

# CARNES ROJAS

La carne roja de vacunos, búfalos, cerdos, ovejas, cabras, llamas y otras especies, es un medio de cultivo excepcional para el desarrollo de la mayoría de los microorganismos. Tiene un alto contenido de proteínas, baja proporción de carbohidratos y sustancias solubles de menor peso molecular, y una  $a_w = 0,99$ . La humedad disponible para el crecimiento microbiano se expresa en términos de actividad agua ( $a_w$ ) cuyo valor es 1 para el agua pura y por ejemplo, 0,990 para una solución 0,30 molal de cloruro de sodio. El contenido en vitaminas del músculo es muy elevado (unos 60  $\mu\text{g/g}$ ) y comprende a tiamina, riboflavina, niacina, ácido fólico, ácido pantoténico, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> y biotina (1).

El tejido muscular está recubierto por sus fascias protectoras y las miofibrillas contenidas dentro del sarcolema. Una vez que han sido descuartizadas las reses, gran parte de su protección inicial se destruye y durante el picado desaparece por completo. Los alimentos de origen animal poseen sustancias inhibitoras como las inmunoproteínas, muy específicas en su acción pero con un reducido espectro de actividad antimicrobiana, que no proveen protección práctica alguna (2).

Todos los animales transportan grandes cantidades de microorganismos. Numerosas bacterias, además de mohos y levaduras, están presentes en el cuero, los pelos y las pezuñas de los vacunos, y son transmitidos a la carcasa luego del sacrificio. Los restos de estiércol en la pelambre suelen acceder al músculo, así como el contenido intestinal si la evisceración no se hace cuidadosamente. Por otra parte, las bacterias también pueden proceder de los pisos, paredes, mesadas, cuchillos y manos de los operadores en la planta de faena (1).

Los bacterias psicrótróficas de la superficie de las carnes no provienen del intestino e incluyen especies de *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Brochothrix thermosphacta*, y algunas *Enterobacteriaceae* y *Lactobacillaceae* (2).

En la superficie de la carne bovina suelen encontrarse varios tipos de *Escherichia coli*, algunas especies de

*Enterobacter* y *Serratia*, *Pantoea agglomerans*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* (3, 4), *Enterococcus* (5), *Listeria* (6), *Salmonella*, *Campylobacter* (7), *Clostridium* (8), *Streptococcus*, *Corynebacterium* (9), *Staphylococcus*, *Bacillus*, bacterias lácticas, mohos y levaduras (1).

La microbiota dominante en el tracto gastrointestinal de los cerdos jóvenes está compuesta por *E. coli*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus*, también se halla *Campylobacter coli* en el intestino delgado. Estos animales son más susceptibles a las infecciones por *Salmonella*, siendo *S. Cholerae-suis* el huésped específico y le siguen en frecuencia *S. Typhimurium* y *S. Derby*. Algunos cerdos sanos son portadores de *Y. enterocolitica* (1).

El cuidado esmerado de la higiene durante la faena puede reducir de modo importante la carga microbiana de las carnes, pero no puede prevenir la contaminación. El tratamiento con soluciones de ácido láctico o de fosfato trisódico suele reducir las enterobacterias y otros microorganismos patógenos, si se aplican dentro de las dos horas después del sacrificio, cuando las bacterias gram-negativas todavía no se han fijado a los tejidos (2).

Las carnes curadas y fermentadas, por ejemplo salame, contienen cultivos iniciadores que incluyen *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus* y *Staphylococcus*. Para el 'emplume' se aplican sobre la superficie del embutido una mezcla de levaduras y especies no toxigénicas de mohos, por ejemplo *Penicillium nalgiovense* (1).

## DETERIORO

Las carnes son fácilmente alterables, sobre todo si están procesadas, pues tienen un pH entre 5,1 y 5,6, adecuado para el desarrollo de la mayoría de los microorganismos, y un potencial de reducción que permite el crecimiento de los anaerobios en profundidad y los aerobios en la superficie (1).

Las bacterias están confinadas a la superficie de las carnes durante la fase de crecimiento logarítmico, e interviene en la adhesión al sustrato la carga superficial de los microbios y su hidrofobicidad (10). Las enzimas extracelulares, secretadas por los gérmenes proteolíticos cuando alcanzan su densidad máxima, les permite penetrar en la carne (11).

La actividad enzimática dentro de los tejidos del músculo luego de la faena contribuye a cambios favorables, pero las modificaciones organolépticas observadas en la descomposición son el resultado de la proliferación de los microbios y sus metabolitos. Los factores asociados con la alteración de la carne vacuna suelen ser cambios de color y textura, así como el desarrollo de malos olores y limo.

La formación de limo tiene lugar en la superficie y se debe a las bacterias lácticas, entre otras, mientras que el agriado ocurre en el interior. El limo se detecta cuando la población microbiana alcanza un valor de  $10^7$  ufc/cm<sup>2</sup> y la  $a_w$  está próxima a 0,99 (1).

El enverdecimiento producido por peróxido es debido a lactobacilos heterofermentadores y *Leuconostoc*, mientras que el color verde originado al reaccionar el sulfuro de hidrógeno con la hemoglobina es causado por *Shewanella putrefaciens* y algunas otras bacterias (12).

Los anaerobios son importantes cuando la temperatura se eleva por sobre los 25°C y predominan los clostridios. Alrededor del 60% de las carcasas de cerdos transportan *C. perfringens* y un 10% contiene *Clostridium botulinum*.

El almacenamiento a bajas temperaturas en las cámaras frigoríficas selecciona a los organismos psicrotrofos, pues no crecen los mesófilos. La velocidad de deterioro es mayor cuanto más alto sea el número inicial de microbios, la temperatura de almacenamiento y la  $a_w$  de la superficie de los tejidos. Casi toda la contaminación se concentra en la superficie de las reses y sólo un porcentaje pequeño de los microbios que el animal transportaba en la piel y el intestino, está implicado en la alteración cuando se conserva la carne por debajo de 5°C (1).

Por lo general, las primeras etapas de la alteración están acompañadas de una elevación del pH y una mayor capacidad de hidratación de las proteínas cárnicas. La carne de vaca picada en descomposición puede alcanzar valores de pH cercanos a 8,5. Las vísceras son más sensibles al deterioro que el tejido muscular por ser mayor el pH, por ejemplo el hígado tiene un valor cercano a 6,8. *S. putrefaciens* crece en las carnes con pH superior a 6,0 (13).

Después de un almacenamiento prolongado, la alteración comienza a temperaturas de 5 a 7°C y las bacterias psico-

tróficas que predominan en la superficie de la res son bacilos gram-negativos, aerobios, móviles o no, siendo el género *Pseudomonas* el responsable de más del 50% de los casos especialmente las especies no pigmentadas (14).

En carnes de cerdo y cordero, las enterobacterias psicrotóficas y la gram-positiva *B. thermosphacta* (15) producen modificaciones de los lípidos superficiales, además pueden encontrarse bacterias lácticas, algunos mohos y levaduras. En general, estos microorganismos no provienen del intestino sino de la piel de los animales, el ambiente de los locales de enfriamiento y el suministro de agua.

En las reses almacenadas a temperaturas menores a 4°C, como la humedad ambiental es menor, se deseca la superficie de la carne donde encuentran casi todos los contaminantes, alcanzando una  $a_w < 0,95$ . Esto facilita una alteración fúngica superficial y localizada causada por *Cladosporium herbarum*, *Geomyces pannorum*, especies de *Mucor*, *Thamnidium*, *Penicillium* o *Rhizopus*, y algunas levaduras de los géneros *Candida*, *Torulopsis* o *Rhodotorula*. También en el caso de los productos curados, por la disminución de la actividad del agua el principal proceso de alteración es debido a los mohos (16).

El picado de la carne distribuye por todo el producto los microorganismos que al principio sólo se encontraban en la superficie favoreciendo la alteración y la vida comercial es mucho más corta que la correspondiente a la res. Colabora con esta situación el que se utilice los recortes y restos más contaminados. El deterioro se debe solo a bacterias, siendo *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Moraxella* y *Aeromonas* los géneros más importantes (16). Son pocas las especies psicrotrofas de *Enterobacteriaceae*.

En las carnes envasadas en una atmósfera modificada el deterioro se produce entre 7 y 14 días, y las especies dominantes dependen de la proporción de gases usada, la temperatura y el tiempo de almacenamiento. Comúnmente se encuentran *Pseudomonas* cuando la proporción de oxígeno es elevada y se suele hallar *Lactobacillus*, pero si la carne se mantiene al aire crecen *Pseudomonas*, *Rahnella* y *Carnobacterium* (17). Puede extenderse la vida útil de la carne enfriada con una atmósfera que contiene entre 10 y 20% de

CO<sub>2</sub>, aumentando el grado de inhibición con el descenso de la temperatura (18).

Cuando la carne se almacena al vacío y con refrigeración, los causantes del deterioro son bacterias lácticas y *B. thermosphacta* en la mayoría de los casos. El tipo de organismos predominantes depende de la eficiencia de la barrera al oxígeno y del pH, valores bajos favorecen a las bacterias lácticas (1).

Las carnes crudas curadas son tratadas con cloruro de sodio, nitrito, ascorbato y otras sales. Mientras la concentración de las mismas dentro del tejido es baja, es necesario enfriar para prevenir el crecimiento de organismos indeseables como *C. botulinum*, luego predominan los micrococcos y estafilococos, acompañados de bacterias lácticas, *B. thermosphacta* y mohos, mientras que las especies de *Pseudomonas* son inhibidas.

Las bacterias lácticas ocasionalmente tienen un efecto negativo sobre las carnes curadas cocidas, envasadas al vacío o con atmósfera modificada. Se espera que estos productos se mantengan con buenas condiciones sensoriales de 2 a 4 semanas a una temperatura por debajo de los 10°C, sin embargo a veces ocurre el deterioro dentro del período de vida útil del producto, generando agriado, formación de gas, limo y/o un líquido blanco. La mayoría de las bacterias encontradas son lácticas y el número está por debajo de 10 ufc/g en el momento del empaquetado, pero pueden alcanzar valores de 10<sup>8</sup> ufc/g a 10°C después de 7 a 12 días (19).

En las carnes curadas cocidas que son pasterizadas y envasadas con películas flexibles, pueden sobrevivir *Enterococcus* y otras bacterias lácticas, causando licuación de la gelatina, producción de gas o agriado. Si son envasadas al vacío, la sal y el nitrito combinados con un almacenamiento a baja temperatura evitan el desarrollo de *C. botulinum* cuyos esporos sobreviven al tratamiento térmico. Por otra parte, el nitrito puede originar nitrosaminas al reaccionar con los componentes cárnicos.

Las empanadas y pasteles son rellenos con la carne precocida y una vez cerrados vueltos a cocer. Dado que se suprimen los organismos competidores, cabe la posibilidad del

crecimiento de los clostridios si se mantienen a temperatura elevada (1).

### MICROORGANISMOS PATÓGENOS

La carne vacuna está considerada como el origen de la diseminación de ciertos tipos virulentos de *E. coli*. Las bacterias *Staphylococcus aureus*, *C. perfringens*, *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp., se encuentran en un bajo número sobre las superficies de las carnes crudas sin embargo pero puede aumentar por una manipulación inadecuada (4).

Los patógenos más comunes transmitidos por la carne vacuna son *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* y *C. perfringens*. La carne de cerdo es un vector importante en la transmisión de *Campylobacter jejuni* y *Y. enterocolitica* (7).

Por otra parte *Listeria* puede sobrevivir, a temperatura reducida, en la carne procesada porque es osmóticamente tolerante y acumula solutos compatibles en el citosol (20).

La presencia de patógenos en la carne cruda es un problema imposible de solucionar. Ninguno de los procedimientos disponibles actualmente pueden proporcionar una carne roja, cruda, libre de patógenos. A pesar de este riesgo, la carne y las hamburguesas se suelen consumir crudas o mal cocidas. Esto ha producido en los últimos años brotes de infección humana por *E. coli* O157:H7, que podrían haberse evitado si la temperatura interna de cocción hubiera alcanzado los 65°C (16).

Existen varios tipos de *E. coli* patógenos, entre ellos se encuentran el enterohemorrágico (ECEH O157:H7) que coloniza el tracto gastrointestinal y sintetiza verotoxinas, el enteropatógeno (ECEP) que provoca la destrucción de las microvellosidades de la pared intestinal, el enterotoxigénico (ECET) que es la principal causa de la diarrea del viajero y las infantiles, y el enteroinvasor (ECEI) que origina una enfermedad similar a *Shigella* (21). En el 36,5% de las reses bovinas y 54,5% de las carnes molidas faenadas en el noreste del país se aislaron cepas de ECEH, el cual es un patógeno emergente asociado a casos esporádicos de diarrea, colitis hemorrágica. síndrome urémico-hemolítico o púrpura trombocitopénica en seres humanos (22).

Por otra parte, la ingestión de carnes cocidas en vías de descomposición puede causar una intoxicación alimentaria debido a las aminas termoestables, por ejemplo la histamina, producidas por descarboxilación de los aminoácidos (2).

Los parásitos que se pueden adquirir a través de la ingestión de carnes son protozoos (*Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp.) o helmintos (*Taenia saginata*, *T. solium*, *Trichinella spiralis*) (13).

### ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Se suele emplear el recuento de bacterias aeróbicas totales, el recuento de anaerobios totales, y la determinación de una o más de las clases de microorganismos a diferentes temperaturas (2).

CUADRO 1. Valores microbiológicos observados en las carnes frescas cuando se cumplieron las buenas prácticas de faenamamiento (2).

Tipos de carnes	Media res y cuartos mayorista*	Deshuesada congelada**	Cortes minorista*	Carne picada ***
Recuento de colonias a 30°C	10 <sup>5</sup> ufc/ 100 cm <sup>2</sup>	10 <sup>6,5</sup> ufc/ 1 mL	10 <sup>6</sup> ufc/ 100 cm <sup>2</sup>	10 <sup>7</sup> ufc/g
<i>Enterobacteriaceae</i>	10 <sup>3</sup> ufc/ 100 cm <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup> ufc/mL	10 <sup>4</sup> ufc/ 100 cm <sup>2</sup>	10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup> ufc/g
<i>Salmonella</i>	1 ufc/100 cm <sup>2</sup>	0,1 ufc/mL	10 ufc/ 100 cm <sup>2</sup>	1 ufc /g
<i>S. aureus</i>	na	na	na	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup> ufc/g
Presencia- ausencia de <i>E. coli</i>	70% positivo/ 10 cm <sup>2</sup> 20% positivo/ 1 cm <sup>2</sup>	na	50% positivo/ 1 cm <sup>2</sup>	na
na: no aplicable, * muestreo por hisopado, ** jugo exprimido manualmente, ***depende del tipo y origen, además de la preparación en la carnicería				

Los métodos químicos para detectar el deterioro microbiano se basan en los metabolitos formados, tales como amoníaco, sulfuro de hidrógeno, indol o aminas (16). La

estimación del nivel de bacterias gram-negativas psicrotrofas sobre carnes refrigeradas puede hacerse mediante la detección de la actividad aminopeptidasa mediante un sustrato cromogénico (24).

Según la disposición 3496 de SENASA, cada 300 vacunos faenados se toma en cuatro sitios de una media res (nalga, ijada, pecho y cogote) una muestra con hisopo en una superficie de 100 cm<sup>2</sup> para el análisis de *E. coli*. En el caso de cerdos se hace cada 1.000 animales sacrificados.

CUADRO 2. Límites establecidos por el Código Alimentario Argentino en los art. 255, 302 y 286 bis para carne picada, chacinados frescos y fiambres (25).

ANALISIS	CARNE PICADA CHACINADOS	FIAMBRES
Recuento de aerobios mesófilos/g	n=5 c=3 m=10 <sup>6</sup> M=10 <sup>7</sup>	-
Recuento de <i>E.coli</i> /g	n=5 c=2 m=100 M=500	<10 ufc/g
Recuento <i>S. aureus</i> coagulasa positivo/g	n=5 c=1 m=100 M=1000	<100 ufc/g
<i>E. coli</i> O157:H7/NM	n=5 c=0 ausencia en 65 g*	ausencia en 25 g
<i>Samonella</i> spp.	N=5 c=0 ausencia en 10 g*	ausencia en 25 g
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	ausencia en 25 g
Coliformes totales	-	<100 ufc/g
Clostridios sulfito-reductores	-	<100 ufc/g
Mohos y levaduras	-	<1000 ufc/g
*criterios obligatorios		

En el análisis de las carnes picadas y salchichas se hacen placas de las diluciones 10<sup>-4</sup> a 10<sup>-8</sup> pues los recuentos pueden ser muy altos. Suele ser conveniente estimar el número de coliformes presentes y determinar la proporción de *E. coli*. Cuando se trata de productos empanados se examina solamente el relleno y se hacen las diluciones 10<sup>-1</sup> y 10<sup>-2</sup> para el recuento de los microorganismos totales. En el caso de carnes



curadas crudas las diluciones utilizadas son  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ , y si están cocidas  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  (26).

*E. coli* es un bacilo gram-negativo, móvil, catalasa positivo, oxidasa negativo, no forma  $H_2S$ , reduce nitrato y la mayoría de las cepas posee  $\beta$ -glucuronidasa y  $\beta$ -galactosidasa. Éstas producen unas colonias oscuras con brillo verde metálico sobre agar eosina - azul de metileno, pero las de algunas cepas de *K. pneumoniae* son similares. Se suele usar agar con rojo neutro y violeta cristal (VRBA o agar McConkey) adicionado de MUG, el que al ser hidrolizado libera un compuesto fluorescente bajo luz ultravioleta (366 nm), o bien un medio cromogénico con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónido y 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido, donde las colonias presentan color violeta. Sin embargo *E. coli* O157H7 no fermenta lactosa ni sorbitol, no posee  $\beta$ -glucuronidasa y no crece a  $45^\circ C$  (23).

Para la identificación se hacen tradicionalmente las pruebas IMVyC, que representan a la producción de indol, las reacciones del rojo de metilo y Voges-Proskauer y el crecimiento en un medio con citrato, mostrando *E. coli* el patrón “+ + - -” aunque algunos aislados forman indol muy lentamente y unos pocos dan todas las pruebas negativas.

CUADRO 2. Incidencia de *Salmonella* observados en hamburguesas crudas en relación al número más probable de *E. coli* (23).

Rango del NMP <i>E. coli</i> /g	Muestras dentro del rango	Muestras positivas para <i>Salmonella</i>	% positivo para <i>Salmonella</i>
< 3	270	2	0,7
3 – 51	406	20	4,9
51 – 100	54	3	5,6
101 – 240	96	4	4,1
241 – 1.100	65	3	4,6
1.101 – 11.000	56	9	16,1
< 11.000	25	5	20,0

Los coliformes y las *Enterobacteriaceae* en general no son habitantes obligados del tracto intestinal de los mamíferos, se encuentran comúnmente en los ambientes donde se

manufacturan alimentos si la desinfección es inadecuada y algunas especies pueden crecer a temperaturas de refrigeración. Por tal motivo suele cuestionarse la premisa de que *E. coli* indica contaminación fecal y la presencia presuntiva de bacterias enteropatógenas (23).

#### RECuento DE BACTERIAS AEROBIAS MESÓFILAS

a. Extraer con un bisturí estéril una capa de 2-3 mm de profundidad y área externa de 10 cm<sup>2</sup> y colocarla en un frasco de vidrio con 100 mL del diluyente y 20 perlas de vidrio estériles. Agitar enérgicamente durante 2 a 3 minutos.

b. Pesar asépticamente 25 g de la muestra picada, agregar 225 mL de diluyente en bolsas de plástico estériles y homogeneizar en un 'Stomacher' durante 2 minutos, o en frascos de vidrio estériles con 20 ó 30 perlas de vidrio. Agitar repetidas veces por espacio de 2 a 3 minutos.

Llevar 1 mL de cualquiera de las suspensiones anteriores (10<sup>-1</sup>) a un tubo con 9 mL de diluyente, mezclar bien (10<sup>-2</sup>) y repetir la operación para obtener sucesivamente otras diluciones según el material analizado. Depositar 0,1 mL de las tres últimas diluciones en sendas placas de agar para recuento y distribuir el inóculo con una varilla de vidrio previamente flameada. Incubar las placas invertidas a 35°C durante 48 hs.

Contar las colonias de las placas que presentan 30 a 300. Multiplicar el número obtenido por la inversa de la dilución correspondiente y la inversa del volumen sembrado para obtener las ufc/g o cm<sup>2</sup>, según corresponda.

c. Pasar un hisopo estéril sobre el área central de la plantilla estéril (100 cm<sup>2</sup>) y colocarlo en un tubo con 10 mL de diluyente. Apretar el hisopo repetidas veces contra las paredes y agitar para recuperar los microorganismos. Cada 0,1 mL del líquido corresponde a 1 cm<sup>2</sup>. Hacer la dilución 10<sup>-1</sup> y otras sucesivas según la superficie analizada. Sembrar e incubar como se indica arriba. Contar las colonias y calcular las ufc/cm<sup>2</sup> multiplicando el número obtenido por la inversa de la dilución correspondiente (2, 23).

Sin embargo *E. coli* es un microorganismo 'índice' de la suerte de los patógenos durante el procesamiento dirigido a eliminarlos o inhibirlos y a su vez es 'indicador' de que el proceso de elaboración no ha sido controlado adecuadamente.

Se suele considerar también a la totalidad de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* como organismos marcadores, en este caso se hacen cultivos en agar McConkey con glucosa (2).

#### RECuento DE *Brochothrix thermosphacta*

Sembrar las placas de agar estreptomycin-talio con 0,1 mL de las diluciones decimales de la muestra, extendiendo el inóculo con una varilla de vidrio en L. Incubar 2 días a 22°C. Contar las colonias regulares y más bien pequeñas.

Si es necesario confirmar, hacer una estría recta en agar TSGY e incubar a 4°C durante 10 días. Son bacilos no esporulados, catalasa positivo.

**AGAR ESTREPTOMICINA-TALIO.** Peptona 7 g, triptona 7 g, peptona de soja 6 g, extracto de levadura 2 g, glicerol 15 g, fosfato dipotásico 1 g, sulfato de magnesio hidratado 15 g, agar 15 g, agua 1 litro, pH 7,0. Esterilizar a 120°C durante 20 minutos. Enfriar hasta 50°C y agregar, en condiciones de asepsia, 10 mL de sulfato de estreptomycin al 5%, 10 mL de cicloheximida al 0,5% y 10 mL de acetato de talio al 0,5%, todas ellas esterilizadas por filtración.

**AGAR TSGY.** Triptona 17 g, peptona de soja 3 g, extracto de levadura 3 g, cloruro de sodio 5 g, fosfato dipotásico 2,5 g, glucosa 2,5 g, agar 15 g, agua 1 litro, Esterilizar a 120°C durante 20 minutos (2).

#### RECuento DE *E. coli*

Preparar las diluciones de la muestra ( $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ ) por alguno de los procedimientos descriptos más atrás. Sembrar 0,1 mL de cada dilución en sendas placas de medio de cultivo. Incubar a 35°C durante 24 - 48 hs.

Incubar a 35°C durante 24 - 48 hs. Contar las colonias oscuras con brillo verde metálico en agar-eosina-azul de metileno o las de color púrpura con halo del mismo color y fluorescentes en agar McConkey-MUG.

**AGAR EOSINA-AZUL DE METILENO.** Peptona 10 g, lactosa 10 g, fosfato dipotásico 2 g, eosina Y (solución acuosa al 2%) 20 mL, azul de metileno (solución acuosa al 0,25%) 25 mL, agar 15 g, agua 1 litro, pH 7,1. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos.

**AGAR MC CONKEY-MUG.** Peptona 20 g, lactosa 10 g, sales biliares 1,5 g, cloruro de sodio 5 g, rojo neutro (sol. hidroalcohólica al 1%) 3 mL, violeta cristal (sol. acuosa al 0,1%) 1 mL, metil-umberiferil- $\beta$ -glucuronido 0,05 g, agar 15 g, agua estéril 1 litro, pH 7,1. Calentar a ebullición hasta disolución completa (2, 23).

### IDENTIFICACION DE *E. coli*

Tomar material de varias colonias y suspenderlas en 1 mL de diluyente. Hacer una tinción de Gram y la reacción de catalasa.

Sembrar por punción con aguja en el medio SIM, y con asa en caldo glucosa y agar citrato. Incubar a 35°C durante 48 hs.

Observar el color del agar citrato si tiene color azul hubo asimilación del citrato.

En el medio SIM el crecimiento de *E. coli* se aleja de la punción de siembra debido a la movilidad y no colorea el medio de negro (H<sub>2</sub>S negativo). Añadir 1 mL del reactivo de Kovac y agitar, al cabo de 10 minutos aparece color rojo en capa superior si hubo formación de indol.

Dividir en dos tubos el cultivo en caldo glucosa.

Tubo 1: agregar unas gotas de rojo de metilo, se verá color rojo si hubo una fermentación ácida mixta.

Tubo 2: añadir 1 mL de  $\alpha$ -naftol y 0,5 mL de creatina alcalina, dejar en reposo hasta 3 hs. Si hubo formación de acetoína, un intermediario de la fermentación butilén-glicólica, aparecerá un color rojo (reacción de Voges-Proskauer).

**AGAR CITRATO DE SIMMONS.** Sulfato de magnesio heptahidrato 0,2 g, fosfato monoamónico 1 g, fosfato dipotásico 1 g, citrato de sodio dihidrato 2 g, cloruro de sodio 5 g, azul de bromotimol (solución al 0,2%) 40 mL, agar 15 g, agua 1 litro, pH 6,8-7. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos.

**MEDIO SIM.** Triptona 20 g, peptona de soja 6 g, sulfato ferroso amónico 0,2 g, tiosulfato de sodio 0,2 g, cloruro de sodio 5 g, agar 3,5 g, agua 1 litro, pH 7,3. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos.

**CALDO GLUCOSA.** Proteosa-peptona 5 g, glucosa 5 g, fosfato dipotásico 5 g, agua 1 litro. Esterilizar a 120 °C durante 15 minutos.

**$\alpha$ -NAFTOL.** Disolver 1 g en 20 mL de etanol y usar.

**CREATINA ALCALINA.** Disolver 0,3 g de creatina y 40 g de hidróxido de potasio, en 100 mL de agua destilada.

**ROJO DE METILO.** Disolver 10 mg en 30 mL de etanol 96° y añadir 20 mL de agua, esta solución es roja a pH 4,4 y amarilla a pH 6,2.

**REACTIVO DE KOVAC.** Disolver 1 g de p-dimetil-amino-benzaldehído en 15 mL de alcohol isoamílico y añadir 20 mL de ácido clorhídrico concentrado (2, 25).

La investigación de la presencia de *Salmonella* se hace mediante un enriquecimiento en el caldo con verde malaquita de Rappaport-Vassiliadis y luego un cultivo sobre un medio selectivo, por ejemplo el agar xilosa lisina desoxicolato

adicionado de novobiocina o el agar cromógeno selectivo para *Salmonella* (2).

El *S. aureus* se aísla en agar Baird-Parker y la mayoría de las cepas productoras de enterotoxinas forman coagulasa (2).

El recuento de *C. perfringens* se lleva a cabo en anaerobiosis con el medio agar-sulfito-hierro-cicloserina. Las colonias negras obtenidas a 46°C se examinan para comprobar morfología, ausencia de movilidad y producción de indol (2). Las células somáticas pierden viabilidad si el alimento es congelado antes del análisis (23).

#### PRESENCIA-AUSENCIA DE *E. coli* O157:H7

Suspender la muestra en el diluyente para revitalizar las células y dejar a 30°C durante 4 a 6 hs. Agregar igual volumen del medio de enriquecimiento concentrado. Incubar durante 18-24 hs a 37°C.

Hacer el aislamiento sobre agar McConkey-sorbitol-TC e incubar a 37°C durante 24-48 hs.

Observar las colonias incoloras y confirmar mediante una prueba serológica de aglutinación.

**MEDIO DE ENRIQUECIMIENTO CONCENTRADO.** Peptona 20 g, glucosa 5 g, fosfato dipotásico 8 g, fosfato monopotásico 2 g, bilis de buey 40 g, verde brillante (sol. acuosa al 0,5%) 3 mL, agua esteril 1 litro, pH 7,2. Calentar a ebullición hasta disolver.

**AGAR MC CONKEY-SORBITOL-TC.** Peptona 20 g, sorbitol 10 g, desoxicolato de sodio 1 g, cloruro de sodio 5 g, violeta cristal (sol. acuosa al 0,1%) 1 mL, rojo neutro (sol. hidroalcohólica al 1%) 3 mL, agar 15 g, agua estéril 1 litro, pH 7,1. Calentar a ebullición para disolver y enfriar a 50°C, agregar las soluciones apropiadas de telurito de potasio y cefixima para obtener las concentraciones de 2,5 y 0,05 mg/L, respectivamente (23).

El art 255 bis del CAA sobre carne vacuna cruda, de humedad intermedia ( $a_w=0,83-0,88$ ) y envasada al vacío, establece como valores máximos: pH 5,2, NaCl 10%, ácido sórbico 0,12 %, recuento de mesófilos (a 35°C)  $10^6$  ufc/g, esporulados anaerobios 100 ufc/g, enterobacterias 10 ufc/g, *S. aureus* coagulasa positiva 100 ufc/g. El art 379 bis sobre carne cocida ( $a_w=0,85-0,91$ ) y envasada al vacío, indica los siguientes valores máximos de ufc/g: recuento de mesófilos (a 35°C)  $10^3$ ,

esporulados anaerobios 100, enterobacterias 10, *S. aureus* coagulasa positiva 10.

El art 360 del CAA que trata del fiambre de cerdo cocido establece la ausencia de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* en 25 g, y los siguientes valores máximos de ufc/g: coliformes totales 100, *E. coli* 10, *S. aureus* coagulasa positiva 100, clostridios sulfito-reductores 100, mohos y levaduras  $10^3$  (25).

La triquinoscopia directa de la musculatura de cerdos y equinos es un procedimiento sencillo y económico para detectar las larvas enquistadas de *Trichinella*, pero puede pasar desapercibida una baja parasitosis. Se mejora mediante la digestión artificial del músculo (27). El empleo de técnicas serológicas facilita el análisis, especialmente el ensayo comercial de inmunoabsorción enzimática (ELISA) que tiene una sensibilidad del 100% y una especificidad del 97% (28).

#### REFERENCIAS

1. ICMSF. 1998. Microorganisms in Foods - Microbial Ecology of Food Commodities. Vol 6, Blackie Academic & Professional, London, p 1.
2. Mossel DAA *et al.* 2003. Microbiología de los Alimentos. 2ª ed, Acribia, Zaragoza, p 493, 510, 636.
3. Stiles ME, Ng LK. 1981. Appl Environ Microbiol 41 : 867.
4. Doyle MP, Schoeni JL. 1987. Appl Environ Microbiol 53 : 2394.
5. Hayes JR *et al.* 2003. Appl Environ Microbiol 69 : 7153.
6. Smith LT. 1996. Appl Environ Microbiol 62 : 3088.
7. Zaho C *et al.* 2001. Appl Environ Microbiol 67 : 5431.
8. Hall HE, Angelotti R. 1965. Appl Microbiol 13 : 352.
9. Jay JM. 1967. Appl Microbiol 15 : 943.
10. Dickson JS, Koohmaraie M. 1989. Appl Environ Microbiol 55 : 832.
11. Gill CO, Penney N. 1977. Appl Environ Microbiol 33 : 1284.
12. McMeekin TA, Patterson JT. 1975. Appl Microbiol 29 : 165.
13. Doyle MP *et al.*, eds. 1997. Food Microbiology - Fundamentals and Frontiers. ASM Press, Washington, p 83, 478.
14. Koutsoumanis K *et al.* 2006. Appl Environ Microbiol 72 : 124.
15. Prieto M *et al.* 1994. Arch Lebensmittelhyg 45 : 83.
16. Jay JM *et al.* 2005. Modern Food Microbiology. 7ª ed, Springer, New York, p 63.
17. Ercolini D *et al.* 2006. Appl Environ Microbiol 72 : 4663.
18. Gill CO, Tan KH. 1980. Appl Environ Microbiol 39 : 317.
19. Hamasaki Y *et al.* 2003. Appl Environ Microbiol 69 : 3668.
20. Smith LT. 1996. Appl Environ Microbiol 62 : 3088.
21. ICMSF. 1996. Microorganismos de los Alimentos - Características de los Patógenos Microbianos. Acribia, Zaragoza, p 147.
22. Cicuta ME *et al.* 2006. Rev Vet 17 : 20.

23. Downes FP, Ito K, eds. 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4<sup>o</sup> ed, APHA, Washington, p 69, 325.
24. Castro BP de, *et al.* 1988. *Appl Environ Microbiol* 54 : 1462.
25. Código Alimentario Argentino. <http://www.anmat.gov.ar/codigoa/caa1.htm> Cap 6.
26. Collins CH *et al.* 1999. *Microbiological Methods*. 7<sup>o</sup> ed, Butterworth-Heinemann, Oxford, p 222.
27. Jimenez Cardozo E *et al.* 2005. *Vet Mex* 36: 269.
28. Bartoloni A *et al.* 1999. *Rev Panam Salud Publica* 5: 97.