesas de pollo

Actualmente, la cadena de comercialización de la milanesa de pollo incluye:

- productores avícolas.
- establecimientos elaboradores de milanesas.
- puntos de venta especializados que ofrecen interpretaciones tanto tradicionales como innovadoras de este producto alimentario.
- establecimientos gastronómicos.

En la Figura 2 se detalla la cadena de comercialización de milanesas de pollo:



Figura 2: Cadena de comercialización de milanesas de pollo. Fuente: Elaboración propia.

Se definen como “mayoristas” a los agentes que se abastecen en plantas de faena y distribuyen a comercios minoristas; y “procesador secundario” al agente que compra el pollo eviscerado y lo utiliza en la elaboración de productos procesados de pollo (Sorrentino, 2013).

La milanesa de pollo llega al consumidor elaborada por establecimientos minoristas (mercados carnicerías, local integrado, servicio de catering, autoservicio, etc.) o bien, adquirida por estos mismos establecimientos, pero ya elaborada a través de un mayorista. Los hipermercados y supermercados se abastecen directamente de la planta de faena y elaboran sus propias milanesas.

1.5.3 Monitoreo de Milanesas

En el Capítulo VI del Código Alimentario Argentino (CAA), el artículo 354 clasifica a la milanesa como un alimento chacinado no embutido. Por lo tanto, debe cumplir con los criterios microbiológicos definidos para este tipo de alimentos, que se encuentran especificados en el artículo 302 del mismo capítulo (descriptos en Tabla 4).

Tabla 4: Artículo 302, Capítulo VI.

CHACINADOS NO EMBUTIDOS			
	FRESCOS	COCIDOS	
PARÁMETROS	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN	METODOLOGÍA ⁽¹⁾
Recuento de aerobios mesófilos (UFC/g)	No considerar	n=5, c=2, m=10 ⁴ , M=10 ⁵	ISO 4833:2003 BAM-FDA:2001
Recuento de E Coli (NMP/g)	n=5, c=2, m=10 ² , M=10 ³	n=5, c=0, m < 3	ISO16649 - 3:2005 ICMSF (METODO 1) BAM-FDA:2002 (METODO 1)(2)
Recuento de estafilococos coagulasa positiva (UFC/g)	n=5, c=2, m=10 ² , M=10 ³	n=5, c=1, m=10 ² , M=10 ³	ISO 6888 - 1:1999 ICMSF
Recuento de hongos y levaduras (UFC/g)	No considerar	n=5, c=2, m=10 ² , M=10 ³	ISO 21527-2:2008, BAM-FDA: 2001, ALPHA:2001
Recuento de anaerobios sulfito reductores (UFC/g)	n=5, c=2, m=10 ² , M=10 ³	n=5, c=1, m=10 ² , M=10 ³	ISO 15213:2003
E. Coli O157:H7/NM	n=5, c=0, Ausencia en 65g	n=5, c=0, Ausencia en 65g	USDA FSIS: 2010; ISO 16657:2001, BAM-FDA:2011
Salmonella spp.	n=5, c=0, Ausencia en 10 g	n=5, c=0, Ausencia en 25 g	ISO 6579:2002; Co: 2004 BAM-FDA:2011 USDA FSIS:2011
Listeria monocytogenes	No considerar	n= 5, c=0, Ausencia en 25 g	ISO 11290- 1:1996; Amd:2004 BAM-FDA:2011 USDA FSIS:2009
E. Coli no O157 (3)	n=5, c=0, Ausencia en 65g	No considerar	ISO 13136:2012 BAM-FDA: 2014 USDA-FSIS: 2014

(1) O su versión más actualizada.

(2) Para chacinados frescos, embutidos y no embutidos, se puede utilizar técnica de recuento en placa según ISO 16649-2, expresando el resultado UFC/g.

(3) E. coli productor de toxina Shiga de los serogrupos: O145, O121, O26, O111 y O103. Se considerarán sólo aislamientos de los mencionados serogrupos positivos para los genes stx y eae.

Fuente: Código Alimentario Argentino.

Como se puede observar en la Tabla 4 no existe control sobre los *Campylobacter* provocadores de ETAs.

1.6 Antecedente

1.6.1 *Campylobacter* spp. en helados de exportación

Hoy en día, el laboratorio Rafelab S.A implementa la metodología del Manual de análisis bacteriológico (BAM) Capítulo 7: *Campylobacter*, en la matriz helados, dado que es un requisito para las empresas exportadoras hacia los Estados Unidos contar con un certificado de ensayos microbiológicos que constaten la ausencia de *Campylobacter* spp. y otros microorganismos patógenos para comercializar sus productos en dicho país.

Se podría utilizar este ejemplo de monitoreo de *Campylobacter* spp. para controlar la producción de milanesas de pollo y contribuir a su inocuidad.

2. Hipótesis

Campylobacter spp. es un contaminante frecuente en milanesas de pollo comercializadas en la ciudad de Rafaela.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Realizar un diagnóstico de la presencia de *Campylobacter* spp. en milanesas de pollo en comercios de la ciudad de Rafaela.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar la verificación del método normalizado ISO 10272-1:2017 “Método horizontal para la detección y la enumeración de *Campylobacter* spp.” para la matriz milanesas de pollo.
- Detectar la presencia *Campylobacter* spp.
- Diseñar un listado de acciones de precaución y cuidado para evitar la contaminación y/o multiplicación de *Campylobacter* spp. en milanesas de pollo.

4. Método y materiales

4.1 Verificación del ensayo normalizado

4.1.1 Metodología de verificación

Se llevó a cabo el procedimiento descrito en la norma ISO 16140-3:2021 “Microbiología de la cadena alimentaria. Protocolo para la verificación de métodos de referencia y métodos alternativos validados en un único laboratorio”. Se evaluó el límite de detección 50% (eLOD50) de la técnica para detectar *Campylobacter* spp. en milanesas de pollo.

Límite o nivel de detección (eLOD50) es el menor número estimado de microorganismos cultivables que pueden detectarse en un 50 % de las muestras que contienen dicha concentración. La norma de referencia establece un eLOD50 de 14 ufc/10 gs de piel de pollo (entre 11 y 19).

4.1.2 Preparación de inóculos con cepas de referencia

1- De un inóculo de *Campylobacter jejuni* MALBRÁN activado overnight se realizaron diluciones consecutivas, se sembró 1ml de la última dilución en agar sangre + 5% de sangre de oveja y se incubó durante 48 hs a 41,5°C, en condiciones de microaerobiosis. El recuento obtenido fue de 41 ufc. De acuerdo a ese valor, se prepararon las diluciones B, C y D descritas en Tabla 5, con el fin de llegar al nivel bajo (11,4 ufc/ml).

Además, se realizaron diluciones consecutivas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovariedad Typhimurium ATCC 14028 y *Escherichia coli* ATCC 25922, cepas utilizadas como competencia en el ensayo de detección. Posteriormente, se sembró 1 ml de la última dilución en agar TSA y se incubó durante 24 hs a 37°C para determinar el recuento real.

Tabla 5: Diluciones utilizadas para llegar al nivel bajo de inoculación (eLOD50)

(Recuento Resultante en TSA) Dilución A	Dilución B (1:4 de A)	Dilución C (1:3 de B)	Dilución D (1:3 de C)
410ufc / 1 ml (10 ⁻⁶)	103 ufc/ml	34,3 ufc/ml	11,4 ufc/ ml

Fuente: Elaboración propia.

4.1.3 Siembra de muestras contaminadas artificialmente

Se acondicionaron 10 muestras de milanesas de pollo, de 10 g cada una, para su esterilización y se colocaron en una autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Con este procedimiento se logró eliminar la flora presente y se procedió a inocularlas con la cepa blanco según el protocolo 1 (basado en la norma ISO 16140-3:2021) detallado en la Tabla 6 y con las cepas de competencia (3.000ufc).

Tabla 6: Metodología de cálculo para estimar el eLOD50

LOD50 (11,4 ufc/10g)	Nivel Alto 9 x LOD50 (103 ufc/10g)	Nivel Intermedio 3 x LOD50 (34,3 ufc/10g)	Nivel Bajo 1 x LOD50 (11,4 ufc/10g)	Blanco (0 ufc/10g)
Cantidad de réplicas	1 milanesa inoculada	4 milanesas inoculadas	4 milanesas Inoculadas	1 milanesa no inoculada
ID	M1	M2 /M3 /M4/M5	M6/M7/M8/M9	M10

Fuente: Elaboración propia.

4.1.4 Evaluación del eLOD50

4.1.4.1 Determinación del eLOD50

Los resultados obtenidos se detallan en Tabla 7 y en base a éstos se estimó el eLOD50 utilizando la Tabla 8 del punto 5.5.1 de la Norma ISO 16140-3:2021.

Tabla 7: Resultados obtenidos para estimar eLOD50.

	Nivel Alto 9 x LOD 50	Nivel intermedio 3 x LOD 50	Nivel bajo 1 x LOD 50	Blanco
Resultados	1 positivo de 1 positivo	4 positivos de 4 positivos	1 positivo de 4 positivos	1 negativos de 1 negativos
	1/1	4/4	1/4	0/1

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 8: Determinación de eLOD50

Nivel Alto 9 x LOD50 ufc/porción de prueba	Nivel Intermedio 3 x LOD50 ufc/porción de prueba	Nivel Bajo 1 x LOD50 ufc/porción de prueba	Blanco	eLOD50 ufc/porción de prueba
1/1	4/4	4/4	0/1	$< 1,0 \times LIL^a$
1/1	4/4	3/4	0/1	$= 0,5 \times LIL^a$
1/1	4/4	2/4	0/1	$= 0,7 \times LIL^a$
1/1	4/4	1/4	0/1	$= 1,0 \times LIL^a$
1/1	4/4	0/4	0/1	$= 1,5 \times LIL^a$
1/1	3/4	4/4	0/1	$= 0,7 \times LIL^a$
1/1	3/4	3/4	0/1	$= 1,0 \times LIL^a$
1/1	3/4	2/4	0/1	$= 1,3 \times LIL^a$
1/1	3/4	1/4	0/1	$= 1,7 \times LIL^a$
1/1	3/4	0/4	0/1	$= 2,3 \times LIL^a$
1/1	2/4	4/4	0/1	$= 1,1 \times LIL^a$
1/1	2/4	3/4	0/1	$= 1,5 \times LIL^a$
1/1	2/4	2/4	0/1	$= 1,9 \times LIL^a$
1/1	2/4	1/4	0/1	$= 2,6 \times LIL^a$
1/1	2/4	0/4	0/1	$= 3,7 \times LIL^a$

1/1	1/4	4/4	0/1	Resultado NMP no confiable ^b
1/1	1/4	3/4	0/1	= 2,1 × LIL ^a
1/1	1/4	2/4	0/1	= 2,8 × LIL ^a
1/1	1/4	1/4	0/1	= 4,0 × LIL ^a
1/1	1/4	0/4	0/1	= 6,3 × LIL ^a
1/1	0/4	4/4	0/1	Resultado NMP no confiable ^b
1/1	0/4	3/4	0/1	= 3,0 × LIL ^a
1/1	0/4	2/4	0/1	= 4,3 × LIL ^a
1/1	0/4	1/4	0/1	= 6,7 × LIL ^a
1/1	0/4	0/4	0/1	= 14,0 × LIL ^a
^a LIL: Nivel bajo de inoculación ^b Resultado NMP no confiable: es muy poco probable que se produzca una combinación de MPN. El experimento se repetirá.				

Fuente: norma ISO 16140-03.

De acuerdo a los resultados se toma la fila resaltada en color, para conocer el eLOD50 se realiza la siguiente operación:

$$1 \times \text{LIL} = 1 * 11,4 \text{ ufc}$$

Entonces:

$$\text{eLOD 50} = 11,4 \text{ ufc/10 g}$$

4.1.4.2 Criterio de aceptación del eLOD50

Según el protocolo utilizado de la norma ISO 16140-3:

$\text{eLOD50} \leq 4 \times 11 \text{ ufc/10 gs}$ (LOD50 de piel de pollo según ISO 10272-1:2017).

$11,4 \text{ ufc/10g} < 44$

El límite de detección obtenido es considerado satisfactorio.

Evaluación: ~~Aceptable/ No Aceptable~~

Por lo que se concluye que el método ISO 10272-1:2017 es apto para el uso indicado y que el laboratorio Rafelab S.A, lo está aplicando correctamente dado que cumple con el criterio de aceptación establecido.

4.2 Análisis de contaminación de milanesas comercializadas en la ciudad de Rafaela.

4.2.1 Selección de comercios, muestreo e identificación de las muestras

Para lograr este objetivo se seleccionaron aleatoriamente 10 carnicerías elaboradoras de milanesas de distintos barrios. Las muestras, compuestas por carne de pollo proveniente de pechuga, se consiguieron en dos oportunidades diferentes, se compraron los días 08/04/2024 y 06/05/2024 en los mismos comercios. Ambas se conservaron a 3 ± 2 °C hasta su posterior análisis. Para identificarlas se les colocó la fecha de toma de muestra y el número de comercio de origen.

4.2.2 Recursos necesarios

Equipamiento

- Estufa capaz de mantener la temperatura en $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y a $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- pH-metro
- Baño termostático capaz de mantener la temperatura a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Microscopio
- Termómetro (temperatura de control $3 \pm 2^{\circ}\text{C}$)
- Autoclave

Materiales

- Placas de petri aprox. de 90 mm
- Asas de siembra estériles
- Pipetas graduadas de 1 y 10 ml
- Jarra de anaerobiosis
- Sobre de anaerobiosis

Medios de cultivo

- Caldo Bolton
- mCCD Agar
- Agar Sangre 5%

4.2.3 Metodología de análisis

Procedimiento seleccionado según ISO 10272-1:2017.

Las muestras se analizaron según el procedimiento de detección A de la metodología ISO 10272-1:2017.

Preparación de la muestra

Se pesaron 10 g de cada muestra de milanesa de pollo y se acondicionó en bolsas estériles individuales.

Preparación de los homogeinatos

En un homogeneizador, tipo Stomacher, se homogeneizó cada muestra de 10g con 90 ml de caldo Bolton (Figura 3 y 4) durante 120 segundos a 240 rps.



Figura 3: Preparación de homogeinatos. Fuente: Elaboración propia.



Figura 4: Muestras listas para incubar en jarra de anaerobiosis. Fuente: Elaboración propia

Enriquecimiento

Se realizó incubando el homogeinato a 41,5 °C durante 44 hs, en condiciones de microaerofilia (Figura 5).



Figura 5: Muestras listas para ser incubadas en estufa. Fuente: Elaboración propia.

Cultivo

Se sembraron 100 μ l de los homogenatos enriquecidos, mediante disseminación por estrías en la superficie de agar mCCD, y se incubaron a 41,5 °C por 44 hs en condiciones de microaerofilia (Figura 6 y 7).



Figura 6: Estriado de placas con agar selectivo bajo campana de bioseguridad de clase II.

Fuente: Elaboración propia.

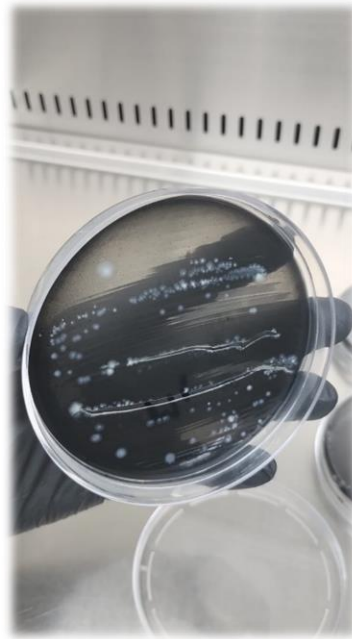


Figura 7: Placas de agar selectivo luego de 48hs de incubación en estufa.

Fuente: Elaboración propia.

Confirmación de colonias típicas de *Campylobacter* spp.:

Se examinó la morfología y la movilidad de las colonias sospechosas de *Campylobacter* utilizando un microscopio y se sub- cultivaron en un medio no selectivo de agar sangre + 5% sangre de oveja (Figura 8). Algunas de las colonias aisladas se confirmaron como *Campylobacter* spp. mediante la detección de la actividad oxidasa (Figura 9), utilizando tiras reactivas de Merck y un análisis de crecimiento aeróbico a 25°C, donde las bacterias no crecieron a 25°C y sí se desarrollaron a 41,5°C.

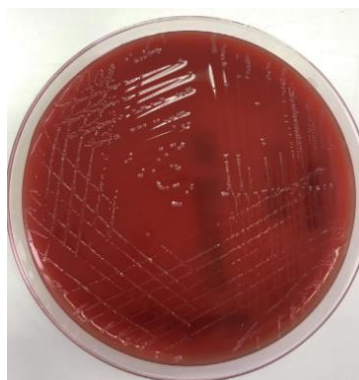


Figura 8: Placa de agar sangre con colonias presuntivas aisladas de *Campylobacter* spp.

Fuente: Elaboración propia

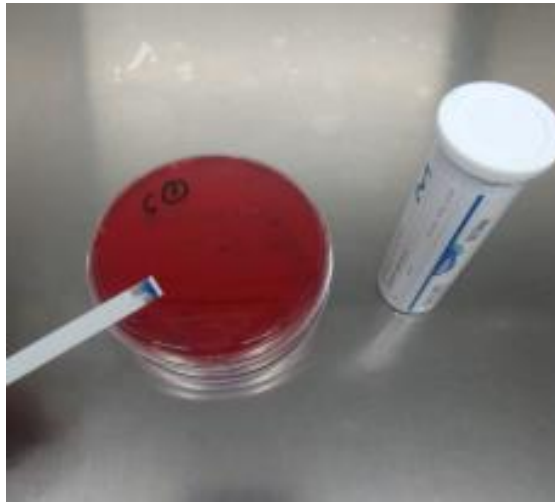


Figura 9: Prueba de la oxidasa con tiras reactivas de Merck sobre una colonia aislada en agar sangre.

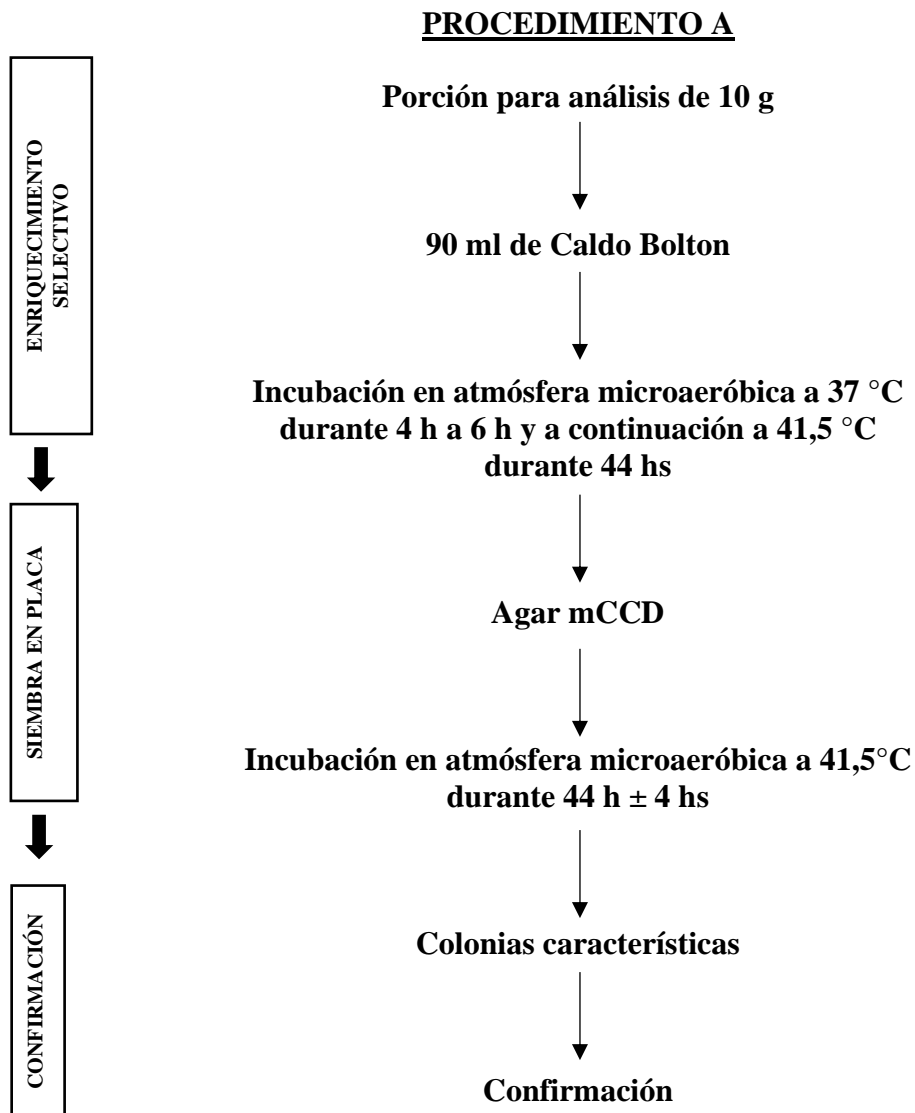
Fuente: Elaboración propia.

Tipificación de colonias típicas de *Campylobacter* spp.

Ese procedimiento se decidió no llevar a cabo ya que identificar el género *Campylobacter* spp. es el fin de este proyecto, no así la especie involucrada.

Si se quisiera proceder identificando la especie se debe realizar lo especificado en el **ANEXO I**.

4.2.4 Diagrama del procedimiento



5. Resultados de análisis

Los análisis se llevaron a cabo en dos etapas, la primera etapa corresponde a las muestras tomadas en el mes de abril y la segunda etapa, corresponde a las muestras analizadas en el mes de mayo.

Tabla 9: Resultados de muestras analizadas

RESULTADOS		
Muestras tomadas 08/04/24	MM-148149-01	NO DETECTADO
	MM-148149-02	NO DETECTADO
	MM-148149-03	PRESUNTO POSITIVO
	MM-148149-04	NO DETECTADO
	MM-148149-05	NO DETECTADO
	MM-148149-06	NO DETECTADO
	MM-148149-07	NO DETECTADO
	MM-148149-08	PRESUNTO POSITIVO
	MM-148149-09	NO DETECTADO
	MM-148149-10	NO DETECTADO
Muestras tomadas 06/05/24	MM-149793-01	NO DETECTADO
	MM-149793-02	NO DETECTADO
	MM-149793-03	PRESUNTO POSITIVO
	MM-149793-04	NO DETECTADO
	MM-149793-05	NO DETECTADO
	MM-149793-06	NO DETECTADO
	MM-149793-07	NO DETECTADO
	MM-149793-08	NO DETECTADO
	MM-149793-09	NO DETECTADO
	MM-149793-10	NO DETECTADO
Nota: Presuntos positivos se deben confirmar.		

Fuente: Informes de resultados N° M-148149 y M-149793.

Resultados de confirmación del género *Campylobacter* spp.:

Tabla 10: Resultados de pruebas de confirmación de *Campylobacter* spp.

Prueba	MUESTRA		
	08/04/24 – M3	08/04/24 – M8	06/05/24 – M3
Observación al microscopio	Se confirman 5 colonias de cada muestra con bacilos pequeños curvados		
Movilidad	Se confirman 5 colonias de cada muestra con movimiento muy rápido característico en espiral		
Oxidasa	Se confirman 5 colonias de cada muestra con actividad oxidasa		
Crecimiento aeróbico 25°C	No se obtuvo desarrollo de ninguna colonia		

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados finales de todas las muestras analizadas se visualizan en la Figura 10, donde determinamos el porcentaje de resultados positivos (detectado) y negativos (no detectado) sobre el total de las muestras analizadas (3 positivos y 17 negativos sobre 20 muestras analizadas):

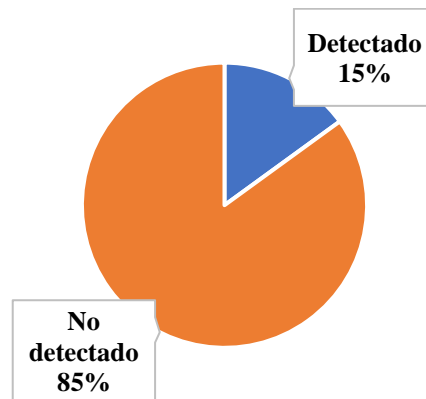


Figura 10: Porcentaje de prevalencia de Campylobacter spp. en todas las muestras.

Fuente: Elaboración propia.

Se confirma el desarrollo de colonias de *Campylobacter* spp. en las muestras MM-148149-03, MM-148149-08 y MM-149793-03, empleando el procedimiento de detección A de la metodología ISO 10272-1:2017. Se puede observar que se repite el resultado detectado en el comercio 3, en abril y mayo, y no así para el comercio 8 que resultó positivo de *Campylobacter* spp. en abril y en mayo resultó negativo.

Si comparamos los resultados de la primera y segunda etapa de toma de muestras, como se puede observar en los siguientes gráficos, el porcentaje hallado de bacterias *Campylobacter* no difiere considerablemente:

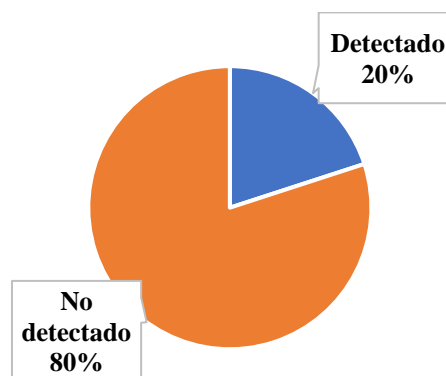


Figura 11: Porcentaje de prevalencia de Campylobacter spp. en las muestras analizadas en abril

Fuente: Elaboración propia.

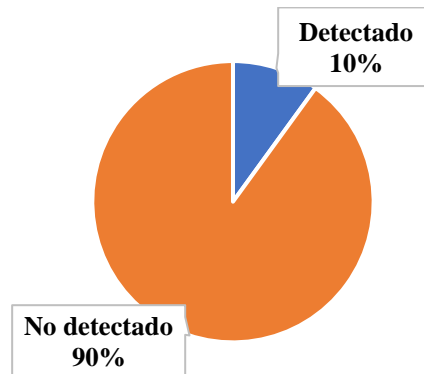


Figura 12: Porcentaje de Campylobacter spp. en las muestras analizadas en mayo.

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados indican que la posibilidad de encontrar *Campylobacter* spp. en milanesas de pollo es baja.

6. Discusión

Este estudio permitió conocer la proporción de bacterias *Campylobacter* spp. presentes en un muestreo (n=20) de milanesas tomadas en dos fechas diferentes, en las mismas carnicerías de Rafaela, Santa Fe. La metodología elegida para detectarlos obtuvo resultados de verificación de ensayo satisfactorios, lo cual permite asegurar que el Laboratorio Rafelab S.A implementa correctamente el ensayo y los resultados emitidos son confiables. Si observamos el trabajo de investigación “*Búsqueda de Campylobacter* spp. termotolerantes en pollos parrilleros en la ciudad de Córdoba” (Jacome, 2020), vemos que el método con mayor sensibilidad para detectar la contaminación artificial de *Campylobacter* spp fue la técnica de filtración mediante el uso de un medio cromogénico “CHROMagar”, en comparación con la metodología BAM “Capítulo 7: *Campylobacter*”. Ambos métodos cuentan con una etapa de enriquecimiento, igualmente que el método ISO 10272-1:2017. En la investigación Jancome selecciona la técnica más sensible para analizar 53 muestras de milanesas y obtiene un 6% de resultados positivos para *Campylobacter* spp. Si comparamos este resultado con el obtenido en el presente estudio, y teniendo en cuenta que, en lugar de 20 muestras, se hubieran analizado 53, continúan siendo bajos los niveles de contaminación por *Campylobacter* spp.

Una de las causas de que se hayan obtenido bajos niveles de contaminación por *Campylobacter* spp. está vinculado con la materia prima de la cual se provee el establecimiento elaborador de milanesas. En el año 2022 se llevó a cabo una investigación sobre la prevalencia de *Campylobacter* termotolerantes en granjas y plantas de faena de pollos de engorde en la ciudad de Santa Fe (Rossler, 2022), enfocándose en los eslabones más críticos de la cadena de comercialización de la carne aviar (Figura 2 “Cadena de comercialización de milanesas de pollo”). En granjas, se identificaron un total de 164 aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes a partir de 779 muestras analizadas. Posteriormente, en plantas de faena, se muestrearon los mismos lotes de pollos previamente estudiados en las granjas, obteniéndose un total de 134 aislamientos de *Campylobacter* termotolerantes de 431 muestras recolectadas. Los resultados evidenciaron la existencia de contaminación cruzada en las diferentes etapas del proceso de faena (Rossler, 2022). Estos hallazgos destacan la importancia de implementar medidas de control y vigilancia sanitaria ya que tanto las granjas como las plantas de faena son puntos críticos para la introducción y diseminación de *Campylobacter* termotolerantes. Las plantas faeneadoras de pollos emplean diferentes procesos tecnológicos para minimizar la carga microbiana presentes en los mismos y dependiendo del grado de avance tecnológico e implementación de normas como Procedimientos Operativos Estandarizados (POEs), BPM y Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP) se logra una determinada calidad del producto final, es decir, de materia prima que tanto procesadores mayoristas como secundarios adquirirán.

Guillermo Guirin fue autor principal del discurso “*Campylobacter jejuni* en la Industria Aviar” (Guirin. G y otros, 2006) , allí se compara la prevalencia de *C. jejuni* en dos plantas faeneadoras de pollo con distintos procesos tecnológicos, una de las cuales implementa HACCP y la otra no. Se analizaron 200 muestras en cada establecimiento (100 muestras de carcasas antes del enfriamiento y 100 muestras antes del envasado) y se observaron resultados con diferencias importantes. En la planta que implementa HACCP solo el 1% de las muestras contenía *C. jejuni* y en la planta sin HACCP el 25% de las muestras contenían *C. jejuni*. Este proyecto demuestra que la utilización de nuevas tecnologías junto con la implementación de normas y sistemas de seguridad

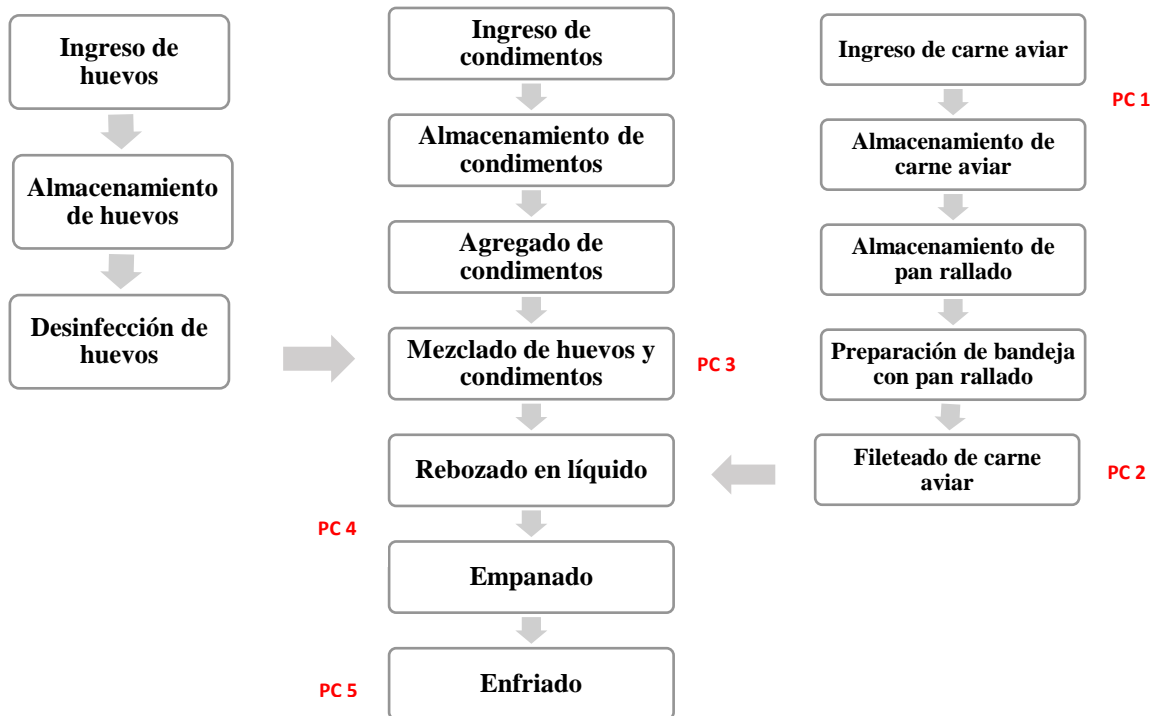
microbiológica puede asegurar la calidad final del producto comercializado. (Guirin. G y otros, 2006). Los establecimientos procesadores secundarios, como las carnicerías, generalmente cuentan con tecnología más limitada. Esto se debe a que la escala de producción es mucho más pequeña que la de una industria, esto limita la inversión en tecnologías avanzadas, ya que los costos asociados con la compra y mantenimiento de equipos de última generación no siempre son viables para una operación más pequeña. Además, no se requiere de controles de calidad tan rigurosos como los que suelen implementar las grandes industrias (HACCP) que deben cumplir con normativas internacionales más estrictas y por ello adoptan tecnologías avanzadas para garantizar la seguridad y calidad del producto. Incluso para realizar controles de calidad, las carnicerías no suelen tener laboratorios internos para realizar análisis microbiológicos de manera constante, los procesos de control de calidad se limitan generalmente a la inspección visual, táctil o mediante pruebas manuales. Las carnicerías pueden lograr la elaboración y comercialización de productos alimentarios inocuos al cumplir con las condiciones generales establecidas en el capítulo II del CAA y al aplicar BPM para la seguridad alimentaria.

La proporción de resultados negativos en los análisis microbiológicos de las muestras estudiadas refleja la efectividad de la implementación de las prácticas mencionadas. Sin embargo, los resultados positivos a *Campylobacter* spp. también reflejan la falta de algunas de estas medidas, específicamente en el establecimiento en el que el resultado positivo es consistente.

Una de las maneras de evitar la contaminación por *Campylobacter* spp. y otros microorganismos es desarrollar puntos de control en el proceso de elaboración de milanesas.

Etapas de elaboración de milanesas de pollo:

Desconociendo el proceso de elaboración de milanesas llevado a cabo en las carnicerías visitadas para este trabajo se describen de manera general, las etapas de elaboración de milanesas destacando los puntos de control (PC) más importantes para evitar la contaminación y proliferación de microorganismos.



Puntos de control:

PC1: El proveedor de materia prima, las condiciones de recepción de esta como su almacenamiento son puntos críticos de control, es muy importante que la carne de ave se compre a un proveedor registrado, además, debe recibirse refrigerada o a temperatura de congelación ya que este alimento es crudo y tiene un alto contenido de agua. Las altas temperaturas facilitarían la proliferación de los propios microorganismos y el deterioro de la calidad del mismo. Si ésta se debe descongelar y trozar o sólo filetear, se debe tener en cuenta la temperatura del ambiente donde se manipula, la higiene y desinfección de:

- el espacio donde se realiza el corte: no se deben utilizar tablas de madera ni tablas que se hayan utilizado para cortar otros alimentos ni que presenten roturas.
- utensilios: no se deben encontrar con suciedad, ni con presencia de agua ni con roturas en los mangos de cuchillos, afiladores, fuentes, batidores, etc.
- manipulador de alimentos: es indispensable el lavado y desinfección de manos, cabello cubierto y vestimenta apropiada.

PC2: Durante esta etapa se manipulan cuchillos y tablas nuevamente, por lo que se deben cumplir las mismas pautas de higiene y manipulación detalladas en **PC1**.

PC3: Preparar la mezcla de huevos y condimentos, teniendo la precaución de, si se utilizan huevos frescos, verificar que cada huevo se encuentre en buenas condiciones (se debe romper el huevo en un recipiente aparte y dependiendo del estado del huevo se agrega a la mezcla de empanado) o bien reducir este riesgo utilizando huevo en polvo con la correcta manipulación del mismo.

PC4: Se deben utilizar tenedores limpios y secos para sostener el filete, embeberlo con la mezcla líquida y rebozarlo en el pan rallado. Se deben colocar las milanesas listas en fuentes limpias y secas.

PC5: La temperatura de almacenamiento es muy importante para evitar que la flora propia del alimento crudo deteriore el alimento, reservar a temperaturas de refrigeración (1°C a 5°C).

En aquellos casos en los que se detecten estos microorganismos, incluso en niveles bajos de contaminación (como en este trabajo y en el estudio de Jancome), un diagrama de Ishikawa podría desenmascarar prácticas que podrían estar vinculadas con la presencia de *Campylobacter* spp.

Diagrama de Ishikawa:

Al diferenciar los factores internos podremos identificar algunas de las posibles causas de contaminación por *Campylobacter* spp. Estos factores comprenden todos los elementos que provienen del entorno interno de la empresa elaboradora, como los materiales y la maquinaria utilizada, la mano de obra, el método de producción seleccionado, las mediciones o medidas de control implementadas, y el ambiente en el que se lleva a cabo la actividad. Todos estos aspectos están bajo el control y la gestión directa de la empresa.



Figura 13: Diagrama de Ishikawa. Fuente: Elaboración propia.

Al revelar estas deficiencias en el proceso de elaboración, se podrán diseñar acciones preventivas orientadas a mejorar los procedimientos y evitar el desarrollo de *Campylobacter* spp., lo que reduciría los riesgos de contaminación y garantizaría productos más seguros para el consumo. El Reglamento (UE) 2017/1495 (Comisión Europea, 2017) se podría utilizar como guía para establecer medidas preventivas ya que indica acciones a seguir ante resultados insatisfactorios de *Campylobacter* spp.

Acciones preventivas para evitar el desarrollo de *Campylobacter* spp.:

Los factores de riesgo principales sobre los que se centra un enfoque preventivo de *Campylobacter* es:

1. Proveerse de carne de ave de granjas o establecimientos que se encuentren registrados.
2. Instalaciones adecuadas.
3. La higiene en el establecimiento elaborador, control de residuos y plagas.
4. Implementar buenas prácticas de manufactura.
5. Usar agua potable.
6. Capacitar al personal sobre manipulación segura de alimentos.

Listado de controles preventivos basados en las etapas de elaboración de milanesas:

Recepción de materias primas y almacenamiento:

- Controlar que la materia prima utilizada para la elaboración de alimentos sea provista por empresas debidamente habilitadas y fiscalizadas por la Autoridad Sanitaria competente (SENASA, provincia, municipio).
- Programar las entregas fuera de las horas pico y organizarlas de forma regular para que no lleguen todas al mismo tiempo.
- Comprobar que la identificación (rótulo) esté completa, debidamente pegada y en perfectas condiciones.
- Observar las condiciones del transporte (habilitación del vehículo, puertas cerradas o caja cubierta, temperatura e higiene).
- Examinar la presencia de materiales extraños, productos dañados, envases rotos y olores extraños.
- Inmediatamente después de su recepción, los productos deben almacenarse en las cámaras o heladeras correspondientes para minimizar la exposición de los mismos a la temperatura ambiente.
- La correcta rotación de las materias primas, este procedimiento se puede hacer, registrando en cada producto, la fecha en que fue recibido o preparado. El manipulador almacenará los productos con la fecha de vencimiento más próxima, delante o arriba de aquellos productos con fecha de vencimiento más lejana. Esto no sólo permite hacer una buena rotación de los productos, sino descartar productos con fecha vencida.

Preparación, almacenamiento y exhibición de productos:

- Se debe contar con indumentaria adecuada, de uso exclusivo para el proceso de elaboración, se recomienda que la vestimenta sea de colores claros para visualizar la suciedad y debe estar siempre limpia. Además, se requiere el uso de cofia o gorro para sostener todo el cabello y evitar su caída en los alimentos.

- La higiene del manipulador, es esencial para obtener un alimento inocuo. Como regla fundamental se debe considerar el lavado de las manos constante, antes de empezar a trabajar, al tocar alimentos crudos y alimentos potencialmente contaminados, al tocar superficies potencialmente contaminadas o sucias, luego de utilizar el baño, luego de rascarse la cabeza, tocarse el pelo, la cara, la nariz u otras partes del cuerpo, luego de estornudar o toser aún con la protección de un pañuelo, luego de manipular basura, luego de tocar animales y mascotas y; por último luego de tocar dinero. Para un correcto lavado de manos se deben cumplir los siguientes pasos:
 1. Enjuague con agua tibia hasta el codo
 2. Frotar con jabón desengrasante y desinfectante hasta obtener espuma, siempre hasta el codo
 3. Cepillarse las uñas
 4. Frotarse el interdígito vigorosamente
 5. Frotarse la palma de la mano con la parte dorsal de los dedos en forma vigorosa
 6. Frotarse el dedo pulgar vigorosamente
 7. Enjuagar con cantidad suficiente de agua
 8. Secarse con toalla descartable, cerrar la canilla con la misma toalla y descartarla
- El uso de joyería, relojes y otros objetos deben ser evitados. La suciedad y los microorganismos patógenos se pueden acumular alrededor de tales objetos. Además, pueden ser un riesgo para la salud del manipulador y su entorno familiar.
- Los alimentos crudos, como las carnes frescas, deben ser adecuadamente acondicionados para evitar que los líquidos que desprenden contaminen otros alimentos cercanos. Esto se puede lograr, por ejemplo, separándolos del resto de los alimentos mediante recipientes herméticamente cerrados. Además, es fundamental prevenir la contaminación de superficies donde se manipulen otros alimentos. El acondicionamiento adecuado también incluye mantener la carne fresca a la temperatura correcta, garantizando que se manipule en un ambiente fresco y controlado.
- Se debe usar agua potable para todo el proceso de elaboración, las fuentes y utensilios que se utilicen en la elaboración deben estar limpios y secos.
- Se deben evitar corrientes de aire que puedan llevar microorganismos o insectos al área de trabajo. Incluso los animales deben restringirse en todas las áreas del establecimiento elaborador.
- Se debe trabajar con cantidades adecuadas de carne de ave para evitar que permanezcan mucho tiempo fuera de refrigeración. Una vez preparadas las milanesas, se deben refrigerar inmediatamente. En el caso de trabajar con filetes de pollo congelados, si se descongelaron en el transcurso de su elaboración no se debe volver a congelar.

Las medidas de prevención detalladas son algunas de las buenas prácticas que se deben implementar para evitar que tanto *Campylobacter* spp. y otros patógenos como

Salmonella spp., *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*, *Stapylococcus aureus*, etc. se desarrollen o multipliquen en los alimentos que elabora todo manipulador de alimentos.

Cada establecimiento elaborador de alimentos en la ciudad de Rafaela debe desarrollar sus propios programas de control para cumplir con las normas de seguridad alimentaria obligatorias y estar preparado para cualquier inspección por parte de ASSAL.

Este estudio se centró exclusivamente en el análisis de milanesas de pollo. Sin embargo, sería relevante conocer la prevalencia de *Campylobacter* spp. si se incluyeran otros productos de carne de ave, tanto crudos como procesados, comparando diferentes metodologías, como la norma ISO 10272-1:2017 y el método de filtración por membrana. Además, sería útil involucrar a más establecimientos que elaboran y/o comercializan estos productos en la ciudad. Los resultados podrían variar, aunque también es posible que se mantuvieran similares. Asimismo, en caso de detectar *Campylobacter* spp., sería fundamental identificar la especie involucrada y su tipo de virulencia, ya que esto permitiría obtener una comprensión más precisa de la epidemiología del género en la ciudad.

7. Conclusión

La infección causada por *Campylobacter* spp. es un problema real y significativo para la salud pública, lo que subraya la necesidad de realizar estudios más profundos que permitan comprender su epidemiología a lo largo de la cadena de comercialización de la producción avícola. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio no respaldan la hipótesis planteada, ya que, aunque existe la posibilidad de encontrar *Campylobacter* spp. en milanesas de pollo, los niveles detectados son bajos. Esto indica que este microorganismo no es frecuente en este tipo de alimentos en las carnicerías visitadas en Rafaela, Santa Fe. No obstante, considero fundamental continuar investigando la prevalencia de estos microorganismos en todos los productos derivados de carne de ave en la ciudad.

La verificación del ensayo ISO 10272-1:2017, de acuerdo con la metodología ISO 16140-3:2021, confirmó que se alcanzó el límite de detección establecido en la norma de referencia (11,4 ufc/10 g) para pieles de pollo. Al aplicar esta metodología de verificación a las milanesas, se detectaron todos los casos positivos con la sensibilidad indicada, lo que resulta aceptable para el estudio, con un valor de $eLOD_{50} < 11,4$ ufc/10 g. Sin embargo, sería útil realizar nuevos estudios comparando diferentes metodologías que puedan ofrecer mayor sensibilidad o bien desafiar el límite de detección establecido para pieles de pollo, con el fin de determinar si el laboratorio es capaz de detectar recuentos más bajos en esta matriz.

A partir de mi experiencia en microbiología, he podido constatar que los microorganismos patógenos representan una amenaza constante para la salud pública. Sin las normativas de seguridad alimentaria que rigen en nuestro país y en el mundo, los alimentos contaminados podrían llegar fácilmente a los consumidores, poniendo en riesgo su salud. En este sentido, considero que es crucial aumentar la conciencia sobre los diversos grupos de microorganismos que causan enfermedades, con el objetivo de reducir al mínimo los riesgos asociados. La implementación y control de buenas prácticas de manufactura e higiene en carnicerías, comercios, industrias alimentarias, así como la capacitación en inocuidad dirigida a manipuladores de alimentos, son esenciales para promover un entorno seguro en la producción y manipulación de alimentos. Esto contribuye significativamente a minimizar los riesgos de contaminación por *Campylobacter* spp. y otros patógenos. Asegurar alimentos inocuos no debe ser solo una cuestión de cumplimiento regulatorio, sino también una responsabilidad social que garantice que los consumidores, especialmente los más vulnerables, puedan acceder a productos seguros y saludables.

8. Bibliografía

- Anderson, M. d. (2015). *Enfermedades de origen alimentario*. Rosario Pascual Anderson.
- ANMAT. (2023). *¿Qué es la inocuidad alimentaria?* Obtenido de Argentina.gob.ar: <https://www.argentina.gob.ar/anmat/comunidad/que-es-la-inocuidad-alimentaria>
- CAA. (1969). Código Alimentario Argentino. Obtenido de Argentina.gob.ar: <https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>
- Comisión Europea. (23 de Agosto de 2017). *Web oficial de la Unión Europea*. Obtenido de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=CELEX%3A32017R1495>
- Guirin. G y otros. (2006). “*Campylobacter jejuni* en la Industria Aviar”. En A. A. Microbiología, *Tercer Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos - Libro de Resúmenes* (pág. 123). Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- Hunt, C. A. (29 de Diciembre de 2000). *BAM Capítulo 7: Campylobacter*. Obtenido de US Food y Drug Administration: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-7-campylobacter>
- ICMSF. (1996). Microbiología de los Alimentos. En B.-P. y. Roberts. Zaragoza: Acribia.
- Jacome, O. J. (2020). *Búsqueda de Campylobacter spp. termotolerantes en pollos parrilleros en la ciudad de Córdoba*. Córdoba.
- Martín de Santos y otros. (2012). *Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) con relación a las medidas de control para reducir la presencia de Campylobacter spp. en carne fresca de aves (pollo)*.
- Organización Mundial de la Salud. (1987). *Requisitos generales (higiene de los alimentos. Suplemento al Volumen 1B*. Obtenido de <https://www.fao.org/3/w6419s/w6419s0g.htm#:~:text=El%20criterio%20microbiol%C3%B3gico%20para%20un,%2C%20volumen%2C%20superficie%20o%20lote>
- Organización Mundial de la Salud. (18 de Febrero de 2015). <https://www.paho.org/en>. Obtenido de https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10433:educacion-inocuidad-alimentos-glosario-terminos-inocuidad-de-alimentos&Itemid=41278&lang=es#gsc.tab=0
- Rodríguez Torrens, H. B. (2015). Las enfermedades transmitidas por alimentos, un problema sanitario que hereda e incrementa el nuevo milenio. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*.
- Rodríguez y otros. (2019). *Riesgos microbiológicos asociados al consumo de carne aviar*.
- Rosler, E. (2022). *"Evaluación de la presencia de Campylobacter termotolerantes en granjas de engorde de pollos parrilleros y plantas faenadoras como base para*

sustentar científicamente medidas de gestión del riesgo de salud pública" . Santa Fe.

Scotland, Food Standars. (2019). *Campylobacter* information and guidance. *For safe food and healthy eating*, 3.

Signorini y otros. (2015). *Evaluación de la presencia y difusión de campylobacter termotolerantes en granjas de engorde de pollos parrilleros como base para sustentar científicamente medidas de gestión del riesgo*. Obtenido de Sitio Argentino de Publicación Animal: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_aves/enfermedades_aves/68-campylobacter.pdf

Sorrentino, S. (Septiembre de 2013). *Evaluación Nutricional y Sensorial de Pollo de campo e Industrial*.

Anexo I

Pruebas bioquímicas para identificar especies de *Campylobacter* spp.

- 1) ISO 10272-1:2017 especifica pruebas bioquímicas para identificar *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*.

Prueba	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Actividad catalasa	+	+	+	– ó débil
Hidrólisis del hipurato	+ ^a	–	–	–
Hidrólisis del acetato de indoxilo	+	+	–	+
<u>Referencias:</u> + Positivo – Negativo ^a Se han descrito algunas cepas de <i>C. jejuni</i> negativas para hipurato				

- 2) BAM Capítulo 7: *Campylobacter* especifica pruebas bioquímicas para identificar *C. jejuni*, *C. jejuni* subsp. *Doylei*, *C. coli*, *C. lari*, *C. feto* subsp. *feto*, *C. hyointestinalis*, *C. upsaliensis*.

Prueba	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. feto</i> subsp. <i>feto</i>	<i>C. hyointestinalis</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Crecimiento a 25°C	-	±	-	-	+	D	-
Crecimiento a 35-37°C	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a 42°C	+	±	+	+	D	+	+
Reducción de nitratos	+	-	+	+	+	+	+
3,5 % CINa	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S tira de acetato de plomo	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S ETI	-	-	D	-	-	+ ^(C)	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+
Agar de McConkay	+	+	+	+	+	+	-
Motilidad (montaje húmedo)	+	+	+	+	+	+	+
(81%)							
Crecimiento en 1% de glicina	+	+	+	+	+	+	+

Utilización de glucosa	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de hipurato	+	+	-	-	-	-	-
Resistencia al ácido nalidíxico	S	S	S	R	R	R	S
Resistencia a la cefalotina	R	R	R	R	S	S	S
<u>Referencias:</u> + Positivo (el 90% o más de las cepas son positivas) – Negativo (el 90% o más de las cepas son negativas) (c): pequeña cantidad de H ₂ S en TSI inclinados frescos (<3 días). D: entre el 11% y el 89% de las cepas son positivas R: resistente; S: susceptible							

De forma alternativa o adicional a los análisis de confirmación e identificación descritos en este anexo, pueden utilizarse otros métodos como análisis de PCR, serología, análisis por espectrometría de masas con desorción /ionización láser asistida por matriz y detección del tiempo de vuelo (MALDI-TOF-MS), etc.