PROGRAMA PROCIENCIA – CONVOCATORIA 2015

Proyecto PINV 15-620

Prevención de Enfermedades Transmitidas por Alimentos: Aislamiento de *Salmonella spp*., *E. coli* O157:H7 y *E. coli* productor de Toxina Shiga (STEC) no O157 en el proceso de elaboración de carne molida fresca destinada a consumo minorista.

Diciembre 2020

Laboratorio Central de Salud Pública - MSPyBS
Instituto Nacional de Alimentación y Nutrición - MSPyBS
Municipalidad de Asunción

INTRODUCCIÓN

- *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) O157:H7, *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC) no-O157 y la *Salmonella spp* son patógenos asociados a enfermedades transmitidas por alimentos, fundamentalmente los de origen animal.
- Se investigo la presencia de dichos microorganismos en el procesamiento de la carne molida fresca comercializada en Asunción.
- Estudio observacional analítico de corte transversal.
- Aprobado por CEI- LCSP

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la calidad microbiológica de la carne molida fresca procesada comercializada en Asunción destinada al consumo minorista; e implementar acciones de prevención y control para prevenir Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) asociadas al consumo de carne.

OBJETIVO ESPECIFICOS

FASE 1:

- **Describir el estatus sanitario de las carnicerías de Asunción.**

  - Cuantificar el riesgo de las carnicerías en cuanto a contaminación microbiológica atraves de una encuesta.
  - Determinar la presencia de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC) no-O157 en carne molida fresca y muestras ambientales como manos de los manipuladores, picadora, mesada y cuchillos.
  - Caracterizar los aislamientos de los citados patógenos mediante técnicas fenotípicas, genotípicas y de epidemiología molecular.

OBJETIVO ESPECIFICOS

Fase 2

- **Implementar acciones de mejora, tendientes a mejorar la calidad del producto final:**

  - Realizar capacitaciones colectivas en BPM (Buenas Prácticas de Manufactura), BPH (Buenas Prácticas de Higiene) y POES (Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento) a los manipuladores de alimentos de las carnicerías y al personal vinculado a las mismas (supervisores, encargados, etc.).

OBJETIVO ESPECIFICOS

Fase 3

- **Verificar el éxito de las acciones de mejora implementadas:**
  - Cuantificar el riesgo de las carnicerías a través de la misma encuesta.
  - Determinar la presencia de *Salmonella spp*., *E. coli* O157:H7 y *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC) no-O157 en carne molida fresca y muestras ambientales como manos de los manipuladores, picadora, mesada y cuchillos,
  - Caracterizar los aislamientos de los citados patógenos mediante técnicas fenotípicas, genotípicas y de epidemiología molecular.

Selección de las Carnicerías

- **Criterios de inclusión:** Toda carnicería seleccionada de forma aleatoria que cuenten con patente municipal relacionada al rubro de operación (alimentos).

- **Criterios de exclusión:** Las carnicerías que no acepten participar del estudio que cuenten con patente municipal relacionada al rubro de operación (alimentos).

- **Aspectos demográficos:** Participaran del estudio carnicerías ubicadas en la Ciudad de Asunción que estén registradas y con patente municipal relacionada al rubro de operación (alimentos) otorgada por la Municipalidad de Asunción.

Selección de las Carnicerías

Fueron seleccionadas 52 carnicerías de forma aleatoria, cumpliendo con los criterios de inclusión y exclusión , ubicadas en dos mercados (Mercado 4 y Mercado Abasto) , supermercados y otros locales de expendio. Que fueron visitadas por Inspectores de la Municipalidad de Asunción.

Fase	Mes / Año	Cantidad Carnicerias	Cantidad Muestras Recolectadas	Observacion
Primera	junio-20	52	259	Una carniceria no contaba con molinillo de carne.
Segunda	agosto-20 septiembre-20	52	0	-
Tercera	octubre-20	48	237	4 Carnicerias estaban clausuradas . 3 Carnicerias no contaban con molinillo de carne

Encuestas

Se aplico una encuesta, para cuantificar el riesgo de contaminación del proceso de producción de la carne molida fresca. Previamente se realizo una capacitación a los supervisores de la Municipalidad de Asunción para la realización de la encuesta.

Encuestas

Se consideraron diferentes variables que fueron cuantificadas según la importancia y el impacto durante el proceso de producción :

- Situación y condiciones de la edificación
- Equipos y herramientas
- Personal en el Área de Producción /Manipulación/Venta .
- Materia prima y productos a la Venta.
- Flujo de producción, manipulación y venta

Lista de inspección para carnicerías.
Proyecto de investigación "Patógenos en carne molida"

A – IDENTIFICACIÓN

Fecha	
Responsable y/o encargado	
Dirección física del comercio	
Habilitación municipal:	
Contacto propietario (Tel, Cel, Mail)	
Nombre del local:	

Capacidad operatoria para moler carne a granel. SÍ - NO
Posee filtros sanitarios suficientes. SÍ – NO

Alimentos que comercializa:
1º Listos para comer (fiambres, quesos, pan, entre otros)
2º Verduras.
3º Alimentos procesados (envasados)
4º Pescados.

Identificación de principales proveedores:
*Cárnicos (frigorífico/distribuidor):
*Verduras:
*Procesados:
*consignando dirección física.

Grupo de riesgo: (Menor – Mayor – Serio – Crítico)

Menor: Se considera defecto menor, cuando la concurrencia de un peligro, no resulte en la obtención de un producto que presente RIESGOS para la salud pública, así como fraude económico o deterioro.

Mayor: Se considera defecto mayor, cuando la concurrencia de un peligro, puede resultar en la obtención de un producto que presente RIESGO para la salud pública, así como fraude económico o deterioro.

Serio: Se considera defecto serio, cuando la concurrencia de un peligro, resulta en la obtención de un producto con mucha probabilidad de RIESGO para la salud pública, así como fraude económico o deterioro.

Crítico: Se considera defecto crítico cuando la concurrencia de un peligro, resulta automáticamente en la obtención de un producto con mucha probabilidad de RIESGO para la salud pública, así como fraude económico o deterioro.

B- EVALUACIÓN: Marcar para cada ítem analizado, en el casillero de "Clasificación", SÍ, NO o No Aplicable (N.A) según corresponda.

Ítem	Descripción	Calificación		
B.1	SITUACIÓN Y CONDICIONES DE LA EDIFICACIÓN	SÍ	NO	N.A
1.1	Ausencia de basura, objetos en desuso, animales, insectos y roedores, en el área interna y en los alrededores.	4	0	4
1.2	Pisos adecuados: 1.2.1.- No hay deterioro, se han efectuado las reparaciones necesarias, no hay grietas ni agujeros.	1	0	1
	1.2.2.- Se encuentra en condiciones de limpieza (sin restos de comida, no resbaladizos, sin suciedad)	1	0	1
1.3	Cielo rasos y techos: 1.3.1.- Sin, grietas, pintura descascarada, etc.	1	0	1
	1.3.2.- Sin suciedad, telas de araña, etc.	1	0	1
1.4	Paredes y divisorias: 1.4.1.- Permanece el acabado liso, azulejado completo sin faltantes, no hay rajaduras ni grietas.	1	0	1
	1.4.2.- Se encuentran limpias, sin suciedad, materia grasa adherida, manchas, etc.	1	0	1
1.5	Puertas y ventanas: Se encuentran en buen estado de conservación	1	0	1
1.6	Protección contra insectos y roedores: en todas las aberturas telas mosquiteras, cortinas o puertas con cierre a resorte.	4	0	4
1.7	Iluminación: La adecuada según el sector, con protección y de acuerdo a las indicaciones.	1	0	1
1.8	Ventilación: Ambiente y temperatura adecuados, no hay olores desagradables.	1	0	1
1.9	Instalaciones sanitarias: 1.9.1. - Se ajustan a la norma MERCOSUR 80/96 en cuanto a instalaciones.	2	0	2
	1.9.2.- Limpieza y desinfección adecuadas. Hay elementos de higiene personal adecuados.	4	0	4
1.10	Vestuarios: 1.10.1.- Se ajustan a la norma MERCOSUR 80/96 en cuanto a instalaciones y ubicación.	1	0	1
	1.10.2.- Limpieza y desinfección adecuadas. Hay armarios en cantidad y otros elementos adecuados.	2	0	2
1.11	Lavatorios en el área de manipulación 1.11.1.- En cantidad, ubicación y condiciones de instalación adecuadas.	2	0	2
	1.11.2.- Posee los elementos de higiene personal adecuados y se encuentra en buen estado de limpieza.	4	0	4
1.12	Abastecimiento de agua potable	8	0	8
1.13	Tanque de agua: 1.13.1.- Presión adecuada.	4	0	4
	1.13.2.- Desinfectado cada 6 meses y documentado.	8	0	8
1.14	Destino adecuado de los residuos 1.14.1.- Basura en el interior del establecimiento en recipientes con bolsa y tapa. Restos almacenados adecuadamente para su recolección posterior.	4	0	4
	1.14.2.- Residuos líquidos adecuadamente tratados y arrojados sin molestar ni dañar al ambiente.	2	0	2
1.15	Sector de lavado de equipos y herramientas: Dotados con agua caliente y productos adecuados y que no contaminan áreas de procesamiento de alimentos.	2	0	2

Referencia Bibliográfica:

Carnicerías saludables. Resumen del proyecto que apunta a mejorar la calidad e inocuidad de los productos cárnicos que consumen los argentinos. Leotta G.A., Linares L.H., Ortega E.E., Adriani C. 2014. Instituto de Promoción de la Carne Vacuna Argentina. Cuadernillo Técnico Nº 14.
Encuesta evaluación de riesgo: Leotta y colaboradores. Programa carnicerías saludables.

Ítem	Descripción	Calificación		
B.2	EQUIPOS Y HERRAMIENTAS	SÍ	NO	N.A
2.1	2.1.1.- Se mantiene el estado de conservación y funcionamiento de artefactos, utensilios y demás elementos.	2	0	2
	2.1.2.- Se encuentran limpios, sin suciedad, sin restos de alimentos u otras materias.	4	0	4
2.2	Utensilios 2.2.1.- Se encuentran en buen estado de conservación y en cantidad suficiente.	2	0	2
	2.2.2.- Se encuentran limpios.	4	0	4
2.3	Mobiliario 2.3.1.- En cantidad suficiente, ajustado a normativa y en buen estado de conservación.	2	0	2
	2.3.2.- En buen estado de limpieza	4	0	4
2.4	Equipos de refrigeración – congelación 2.4.1.- En cantidad suficiente, ajustado a normativa y en buen estado de conservación. Con termómetro.	8	0	8
	2.4.2.- En buenas condiciones de higiene.	8	0	8
2.5	Limpieza y desinfección adecuadas: Utiliza detergentes y desinfectantes aprobados.	8	0	8
2.6	Colocación de herramientas y equipos en lugar apropiado, en forma ordenada y protegidos de la contaminación.	8	0	8
	CB2=Calificación del Bloque 2 TS2= Total de las calificaciones "SÍ" obtenidas. TNA2= Total de las calificaciones "No aplicable" obtenidas. K2= 50 (Constante del Bloque 2) I 2= 15 (Importancia del Bloque 2) Concluida la Auditoría del presente cuadro, se procederá a resolver la ecuación, agregando a la fórmula el total de TS2 y TNA2.	CB2= $\frac{TS2 \times 15}{50 - TNA2}$		

Ítem	Descripción	Calificación		
B.3	PERSONAL EN EL ÁREA DE PRODUCCIÓN/MANIPULACIÓN/VENTA	SÍ	NO	N.A
3.1	**Indumentaria** 3.1.1.- Ajustada a Normativa	2	0	2
	3.1.2.- Limpia y adecuadamente conservada.	8	0	8
3.2	**Aseo personal**: se evidencia cumplimiento de normas.	8	0	8
3.3	Hábitos personales: Adecuados y ajustados a las normas vigentes.	4	0	4
3.4	**Estado de salud**: ausencia de evidencia de enfermedades.	10	0	10

Ítem	Descripción	Calificación		
B.4	MATERIAS PRIMAS Y PRODUCTOS A LA VENTA	SÍ	NO	N.A
4.1	Se controla la recepción de materia prima de acuerdo a las BPM (envases, rótulos, procedencia, facturas, certificados)	4	0	4
4.2	Se controla la organolepsia y temperatura de las materias primas y productos terminados.	8	0	8
4.3	Las materias primas y productos se conservan adecuadamente en refrigeradores, freezers, cámaras o depósitos secos, evitando alteraciones. PEPS adecuado. (FIFO)	6	0	6
4.4	¿Se conservan las partes selladas?	6	0	6
	CB4=Calificación del Bloque 4 TS4= Total de las calificaciones "SÍ" obtenidas. TNA4= Total de las calificaciones "No aplicable" obtenidas. K4= 24 (Constante del Bloque 4) I 4= 20 (Importancia del Bloque 4) Concluida la Auditoría del presente cuadro, se procederá a resolver la ecuación, agregando a la fórmula el total de TS4 y TNA4.	$CB4 = \frac{TS4 \times 20}{24 - TNA4}$		

B.5	FLUJO DE PRODUCCIÓN/MANIPULACIÓN/VENTA Y CONTROL	SÍ	NO	N.A
5.1	El flujo es lineal de un solo sentido, evitando la contaminación cruzada. Lugares de preparación previa (área sucia) aislados (la separación física es adecuada)	4	0	4
5.2	La manipulación de productos es mínima e higiénica y se previene la contaminación cruzada.	8	0	8
5.3	Los alimentos están protegidos contra la contaminación (polvo, insectos, roedores)	4	0	4
5.4	Las sustancias químicas tóxicas y peligrosas son almacenadas evitando la contaminación.	4	0	4
5.5	Almacenamiento 5.5.1.- Alimentos perecederos a temperatura de congelación (-18 °C a -15 °C), refrigerados a 0 – 7 °C o por encima de 65 °C de acuerdo al producto.	8	0	8
	5.5.2.- Alimentos almacenados separados por tipo o grupos, sobre tarimas, plataformas o estantes, en lugar limpio y conservado.	4	0	4
5.6	Las sobras se eliminan en forma inmediata.	4	0	4
5.7	Características organolépticas del producto final adecuadas.	4	0	4

Metodología de Toma de Muestras

a) **<u>Muestras de carne molida fresca</u>:** Carne molida de primera o de segunda de venta al peso comercializada en bocas de expendio en la ciudad de Asunción. Se tomaron 500 gramos de carne molida por cada carnicería, preparada de la misma forma en que se entregaría al cliente.

Metodología de Toma de Muestras

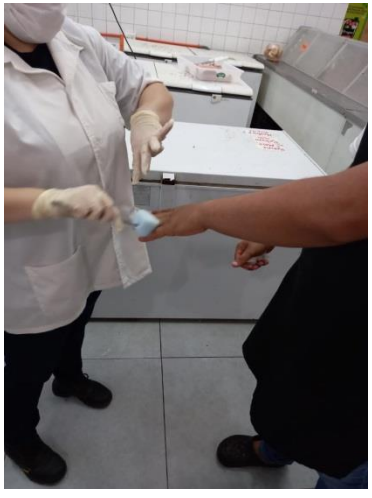
b) <u>Muestras ambientales</u>: Se tomaron muestras de cada una de las siguientes superficies. Se utilizaron esponjas estériles hidratadas con agua peptonada estéril. Las muestras ambientales fueron remitidas al INAN/LCSP para el análisis de *E.coli* O157:H7; STEC no-O157 y *Salmonella* spp.

A-Manos manipulador

D-Mesada,

B-Molino picador

C-Cuchillo



CORRECTO LAVADO DE MANOS

Capacitaciones a las Carnicerías

En la Fase 2 se capacitaron 52 carnicerías , estas capacitaciones fueron impartidas por los supervisores y responsables del Área de Inocuidad de Alimentos de la Municipalidad de Asunción, se realizaron por grupo y . La capacitación se basó en Buenas Prácticas de Manufactura), BPH (Buenas Prácticas de Higiene) y POES (Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento)

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

PROCIENCIA

Con el apoyo de: Feei

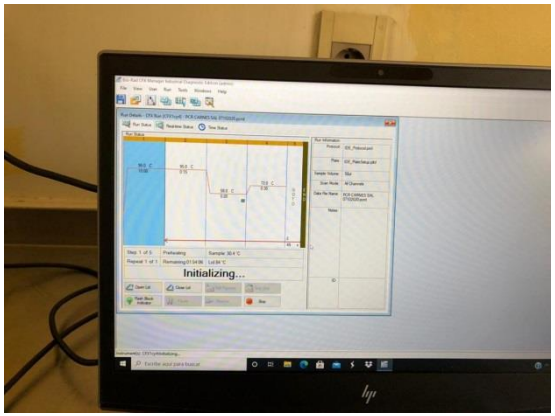
Municipalidad de Asunción

INAN Instituto Nacional de Alimentación y Nutrición

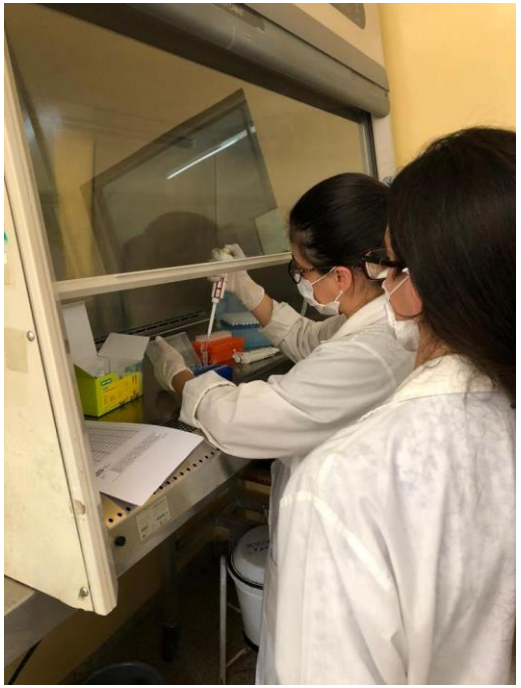
Análisis Microbiológico

Tamizaje Molecular PCR-RT para *Salmonella spp.*

- En cada muestra obtenida se realizó el tamizaje para detección por RT-PCR (PCR de tiempo real) para Salmonella basado en la Norma USDA FSIS MLG 4.10. utilizando el Kit IQ-Check Salmonella II PCR Detection



Kit IQ-Check Salmonella II PCR Detection

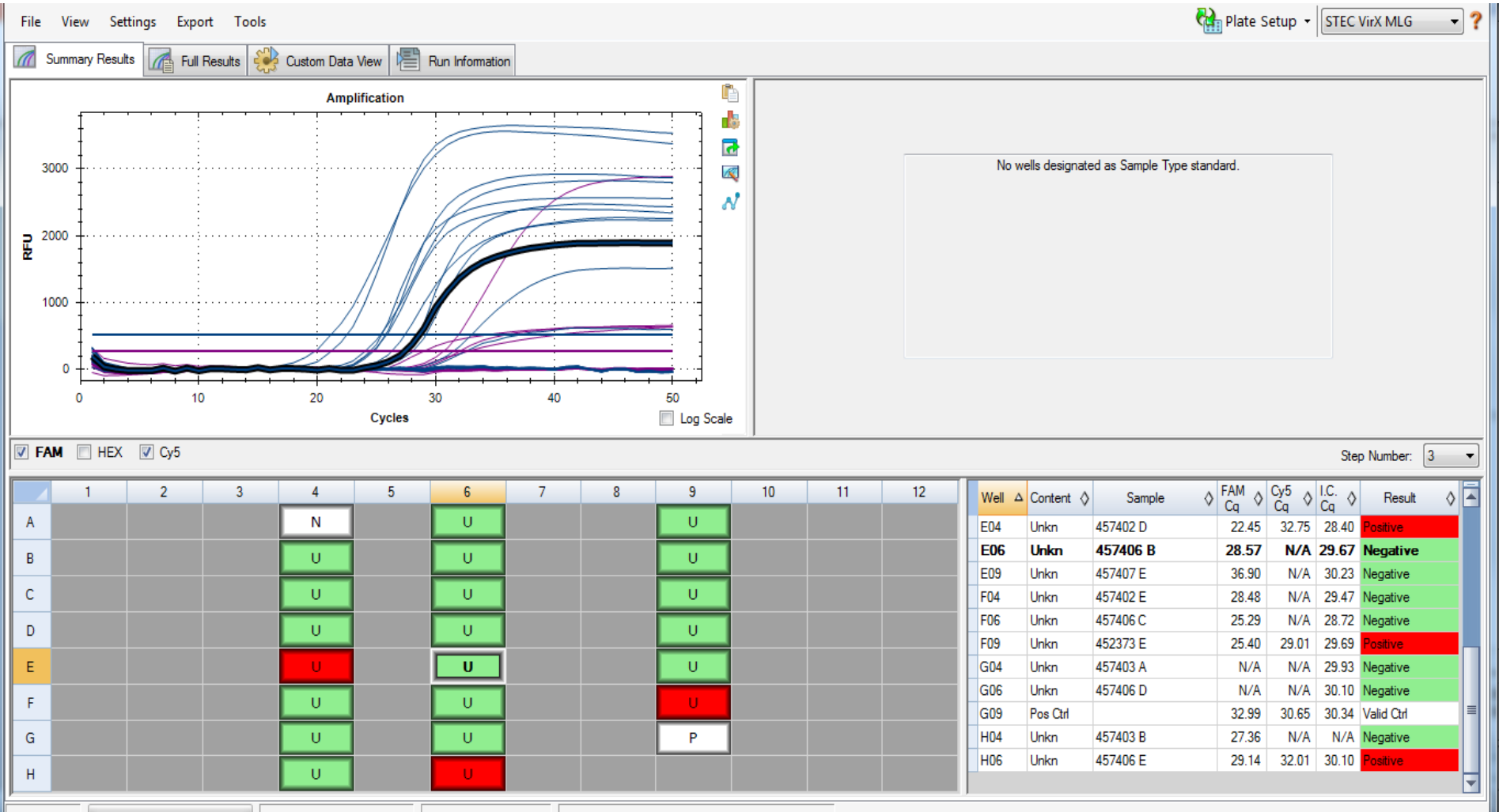


Tamizaje Molecular PCR-RT para STEC

- Se utilizo el Equipo CFX96 Touch Deep Well Real Time PCR Detection System y el CFX Manager Software
- Se realizo la detección de STEC a cada una de las muestras por RT-PCR (PCR de tiempo real) basado en la Norma USDA FSIS MLG 5.0 utilizando el Kit IQ-Check VirX PCR Detection

Kit IQ-Check VirX PCR Detection

Corrida de RT-PCR



Aislamiento y tipificación de *Salmonella spp.*

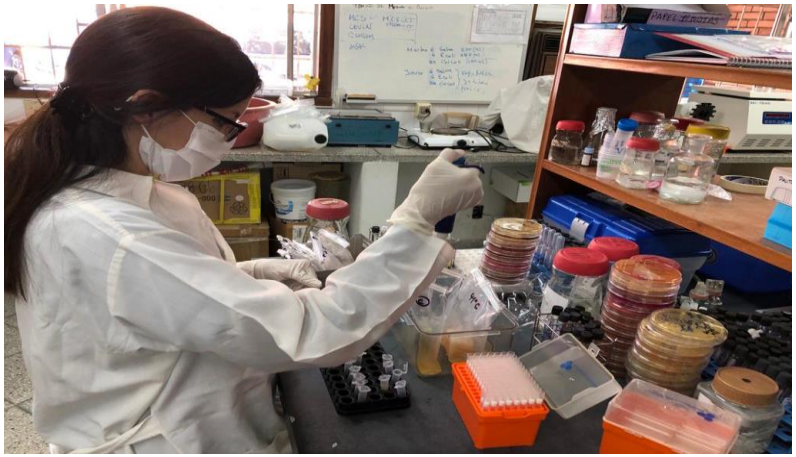
- El aislamiento y tipificación de *Salmonella* spp se realizó mediante el procedimiento de INAN con código MI-PE-504-6_Método horizontal para la detección de Salmonella; basado en la Norma UNE-EN ISO 6579-2002 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp”.

Caracterización fenotípica y genotípica- Metodología

- Los aislamientos de *Salmonella* spp. fueron identificados por pruebas bioquímicas siguiendo el esquema de Edwin y Edwards.
- Fueron serotipificados según el esquema propuesto por Kauffman y White.
- Se testaron antibióticos como, Ampicilina (10 ug.), Cefotaxima (30 ug.), Amoxicilina-Acido Clavulanico (20/10 ug.), Ceftazidima (30 ug.), Acido Nalidixico (30 ug.), Ciprofloxacina (5 ug.), Levofloxacina (5 ug.), Trimetoprim-Sulfametoxasol (1.25/23.75 ug.), Gentamicina (10 ug.), por medio del método de difusión en agar (Kirby Bauer) y se interpretación se realizó por el CLSI 2020.
- Finalmente *Salmonella* spp. fueron estudiadas mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE) utilizando la enzima de restricción *xbaI* según protocolos estandarizados correspondientes a la Red PulseNet Internacional, desarrollado por CDC, USA.

Aislamiento y tipificación de STEC

- Todas las muestras positivas para los genes stx y eae se sembraron en Agar Mac Conkey sorbitol y se incubaron 37ºC por 18 a 24 hs.
- De cada placa de Agar Mac Conkey sorbitol se seleccionaron cincuenta colonias con morfología de *E. coli* que fueron grilladas y agrupadas en pooles y posteriormente analizadas para los genes stx1 y stx2 mediante PCR múltiple
- Los pooles positivos fueron resembrados, aislados y confirmados mediante la PCR múltiple anteriormente descripta.



Referencia Bibliografica: Leotta GA, Chinen I, Epszteyn S, Miliwebsky E, Melamed IC, Motter M, et al. Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. Rev Arg Microbiol.2005; 37: 1–10.

Caracterización fenotípica y genotípica- Metodología

Caracterización y subtipificación de los aislamientos de STEC :

- Los aislamientos con señales positivas en la PCR multiplex fueron caracterizados mediante identificación bioquímica de Edwin y Edwards.

- Se realizo la búsqueda ge los genes *wzx* correspondiente a las los big six O26, O45, O103, O111, O121, y O145 por la técnica de PCR de punto final (1)
- Se determino la presencia de los sgts genes *eae* (intimina), hlya (enterohemolisina), saa (*E. coli* productora de toxina Shiga autoaglutinante de adherencia) (xxxx).

- Se determino el subtipo de las toxinas xxxxx

1- **Development of Three Multiplex PCR Assays Targeting the 21 Most Clinically Relevant Serogroups Associated with Shiga Toxin-Producing *E. coli* Infection in Humans** / https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117660

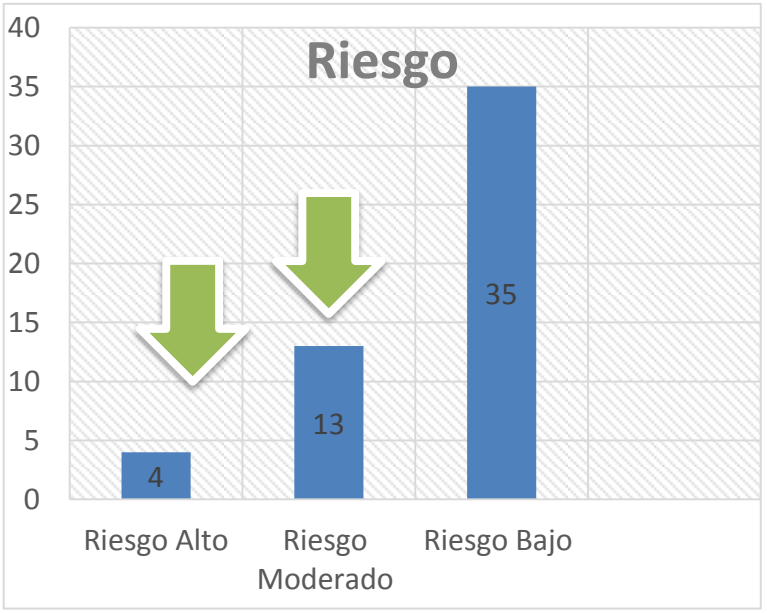
Caracterización fenotípica y genotípica- Metodología

- Fueron estudiados los ATB Ampicilina (10 ug.), Cefotaxima (30 ug.), Amoxicilina-Acido Clavulanico (20/10 ug.), Ceftazidima (30 ug.), Acido Nalidixico (30 ug.), Ciprofloxacina (5 ug.), Levofloxacina (5 ug.), Trimetoprim-Sulfametoxasol (1.25/23.75 ug.), Gentamicina (10 ug.), por medio del método de difusión en agar (Kirby Bauer) y se interpretación se realizó por el CLSI 2020.

- Todos los aislamientos de STEC no-O157 fueron estudiados mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE) utilizando la enzima *XBAI* según protocolos estandarizados correspondientes a la Red PulseNet Internacional, desarrollado por CDC, USA.

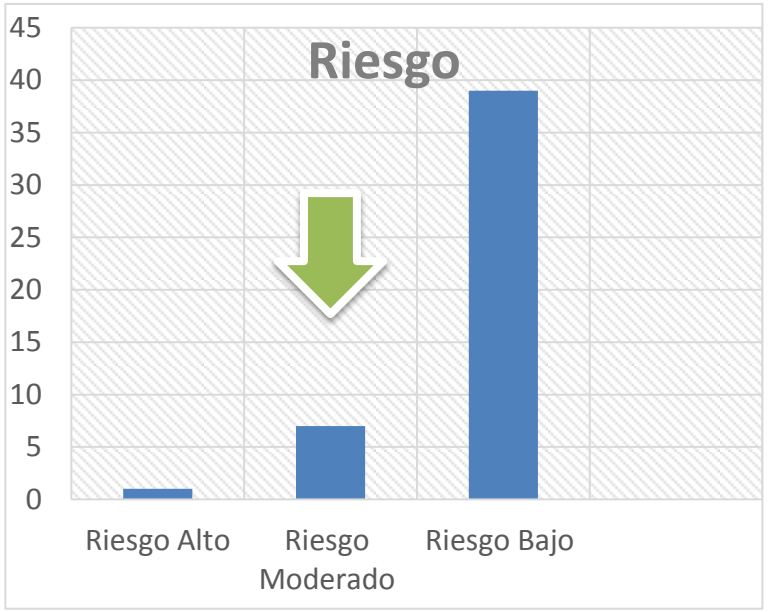
RESULTADOS

Niveles de riesgo según encuesta



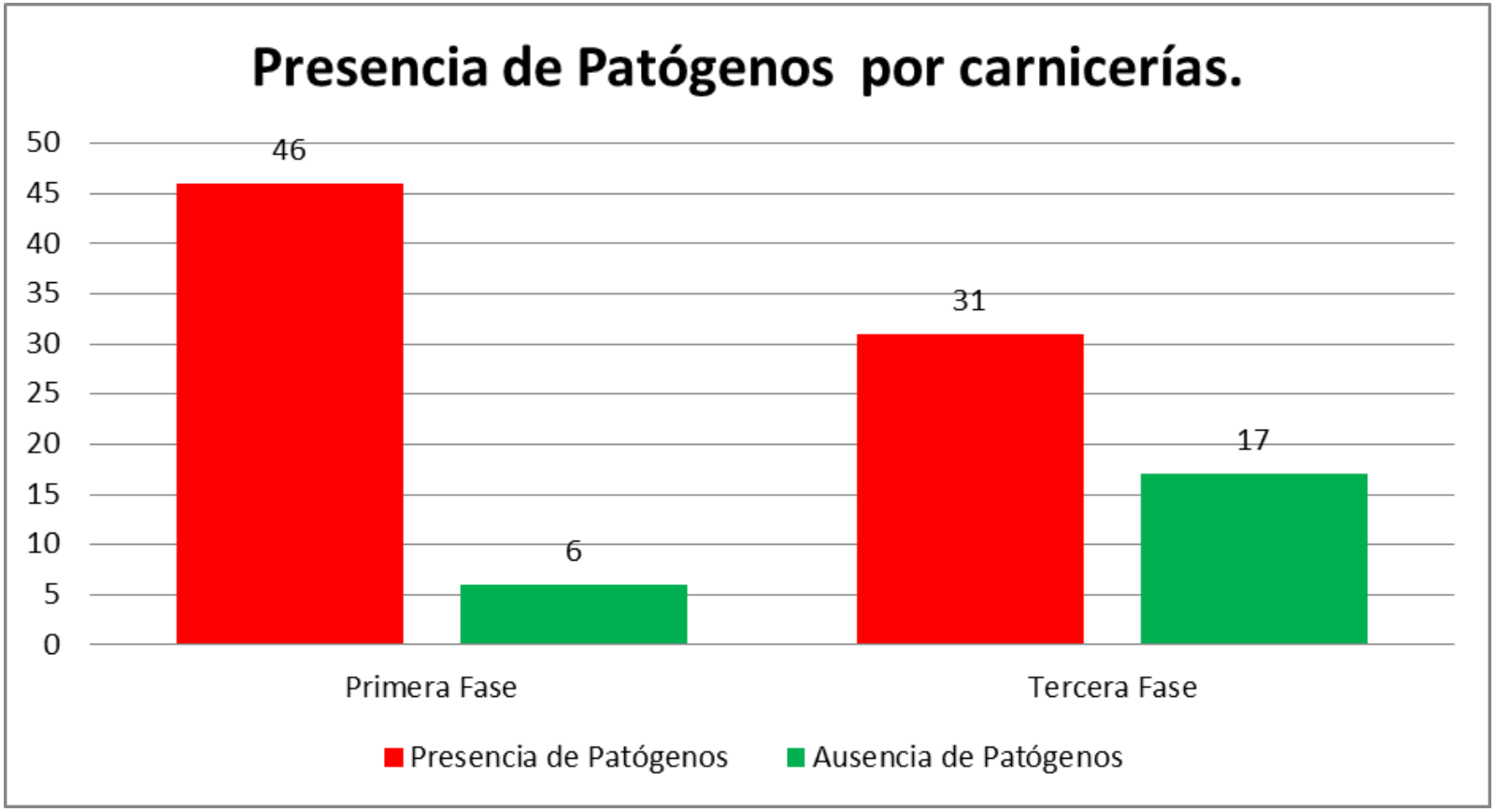
n=52 carnicerías

Cambiar el grafico 0, 4, 44



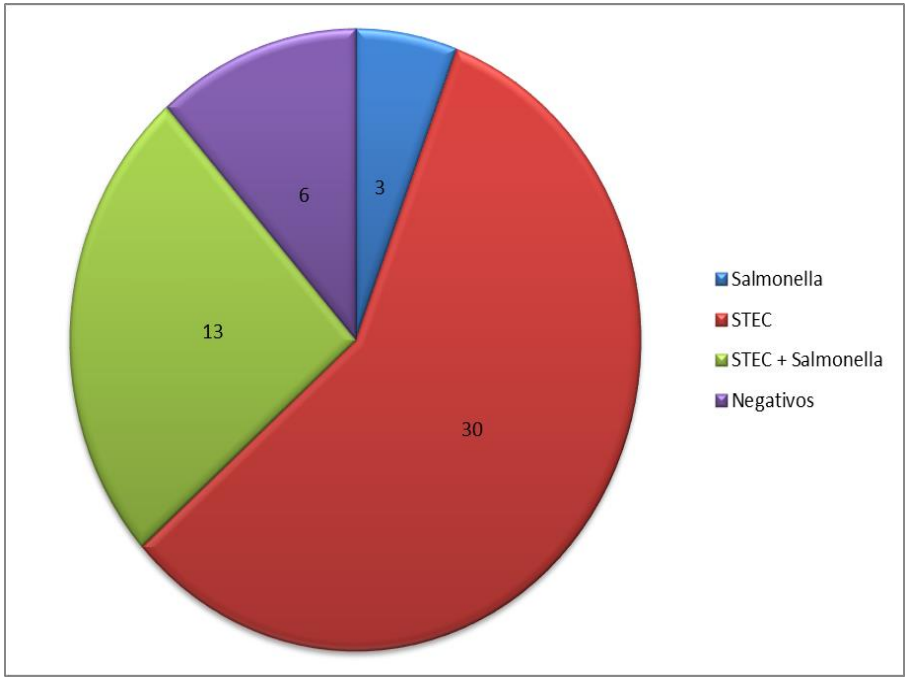
n=48 carnicerías

Calidad Microbiológica


Presencia de Patógenos por carnicerías.
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
46
6
31
17
Primera Fase
Tercera Fase
Presencia de Patógenos
Ausencia de Patógenos

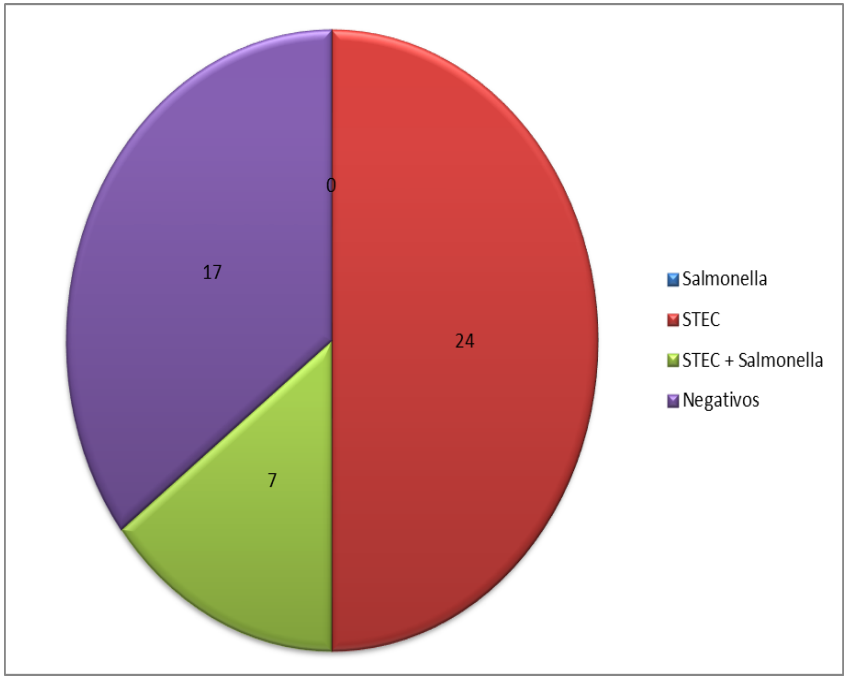
RESULTADOS MICROBIOLOGICOS
Carnicerías

PRIMERA FASE



n=52 carnicerías

TERCERA FASE



n=48 carnicerías

Muestras Carnes y Superficies

- Fueron recolectadas **496** muestras (**100** de carne molida y **396** se superficies).

- De las **259** muestras procesadas en la primera etapa, se detectó STEC en una frecuencia del **47% (122/259)** y Salmonella **10 % (25/259)**. En el segundo muestreo post intervención los resultados presentaron los siguientes datos: 30% (71/237) de frecuencia para STEC y 6% de Salmonella (15/237).

- Se detectaron la presencia de ambas bacterias en la misma muestra en un 6% (30/496) durante toda la investigación. No se detectaron cepas con señal positiva para STEC O157.

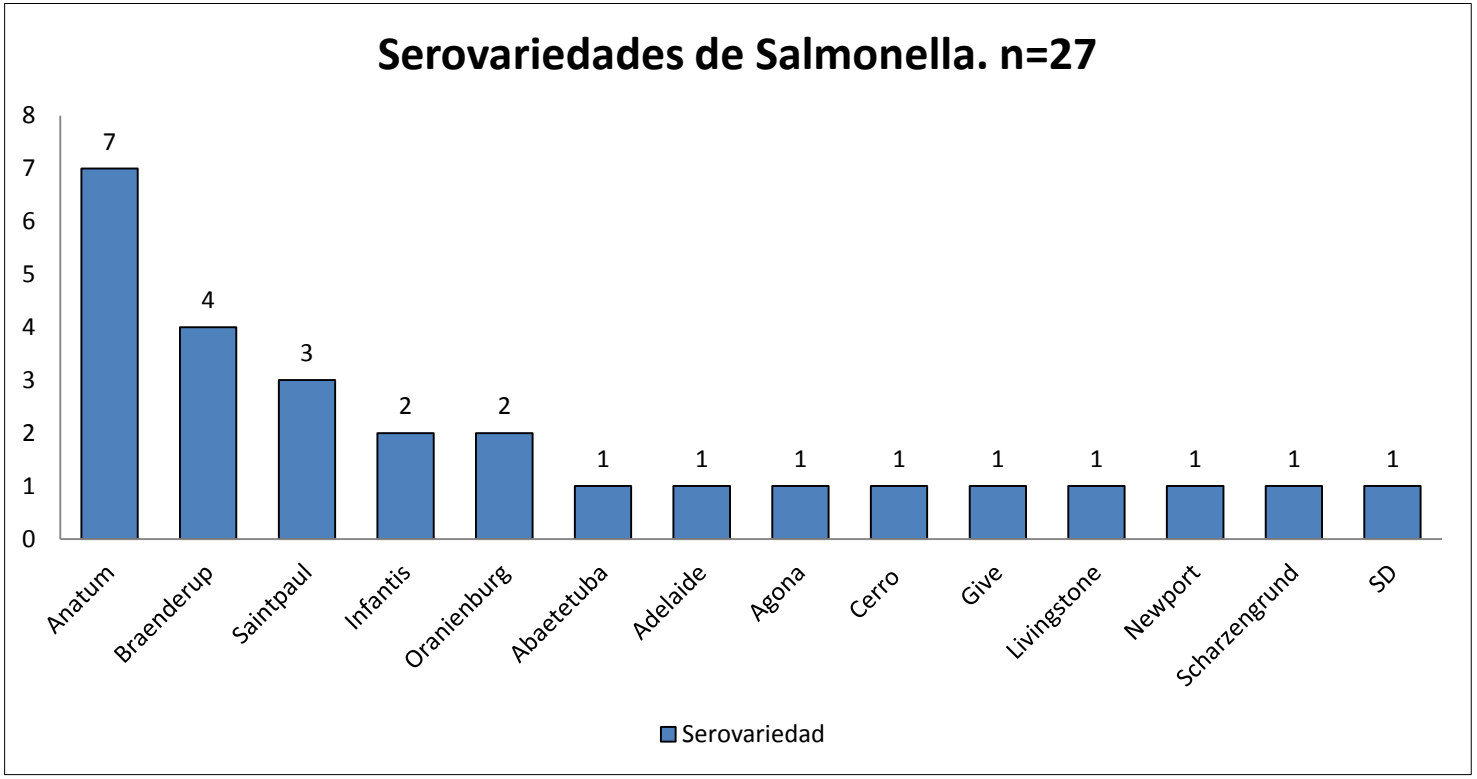
Distribución de Salmonella y STEC de acuerdo al tipo de muestra

Muestra	Salmonella		Total	STEC		Total
	1era Fase	2da. Fase		1era Fase	2da. Fase	
A-Manos manipulador	1	1	2	21	12	33
B-Molino picador	7	4	11	29	19	48
C-Cuchillo	3	3	6	23	7	30
D-Mesada	7	2	9	21	13	34
E-Carne molida	7	5	12	28	20	48
Total	**25**	**15**	**40**	**122**	**71**	**193**

Tabla 1: Numero de Salmonella/ STEC PCR-RT - positivos según muestras.
Fuente: Elaboración Propia.

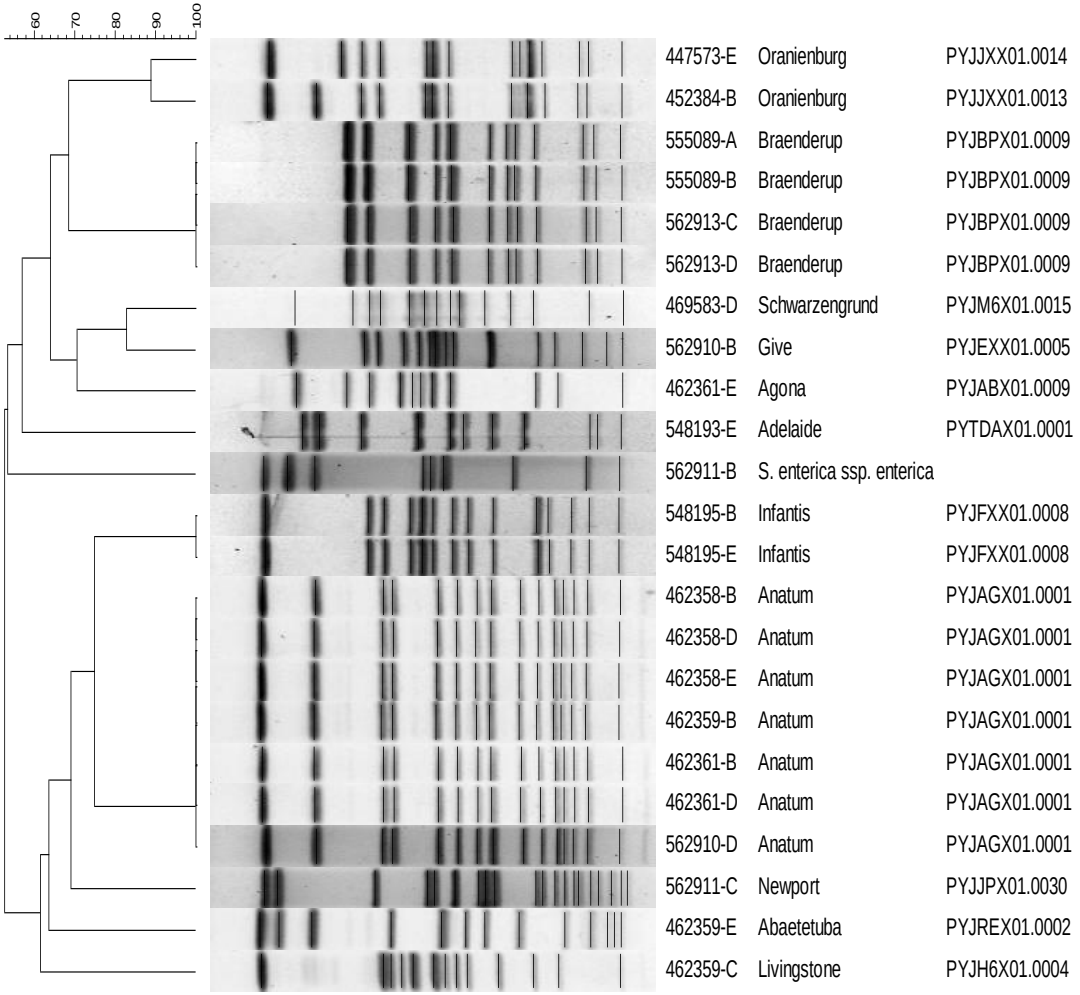
Aislamiento y caracterización de STEC y *Salmonella spp*

CARACTERIZACIÓN DE *SALMONELLA SPP*

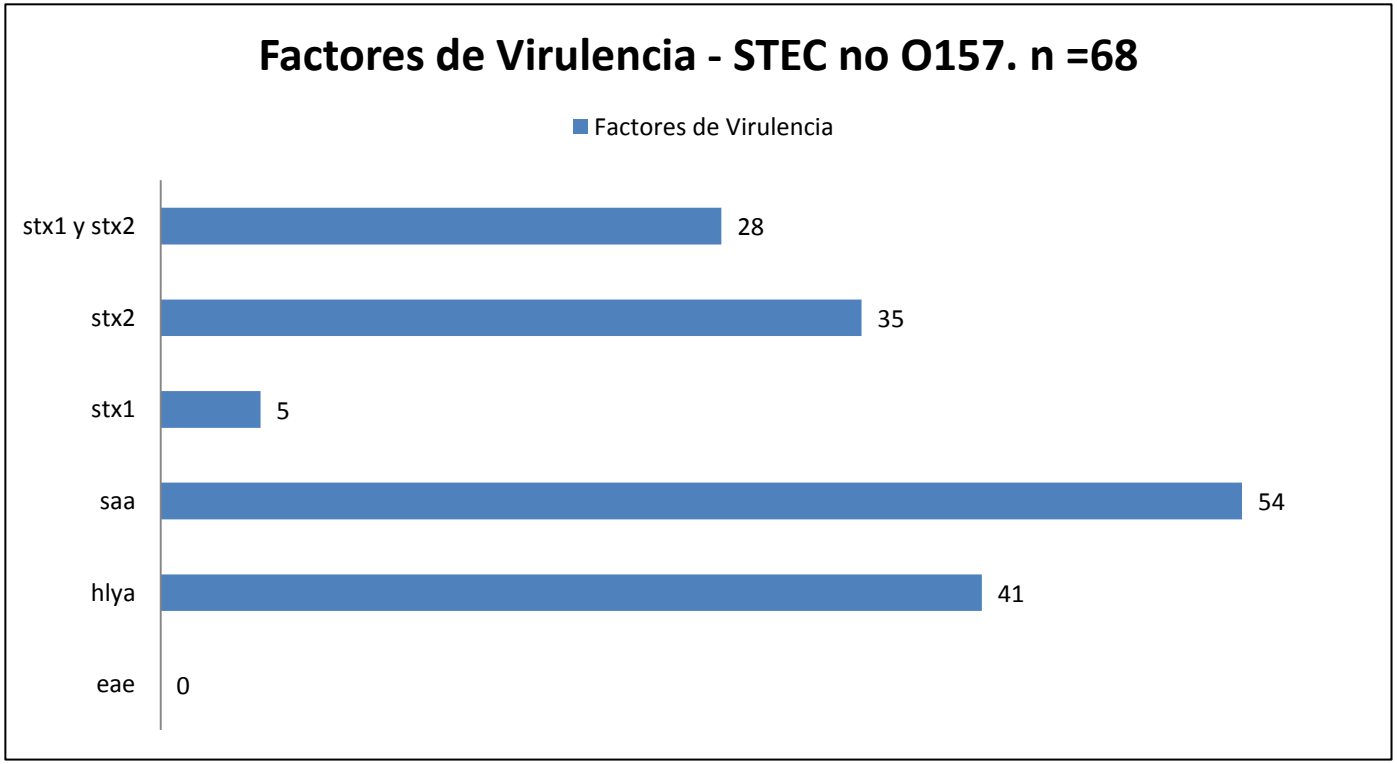


Un total de 27 cepas de Salmonella fueron recuperadas de los medios específicos 68 % (27/40)

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR – PFGE SALMONELLA

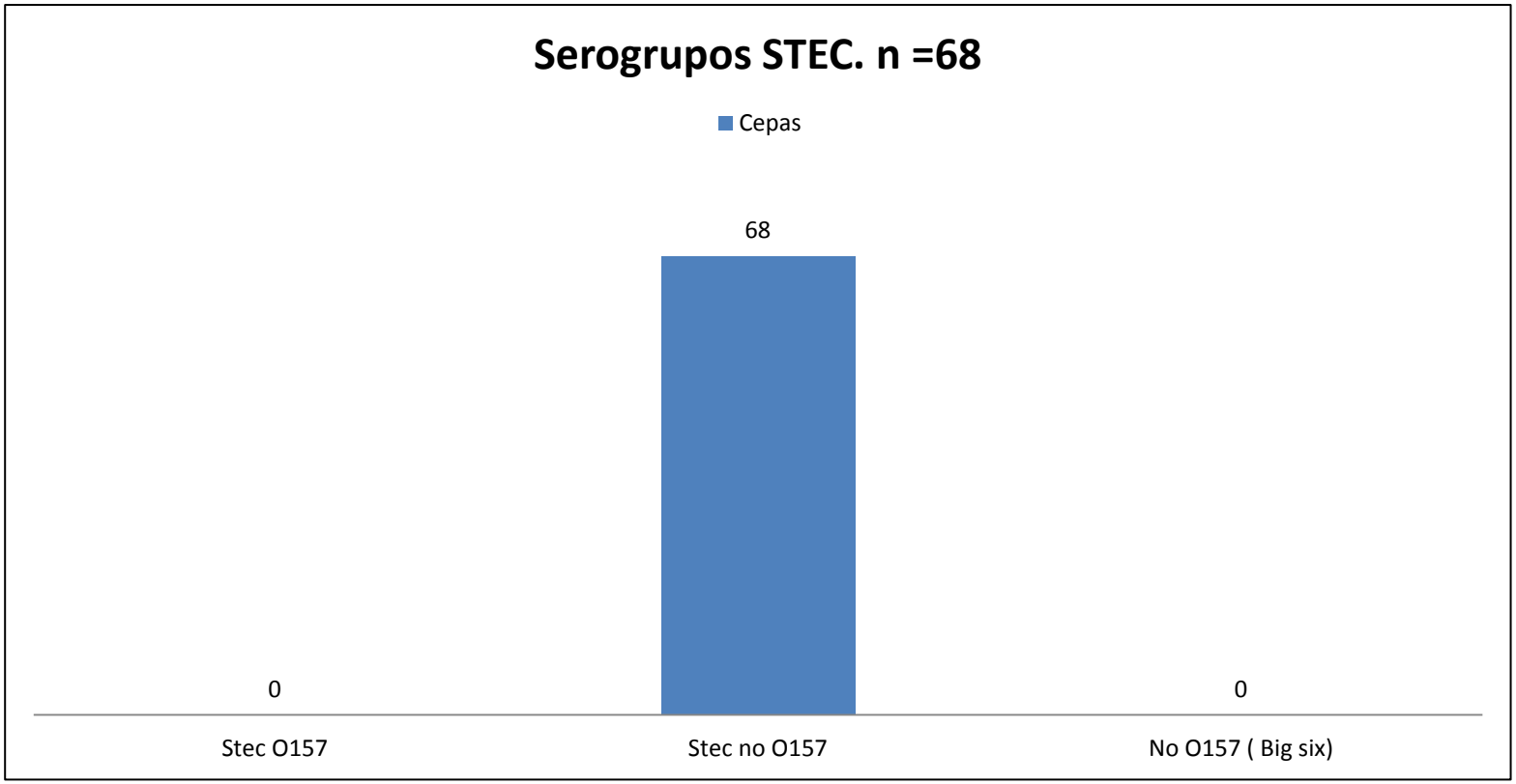


STEC CARACTERIZACIÓN



Un total de 68 (sesenta y ocho) cepas de **STEC no O157** fueron recuperadas como colonias puras (35% 68/193). En 3 (tres) muestras se recuperó más de una cepa.

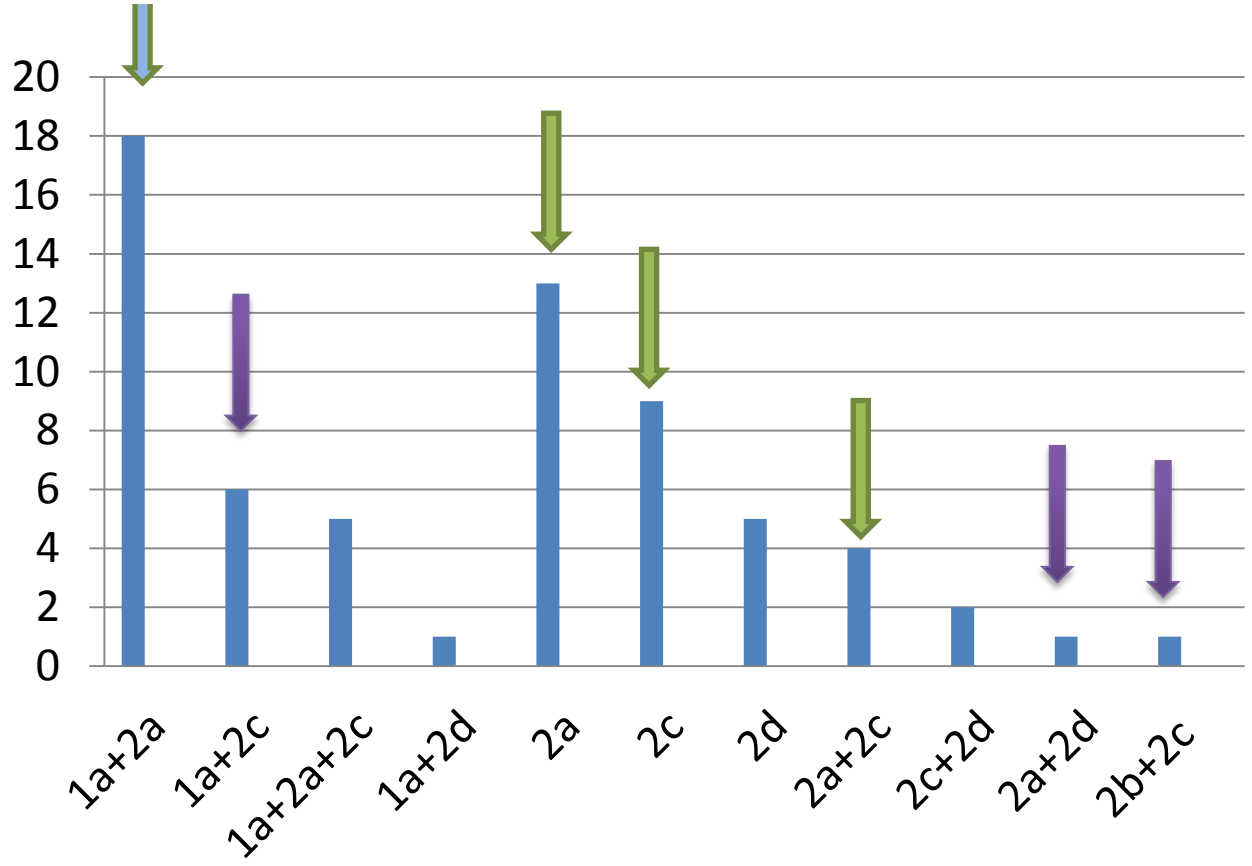
STEC CARACTERIZACIÓN



STEC CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

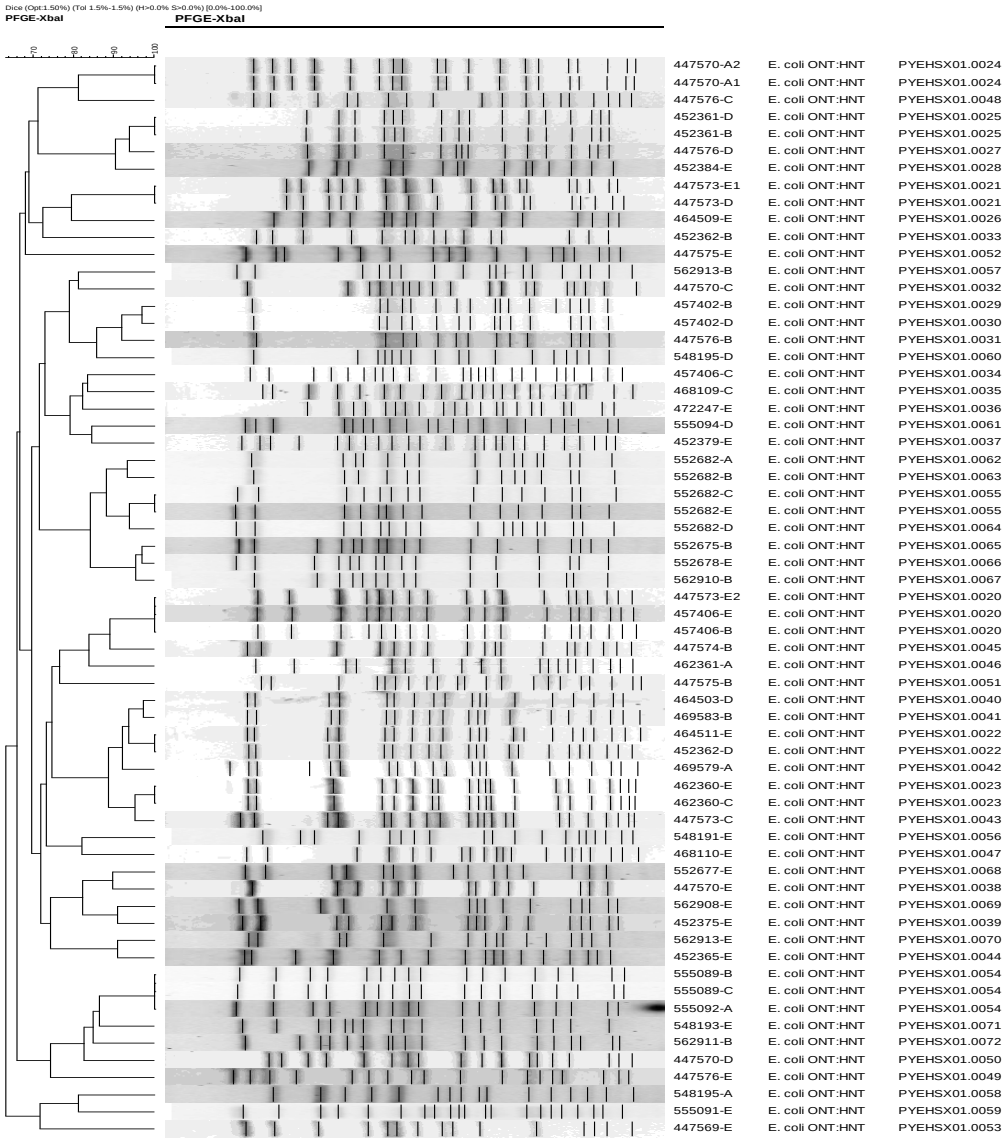
Tipo	Sub-Tipo												Cantidad
	1a	2a	2c	2d	1a +2a	1a +2c	1a +2d	2a +2c	2a+ 2d	2b +2c	2c+2d	1a+ 2a+2c	
Stx1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
Stx2		13	9	5	0	0	0	4	1	1	2	0	35
Stx1 y Stx2	0	0	0	0	18	6	1	0	0	0	0	3	28

Tabla 3 Frecuencia de Tipos, subtipos de toxina.



EU Reference Laboratory for *E. coli*
Department of Food Safety, Nutrition and Veterinary Public Health
Unit of Food Microbiology and Foodborne Diseases
Istituto Superiore di Sanità

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR-STEC



Conclusiones

Primera etapa

- Falta de aplicación de programas BPM, POES, MIP.(registros de t°, de limpieza, etc)
- Limpieza inadecuada en los equipos
- Falta de elementos de limpieza
- Falta de infraestructura edilicia.

Segunda etapa

- XXXXXX

Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos se evidencio que hubo

a. Se detecto la presencia de patógenos que potencialmente podrían causar enfermedad en el hombre, tanto Salmonella y STEC no O157
b. No se detecto STEC O157
c. Contaminación cruzada
d. Contaminación de la materia prima

Recomendaciones

- Adecuación de la Guía de Inspección
- Capacitaciones para los Departamentos con Inspectorías.
- Capacitaciones en BPM, POES, a los empleados de las carnicerías.
- Control de la calidad microbiológica de la carne molida fresca procesada
- Actualización de la Ordenanza Municipal N.º 27/02.

GRACIAS

Weiler Natalie, Orrego María Verónica,
Flavia Helena Ortiz, Álvarez Mercedes,
Dure Felicita, Pérez José, Piris Laura,
Domínguez Mirna, Colman Mirtha,
Lacarruba Laura

Gerardo Leotta, asesor del Proyecto