

UNIVERSIDAD DE CUENCA



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“DETERMINACIÓN DE *Clostridium perfringens* EN MATERIA PRIMA CÁRNICA DE LA
EMPRESA ITALIMENTOS”**

TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTORAS:

VERÓNICA CATALINA RODAS BRAVO
MARÍA GABRIELA RODRIGUEZ CORONEL

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARIANA ELIZABETH SAÁ CRUZ.

ASERORA DE TESIS:

DRA. PAULINA ESCOBAR HINOJOSA

Cuenca- Ecuador

2015



RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de investigación fue determinar la prevalencia y recuento de *Clostridium perfringens* en materia prima cárnica de la empresa ITALIMENTOS CIA. LTDA para así contribuir con los procesos de control de calidad microbiológica e implementar la técnica analítica.

Se analizaron 120 muestras, obtenidas de manera aleatoria simple, de las canales de res y de cerdo que ingresan a la empresa de distintos proveedores, 60 antes y después del proceso de desinfección con la mezcla de ácidos orgánicos, La frecuencia del muestreo fue de dos días a la semana por un periodo de tres semanas correspondientes a marzo de 2015.

Para la determinación y recuento de *Clostridium perfringens* se empleó como referencia la NTE INEN 1529.18:2013 con ligeras modificaciones, recuento en placa (según lo recomendado en el Bacteriological Analytical Manual de la FDA) en lugar de recuento en tubo y el empleo del medio selectivo Sulfito Polimixina Sulfadiazina.

Los resultados obtenidos fueron cualitativos y cuantitativos encontrándose que la prevalencia de contaminación por *Clostridium perfringens* fue especialmente elevada en carnes de cerdo (66.7%), mientras que en las canales res se determinó un porcentaje menor de prevalencia (20%) antes de la desinfección. Posterior a la desinfección se observó que los recuentos de *Clostridium perfringens* disminuyeron un 98% en las muestras analizadas comprobándose la efectividad del proceso de desinfección, también se determinó el riesgo relativo mostrando un 3.33 de probabilidad de que la carne de cerdo presente recuentos superiores de *Clostridium perfringens* después del proceso de desinfección.

Palabras claves: *Clostridium perfringens*, *Clostridium perfringens* en carnes, Recuento de *Clostridium perfringens*.



ABSTRACT

The aim of this research work was to determinate the prevalence and count of *Clostridium perfringens* in meat raw material in ITALIMENTOS CIA. LTDA company and thus to contribute with the microbiological quality control process and to implement the analitical thecnique.

A total of 120 samples, obtained using simple random way, of beef and pork carcasse entering the company from different suppliers were analyzed; 60 samples before and after the disinfection process with the mixture of organic acids. The sampling frequency was twice a week in a period of three weeks of March 2015.

For the determination and count of *Clostridium perfringens* the NTE INEN 1529.18:2013 with sligth modifications was used, plate count instead of tube count and the use of a selective agar Sulfite Polimixin Sulfadiazine (SPS), according to Bacteriological Analytical Manual (BAM) of FDA.

The results obtained were qualitative and quantitative being found that the prevalence of contamination by *Clostridium perfringens* was particularly high in pork (66.7%), while the res channels showed a lower percentage of prevalence (20%) prior to disinfection. After the disinfection *Clostridium perfringens* counts decreased by 100% in the positive controls and 98% in the samples tested so the effectiveness of organic acids was probed, showing a relative risk of 3.33 probability of pork this higher counts of *Clostridium perfringens* after the disinfection process is also determined.

Keywords: *Clostridium perfringens*, *Clostridium perfringens* in meat, Count of *Clostridium perfringens*.



Contenido

AGRADECIMIENTOS..... 15

DEDICATORIA 16

RESUMEN 2

ABSTRACT 3

INDICE DE FIGURAS..... 7

ÍNDICE DE TABLAS..... 8

ÍNDICE DE GRÁFICOS..... 9

ÍNDICE DE ANEXOS..... 10

INTRODUCCIÓN..... 18

CAPÍTULO 1 19

1 MARCO TEÓRICO..... 19

1.1 Carne 19

1.1.1 Atributos organolépticos 19

1.1.2 Composición química y aspectos nutricionales de la carne 20

1.1.3 Cambios bioquímicos de la carne..... 21

1.2 Calidad y seguridad microbiológica de la carne..... 24

1.2.1 Contaminación de la carne 25

1.2.2 Factores que influyen al crecimiento de microorganismos en la carne 27

1.2.3 Conservación de la carne..... 29

1.2.4 Criterios microbiológicos para el control de la materia prima cárnica..... 30

1.3 *Clostridium perfringens*..... 32

1.3.1 Características bioquímicas..... 32

1.3.2 Estructura antigénica y factores de virulencia:..... 32

1.3.3 Epidemiología..... 33

1.3.4 Enfermedades transmitidas por alimentos asociadas con *Clostridium perfringens* .. 34

1.3.5 Determinación de *Clostridium perfringens* en alimentos 35

1.3.6 Medios selectivos para la determinación de *Clostridium perfringens* 36

1.3.7 Medios de enriquecimiento para *Clostridium perfringens* 37

1.3.8 Pruebas confirmatorias para la determinación de *Clostridium perfringens*..... 37

CAPÍTULO 2 38

2 METODOLOGÍA..... 38

2.1 Tipo de Investigación..... 38



2.2 Población y área de estudio 38

2.3 Muestreo 38

2.4 Tamaño de la muestra..... 39

2.5 Toma de Muestra 40

 Canales de Res y Cerdo:..... 40

2.6 Recursos Materiales 42

2.7 Métodos y técnicas de análisis microbiológico..... 44

 2.7.1 Fundamento de la técnica de recuento para *Clostridium perfringens* 44

 2.7.2 Controles positivos para *Clostridium perfringens*..... 44

 2.7.3 Preparación de las muestras para el análisis microbiológico 45

2.8 Técnica de recuento de *Clostridium perfringens*..... 45

 2.8.1 Siembra..... 46

 2.8.2 Recuento de colonias 46

 2.8.3 Selección y purificación de colonias 46

 2.8.4 Movilidad y producción de Indol..... 47

 2.8.5 Resultados 47

 2.8.6 Cálculos 47

2.9 Flujograma de análisis..... 49

 49

2.10 Análisis Estadístico..... 50

CAPÍTULO 3 51

3 RESULTADOS Y DISCUSIONES..... 51

 3.1 Determinación de *Clostridium perfringens* en muestras de cortes finos de carne de cerdo y res inoculadas con la cepa de *Clostridium perfringens* (Controles positivos)..... 51

 3.2 Recuento de *Clostridium perfringens* en canales de cerdo y de res antes y después del proceso de desinfección 52

 3.3 Frecuencia de muestras cárnicas positivas a *Clostridium perfringens* antes y después del proceso de desinfección 56

 3.4 Cuantificación de *Clostridium perfringens* en muestras cárnicas antes y después del proceso de desinfección..... 59

 3.5 Efectividad del desinfectante en el control de *Clostridium perfringens*..... 60

 3.6 Comportamiento de la frecuencia de canales de cerdo y res contaminadas por semana y su intervalo de confianza al 95% de probabilidad..... 62

 3.7 Riesgo de contaminación en las muestras de estudio. 63



3.8 Frecuencia de contaminación al final de la desinfección.....	63
CONCLUSIONES.....	66
RECOMENDACIONES.....	67
GLOSARIO.....	68
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
ANEXOS	77



INDICE DE FIGURAS

Figura N°- 1 Toma de muestra canal de res. Empresa ITALIMENTOS CIA. LTDA.....	41
Figura N°- 2 Toma de muestra canal de res y cerdo. Fuente: (Ojeda & Vasquez, 2009)	41
Figura N°- 3 Canal de res, Empresa ITALIMENTOS CIA. LTDA.....	42
Figura N°- 4 Canal de cerdo, Empresa ITALIMENTOS CIA. LTDA Fuente: Autoras.....	42
Figura N°- 5 Muestra de res. Laboratorio de calidad Empresa ITALIMENTOS CIA. LTDA	45
Figura N°- 6 Homogenización. Laboratorio de calidad Empresa ITALIMENTOS CIA. LTDA...	45



ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°- 1: Composición nutricional de la carne.....	21
TABLA N°- 2: Principales componentes en la calidad de la carne	24
TABLA N°- 3: Requisitos microbiológicos para la carne, aves y sus menudencias comestibles ..	31
TABLA N°- 4: Características principales de <i>Clostridium perfringens</i>	32
TABLA N°- 5: Tipos toxigénicos de <i>Clostridium perfringens</i>	33
TABLA N°- 6: Pruebas Bioquímicas confirmatorias para <i>Clostridium perfringens</i>	37
TABLA N°- 7: Codificación para la obtención de los días a muestrear por semana. Los números resaltados se corresponden con los días seleccionados	39
TABLA N°- 8: Cronograma de trabajo para la determinación de <i>Clostridium perfringens</i>	40
TABLA N°- 9: <i>Clostridium perfringens</i> en los controles positivos (Sin adición de la mezcla de ácidos orgánicos)	51
TABLA N°- 10: <i>Clostridium perfringens</i> en los controles positivos (Con adición de la mezcla de ácidos orgánicos).....	52
TABLA N°- 11: Semana1: Recuento de <i>Clostridium perfringens</i> en canales de cerdo y de res antes y después del proceso de desinfección	53
TABLA N°- 12: Semana2: Recuento de <i>Clostridium perfringens</i> en canales de cerdo y de res antes y después del proceso de desinfección	54
TABLA N°- 13: Semana3: Recuento de <i>Clostridium perfringens</i> en canales de cerdo y de res antes y después del proceso de desinfección	55
TABLA N°- 14: Recuentos promedios de <i>Clostridium perfringens</i> según el tipo de carne y el momento de la toma de muestra	60
TABLA N°- 15: Efectividad del desinfectante en el control de <i>Clostridium perfringens</i>	60
TABLA N°- 16: Intervalos de confianza para el porcentaje de muestras contaminadas por <i>Clostridium perfringens</i> antes y después del tratamiento desinfectante	61
TABLA N°- 17: Comportamiento de la frecuencia de canales contaminadas por semana y su intervalo de confianza al 95 % de probabilidad	62
TABLA N°- 18: Riesgo de contaminación antes y después de la desinfección por comparación de las proporciones de contaminación de la carne del cerdo con la de res.....	63



ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO N°- 1: Frecuencia de contaminación por <i>Clostridium perfringens</i> en las muestras de cerdo antes y después de la desinfección.	56
GRÁFICO N°- 2: Frecuencia de contaminación por <i>Clostridium perfringens</i> en las muestras de res antes y después de la desinfección.	57
GRÁFICO N°- 3: Recuento promedio de <i>Clostridium perfringens</i> por semana y por tipo de carne antes de la desinfección	58
GRÁFICO N°- 4: Recuento promedio de <i>Clostridium perfringens</i> por semana y por tipo de carne después de la desinfección.....	59
GRÁFICO N°- 5: Porcentaje de muestras que quedan contaminadas con recuentos superiores al nivel de aceptación en ambos tipos de carne, referidos al total de muestras que llegaron afectadas a la empresa.....	64



ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 0776: 2013: Carne y productos cárnicos	72
ANEXO 2. Fragmento de la norma ISO 17604:2003 Microbiología de alimentos y animales para alimentación: Muestreo de canales para análisis microbiológico, citada en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas.	78
ANEXO 3. NTE INEN 1529.2 Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico.....	79
ANEXO 4. Composición del medio selectivo Agar SPS.	80
ANEXO 5. Medio de movilidad SIM	81
ANEXO 6. Medio selectivo caldo de tioglicolato.....	82
ANEXO 7. Activación de la cepa ATCC 13124 de <i>Clostridium perfringens</i>	84
ANEXO 8. Control positivo en carne de cerdo y res	85
ANEXO 9. Patrón Mc Farland.....	87
ANEXO 10. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 559 18:2013 Control microbiológico de los alimentos <i>Clostridium perfringens</i> . Recuento en tubos por siembra en masa.	88
ANEXO 11. Bacteriological Analytical Manual (BAM)	89
ANEXO 12. Certificado de aprobación de la Tesis “Determinación de <i>Clostridium perfringens</i> en la Empresa ITALIMENTOS CIA. LTDA“.....	94



CLÁUSULA DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, *Verónica Catalina Rodas Bravo*, autora de la tesis “DETERMINACIÓN DE *Clostridium perfringens* EN MATERIA PRIMA CÁRNICA DE LA EMPRESA ITALIMENTOS”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímico Farmacéutico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciera de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, Mayo de 2015

Verónica Catalina Rodas Bravo

C.I: 0104162110



CLÁUSULA DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, *María Gabriela Rodríguez Coronel*, autora de la tesis “DETERMINACIÓN DE *Clostridium perfringens* EN MATERIA PRIMA CÁRNICA DE LA EMPRESA ITALIMENTOS”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímico Farmacéutico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, Mayo de 2015

María Gabriela Rodríguez Coronel

C.I: 0105837710



CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Yo, *Verónica Catalina Rodas Bravo*, autora de la tesis “DETERMINACIÓN DE *Clostridium perfringens* EN MATERIA PRIMA CÁRNICA DE LA EMPRESA ITALIMENTOS”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, Mayo de 2015

Verónica Catalina Rodas Bravo

C.I: 0104162110



CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Yo, *María Gabriela Rodríguez Coronel*, autora de la tesis “DETERMINACIÓN DE *Clostridium perfringens* DE MATERIA PRIMA CÁRNICA EN LA EMPRESA ITALIMENTOS”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, Mayo de 2015

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Gabriela', with a stylized flourish extending to the right.

María Gabriela Rodríguez Coronel

C.I: 0105837710



AGRADECIMIENTOS

AGRADECEMOS:

A Dios por permitirnos culminar esta etapa de nuestras vidas con esfuerzo y dedicación.

A nuestros padres por el apoyo incondicional, durante toda nuestra formación académica y personal.

A la Dra. Mariana Saá por aportar sus conocimientos para la realización de la presente tesis.

A la Dra. Paulina Escobar por su paciencia, motivación y orientación en cada paso de este trabajo.

Al Ing. Javier Moscoso “Jefe de Aseguramiento de Calidad de ITALIMENTOS CIA LTDA” por darnos la oportunidad en la empresa para la elaboración de este trabajo de investigación.

Al Sr. Lautaro Jetón, propietario de la Empresa “ITALIMENTOS CIA LTDA”, por permitir la realización de esta tesis.



DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a Dios por ser siempre la luz de mi camino para seguir siempre con perseverancia, fortaleza y dedicación.

A mis padres con mucho amor les dedico todo mi esfuerzo y trabajo puesto en este trabajo de tesis y a mi compañera de tesis que me brindo apoyo incondicional.

María Gabriela Rodríguez Coronel



DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada principalmente a Dios pastor de mi camino quien me dio el espíritu y entereza para culminar mi objetivo.

A mis padres por todo su apoyo durante mi vida académica.

A mi compañera de tesis y amigos por siempre creer en mí.

Verónica Catalina Rodas Bravo



INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos son aquellas que se originan por la ingestión de alimentos infectados con agentes contaminantes en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor (Heymann, 2005).

Entre los agentes productores de las ETAS frecuentemente se encuentran a especies del género *Clostridium*, especialmente *Clostridium perfringens* el cual puede estar presente en ciertos alimentos como carnes crudas y alimentos preparados a base de carne, siendo patógenos para el ser humano cuando su recuento supera 1×10^8 UFC/g (CONAL, 2012).

En Latinoamérica más de la mitad de todos los brotes epidémicos de enfermedades transmitidas por los alimentos son causados por carne y productos cárnicos que son los que más se asocian con la toxicoinfección producida por *Clostridium perfringens*. En Costa Rica se informó la presencia de *Clostridium perfringens* en un 37% de las muestras de suelo, un 46% en carnes cocidas, y el 55% en carnes de canales (Rodríguez, 2002).

En la Empresa ITALIMENTOS CIA. LTDA, la materia prima cárnica que se recibe debe cumplir con los criterios microbiológicos de la NTE INEN 2346:2010, entre los que refiere control de *Clostridium* sulfito reductores; sin embargo en la actualidad, la empresa no tiene implementada una técnica analítica para la detección y recuento de la bacteria.

Considerando lo expuesto, se propuso la presente investigación orientada a determinar la presencia y el número de unidades formadoras de colonias (UFC/g) de *Clostridium perfringens* en la materia prima cárnica, así como evaluar la efectividad del tratamiento de desinfección en la misma y contribuir con la implementación de la técnica en la empresa.



CAPÍTULO 1

1 MARCO TEÓRICO

1.1 Carne

Se define como el tejido muscular estriado en fase posterior a su rigidez cadavérica (post-rigor) comestible, sano y limpio, de animales de abasto que mediante la inspección veterinaria oficial antes y después del faenamiento son declarados aptos para consumo humano. Además se considera carne el diafragma y músculos maceteros de cerdo, no así los demás subproductos de origen animal (NTE INEN 2346, 2010; Perú, 2009).

Una vez sacrificado el animal se lo transporta y maneja como canal, término que se refiere al cuerpo faenado, desangrado, eviscerado, sin genitales y en el caso de las hembras sin ubres; de acuerdo a la especie con o sin cabeza, piel, patas, diafragma y médula espinal (NTE INEN 2346, 2010).

1.1.1 Atributos organolépticos

En las características generales de la carne como materia prima hay que considerar dos puntos de vista, el consumo directo en fresco y su industrialización. En la carne destinada al consumo directo en fresco se deben observar las siguientes características:

- **Color:** La coloración roja característica de la carne en buen estado viene dada principalmente por los compuesto hemínicos presentes en ella, como son la mioglobina y hemoglobina. Se puede decir que el color de la carne también dependerá de la especie, raza, la edad y la alimentación donde varía desde un color rosáceo hasta un rojo intenso (Amerling, 2001).
- **Textura y dureza:** La textura de la carne viene dada por la cantidad de colágeno tipo I y III que se encuentra recubriendo las haces de fibras. En cuanto a la dureza de la carne, contribuyen tres tipos de proteínas; las del tejido conectivo, las de miofibrilla y las del sarcoplasma (Amerling, 2001).
- **Terneza:** La terneza es un criterio organoléptico muy importante para el consumidor, pudiendo definirse como la facilidad de morder y masticar la carne; este atributo varía en la carne por dos causas principales: el tejido conectivo (dependiendo del músculo y del animal) y la variación del estado de las miofibrillas musculares en condiciones post



mortem, puesto que el músculo del animal es tierno pero al entrar en etapa de rigor la dureza aumenta y disminuye la elasticidad (Amerling, 2001).

- **Aroma y sabor:** Estos dos aspectos son característicos de la especie de la que se trate, la carne fresca en estado crudo tiene un olor muy ligero. (Amerling, 2001)
- **Jugosidad:** Este parámetro hace referencia a la percepción de la sequedad de la carne, está relacionada con dos factores principales como el agua y los lípidos contenidos en el músculo (Amerling, 2001).

1.1.2 Composición química y aspectos nutricionales de la carne

La composición química de la carne varía con la especie del animal y su edad, esto quiere decir que mientras más joven el contenido de agua es inversamente proporcional al contenido de grasa, esta relación se invierte a medida que la edad aumenta (Warriss, 2003c).

Las propiedades y calidad de la carne se estudian en las proteínas, grasas, vitaminas y minerales, siendo las más importantes las proteínas del músculo en este grupo se encuentran las proteínas contráctiles (miosina y actina) que juegan un papel muy importante en la transformación de músculo a carne. Otro grupo de proteínas son las del estroma que en su estado nativo resisten a la acción de los jugos digestivos mientras que en su forma desnaturalizada son más digeribles y las proteínas sarcoplásmicas proporcionan una coloración roja viva a la carne y nutricionalmente es una fuente importante de hierro (Warriss, 2003c).

La grasa constituye parte esencial de las membranas celulares una gran fuente energética mayor a la proporcionada por los carbohidratos. Su composición lipídica se divide en lípidos del tejido muscular (contiene mayor cantidad de fosfolípidos y ácidos grasos más insaturados) y lípidos del tejido adiposo (Carvajal, 2001).

Los minerales presentes en la carne como el calcio, hierro, fósforo, zinc, se asocian a la porción magra de la misma. El hierro es indispensable para la síntesis de hemoglobina y ciertas enzimas, manteniendo así el buen estado físico. Minerales como el zinc y magnesio son cofactores de enzimas utilizados en la síntesis de proteínas. Por otro lado, el fósforo tiene un importante rol en el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y grasas. Ayuda al balance ácido-base en sangre y otros tejidos del cuerpo (Carvajal, 2001).

Tabla N°- 1: Composición nutricional de la carne.

Composición	Carne Vacuna	Carne de Cerdo
Agua (g)	75,9	69,2
Kcalorías	105	198
Proteínas (g)	21,3	14,4
Grasas totales (g)	1,3	15,1
Hierro (mg)	3,40	1,3
Zinc (mg)	4,32	1,74
Fósforo (mg)	208	238
Calcio (mg)	16	12
Vit. B1 (mg)	0,03	0,90
Vit. B2 (mg)	0,13	0,16
Vit. A (ug)	0,0	2,0
Vit. C (mg)	0,00	0,60
Niacina (mg)	6,82	5,10

Fuente: Tablas peruanas de composición de alimentos (Perú, 2009)

1.1.3 Cambios bioquímicos de la carne

La carne de un animal recién sacrificado debe ser de un color blanquecino, a consecuencia de pasar por un estado de rigidez cadavérica ya que la musculatura del animal no cesará bruscamente todas sus funciones vitales, este estado de rigidez empieza a notarse una hora después de su sacrificio, pudiendo durar horas hasta días dependiendo de la especie, aquí ocurrirá una serie de cambios físico-químicos lo que hace posible la conversión de músculo a carne, en donde influirán todos los procesos previos al sacrificio del animal, así como en su calidad, es por estos motivos que el animal antes de su sacrificio debe pasar 12 horas en ayuno pero sin estar hambriento, deberá estar también en reposo y con acceso a mucha agua (Astiz, 1992).



Antes del sacrificio se procederá a insensibilizar al animal y posterior a esto a su desangrado completo, una vez concluido la canal, se lava y orea antes de proceder a refrigerar (1- 4°C). Después la canal se vuelve rígida y la grasa más consistente y estos efectos vienen acompañados de cambios bioquímicos en el músculo descritos a continuación: (Warriss, 2003b)

1.1.3.1 Acidificación y pH

El transporte de oxígeno cesa tras la muerte del animal así que el metabolismo se torna anaerobio y el ATP se genera a través de la lisis del glucógeno y posterior glicólisis, a partir del metabolismo anaerobio del glucógeno se genera ácido láctico esto hace que las cargas positivas del ácido cancelen a las negativas del músculo, por lo que el valor del pH en un lapso de tres horas será aproximadamente de 6,5 y de 12h a 18h alcanza su nivel más bajo de 5,4 a 5,8, debido a esto el músculo se acidifica (Astiz, 1992), (Swatland, 1995).

Al descender el pH las proteínas musculares se desnaturalizan y pierden la capacidad de retener agua (CRA) conduciendo a la exudación de fluidos de las fibras musculares, también contribuye a la dispersión de luz de los elementos contráctiles de la fibra muscular produciendo un cambio en la coloración de la carne de oscura-translúcida a opaca-pálida. El tiempo que demora la acidificación varía con la especie (ganado porcino de 4-5h y vacuno 15-36h) (Warriss, 2003b).

1.1.3.2 Capacidad de Retención de Agua (CRA)

Es la capacidad de la carne para retener agua libre durante las fuerzas externas (corte, trituración, prensado). Aproximadamente las 3/4 partes de la carne son agua, la misma que se aloja en su mayoría en los espacios de los filamentos finos y gruesos de las miofibrillas (Warriss, 2003a).

Su captación o eliminación va a depender de la interacción de la actina y miosina, así en el rigor mortis se contrae la red proteica y el agua se perderá por las fibras musculares al espacio extracelular. Esta agua extracelular contribuye al exudado, cuando se secciona el músculo en post-mortis, las pérdidas de agua libre por exudado causan un descenso en su rendimiento, resultando antiestético si queda recogida en la bandeja o envase en el que está dispuesta la carne (Warriss, 2003a).



1.1.3.3 Rigor mortis

El comienzo del rigor está determinado solamente por la disponibilidad de ATP, el cual sirve para mantener el músculo en estado de relajación. Cuando el músculo se encuentra en reposo los filamentos de actina y miosina se deslizan, penetrando los unos en los otros ayudado por el complejo ATP-Mg que actúa como lubricante (Warriss, 2003b).

Al hidrolizarse el ATP a ADP se produce una contracción, en este momento los niveles de creatín fosfato caen para regenerar el ATP a partir del ADP el mismo que termina por fallar, así el músculo se contrae ya que el complejo ATP-Mg se degrada y los filamentos de actina y miosina forman el complejo actiomiosina, perdiendo el músculo su extensibilidad y cada fibra muscular entra en rigor al agotarse el ATP (Restrepo, 2001b).

1.1.3.4 Resolución del rigor y acondicionamiento

Es el proceso natural de ablandamiento de los músculos cuando la carne es almacenada o madurada post rigor, debido a que las miofibrillas se vuelven fácilmente fragmentables a consecuencia de los cambios en los componentes del tejido conectivo (ruptura de los enlaces cruzados del colágeno (Warriss, 2003b).

1.1.3.5 Maduración

Proceso mediante el cual se da por terminada la rigidez cadavérica, haciéndose la carne más tierna y aromática. En este proceso se suscitan muchos cambios químicos y bioquímicos como la disociación de la actomiosina, el rompimiento del sarcómero por desintegración de la línea Z, proteólisis, aumento del pH y de la capacidad de retención de humedad y aumento de la presión osmótica (Larrañaga & Carballo, 1999) (Astiz, 1992).

En la maduración se produce la separación de los filamentos de actina de la línea Z debido a la acción de enzimas catepsínicas o por modificaciones iónicas. La proteólisis ocurre a nivel de las proteínas sarcoplasmáticas en donde se liberan iones Ca^{2+} y captan iones K^+ y Na^+ , así se incrementará la capacidad de retención de humedad, cambiando a la vez las cargas iónicas produciéndose aumento de pH de 5.3 hasta 6. Cuando se da un descenso de pH se liberan estas enzimas y empiezan a degradar la estructura proteica del músculo (Larrañaga & Carballo, 1999) (Astiz, 1992).



En el proceso de maduración también ocurre la oxidación de lípidos, originando olores desagradables, formación de nucleótidos, amoníaco, sulfuro de hidrógeno, acetaldehído y acetona que pueden ser desfavorables para el sabor y el aroma de la carne; así como la degradación del ATP con formación de hipoxantina que causa olores y sabores desagradables (Warriss, 2003b).

1.2 Calidad y seguridad microbiológica de la carne

En la carne para la industrialización se distinguen dos aspectos; el primero desde el punto de vista funcional, en donde la carne debe cumplir con los atributos deseables (Tabla 2). Y un segundo punto de vista conocida como calidad de conformación, en donde el producto debe cumplir exactamente con las especificaciones del consumidor en cuanto a palatabilidad (textura y terneza, jugosidad y flavor), (Warriss, 2003a).

Tabla N°- 2: Principales componentes en la calidad de la carne

Rendimiento y composición bruta	<ul style="list-style-type: none">● Cantidad de producto comercializable● Cociente grasa: magro
Aspectos y características tecnológicas	<ul style="list-style-type: none">● Tamaño y forma del músculo● Textura y color de la grasa● Cantidad de grasa intramuscular● Color y CRA del magro
Palatabilidad	<ul style="list-style-type: none">● Textura y terneza● Jugosidad● Flavor (sabor más aroma)
Salubridad	<ul style="list-style-type: none">● Calidad nutricional● Seguridad química● Seguridad microbiológica
Calidad ética	<ul style="list-style-type: none">● Cría aceptable de los animales

Fuente: Warriss, 1996

A su vez la carne debe ser higiénicamente saludable, es decir, segura en cuanto a su consumo (exenta de parásitos que puedan transmitirse a humanos, microorganismos patógenos, sustancias químicas nocivas, niveles aceptables de medicación veterinaria del animal, etc.) y aportar con una dieta rica en vitaminas, minerales y proteínas de alto valor y posiblemente ácidos grasos esenciales. De igual manera que para la carne vacuna, la



calidad de la carne de cerdo está determinada también por su contenido de grasa intramuscular ya que su incremento producirá un aumento en la ternura, flavor y aceptabilidad. (Warriss, 2003a), (B. M. García, 2003).

1.2.1 Contaminación de la carne

La contaminación que se produce en las carne es por vía endógena (infección del animal vivo) y exógena (por invasión post mortem), por esto es necesario que todas las manipulaciones de la carne posteriores al sacrificio se realicen con estrictas normas de higiene. (B. M. García, 2003).

Los contaminantes comunes de las canales son los gérmenes Gram-negativos y micrococos, incluidas *Pseudomonas spp.*, *Moraxella spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Flavobacterium spp.* Adicionalmente pueden existir bacterias productoras de ácido láctico, hongos, levaduras. (Restrepo, 2001d)

1.2.1.1 Contaminación inicial (ante mortem)

Los animales vivos albergan microorganismos en la piel, pelo y cavidades de los órganos que se conectan al exterior a través de los orificios naturales como cavidades nasofaríngeas y partes externas del aparato urogenital; estos gérmenes son provenientes del suelo, aire y ambiente (M. C. Burgeois & Mescle., 1994).

Los animales sanos poseen pocos microorganismos pero existe la posibilidad que animales aparentemente sanos alberguen en su intestino, hígado, riñones, nódulos linfáticos grandes cantidades de gérmenes patógenos que pueden atravesar al músculo por el sistema circulatorio, traumatismos o condiciones inadecuadas de sacrificio. Los tejidos y cavidades que no están en contacto directo con el exterior son estériles (Larrañaga & Carballo, 1999).

Sin embargo en los procesos de matanza y preparación de canales se produce una alteración de la situación microbiológica, debido a que en operaciones del sacrificio, sangrado, abertura de la cavidad torácica y abdominal queda expuesta a la contaminación interna y externa de la canal (Pascual & Calderón, 2000).

Es por esto que los microorganismos que contaminan la carne tienen diversos orígenes, pueden estar presentes en el propio músculo in vivo o haber penetrado durante la muerte del animal, también por la manipulación que sufren las canales y productos



cárnicos durante el despiezado, conservación y distribución (Larrañaga & Carballo, 1999).

Después del sacrificio es ideal colocar las canales en cámaras de refrigeración a temperaturas inferiores de 10°C, cercanas a 0°C con el objetivo no solo de enfriar la superficie sino también los tejidos más profundos para inhibir el crecimiento de bacterias mesófilas (Larrañaga & Carballo, 1999).

1.2.1.2 Contaminación agónica (post mortem)

Tiene lugar durante el sacrificio y a lo largo de la preparación de las canales, en donde la mayoría de gérmenes son aportados por el ambiente, materias fecales, piel, manipuladores. En este tipo de contaminación hay dos variantes:

- **Contaminación profunda:** Esta contaminación es poco importante en animales sanos sacrificados en buenas condiciones, se estima 1 germen por cada 10 gramos o en 100 gramos. Después de varias horas de la muerte del animal existe una contaminación debido a la pared intestinal debilitada que permite el paso de las bacterias, el stress al sacrificio favorece esta transmisión es por esto que la evisceración tardía es peligrosa. El escaldado utilizado para el pelado de los cerdos permite el paso de las bacterias con el agua polucionada al sistema circulatorio y respiratorio (M. C. Burgeois & Mescle., 1994), (Antich & Roberto, 2006).
- **Contaminación superficial:** Este tipo de contaminación es más importante ya que aporta alrededor de 10^3 a 10^4 gérmenes cm^2 , procedentes del mismo animal (pelo), del matadero (aire, suelo), de las salas de despiece (mesas, utensilios, bandas transportadoras) cámaras de almacenamiento (suelos, muros); es por eso que radica la importancia en las reglas de higiene en la preparación de canales (M. C. Burgeois & Mescle., 1994).

1.2.1.3 Vías de contaminación de la carne

Las vías de contaminación se dividen según el origen de la misma (Pascual & Calderón, 2000)

- **En el animal:** La contaminación de la carne se puede originar por el pelo y la piel que es fuente microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomona*, levaduras y mohos entre estos tenemos las especies de los géneros



Penicillium, *Mucor*, *Rhodotorula*, *Rhizopus*; en el caso del contenido intestinal puede infectarse con *Escherichia coli*, *Salmonela*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolytica*, *Enterobacterias* (Pascual & Calderón, 2000).

- **Matadero:** Las condiciones del matadero pueden afectar a la carne si existe condiciones asépticas de los mismos, el suelo puede ser fuente del género *Clostridium*; así como la mala higiene de los operarios o heridas que presenten los mismos siendo una fuente para *Staphylococcus aureus*. Los insectos como roedores son grandes portadores de microorganismos patógenos por lo que es de vital importancia tener un plan de control de plagas y roedores (Larrañaga & Carballo, 1999), (B. M. García, 2006).
- **Otras fuentes:** La mala conservación, almacenamiento y transporte de la carne puede ser origen de una contaminación con microorganismos de los géneros *Acinetobacter*, *Pseudomona*, y *lactobacillus*, así también como céstodos y protozoarios (Pascual & Calderón, 2000).

1.2.2 Factores que influyen al crecimiento de microorganismos en la carne

1.2.2.1 Actividad de agua (Aw)

Mide la disponibilidad del agua del medio en el que se encuentran los microorganismos. La carne posee una Aw de 0,98- 0,99 siendo este valor favorable para la multiplicación bacteriana pero este valor no es el mismo en la superficie que en las zonas más profundas de la carne teniendo en este lugar cifras más elevadas, es por esto que al ocurrir variaciones en la actividad acuosa de la superficie relacionada con la humedad relativa se obtendrá variaciones sobre el crecimiento microbiano (M. C. Burgeois & Mescle., 1994), (Amerling, 2001).

De esto se deduce que una carne almacenada en un ambiente con humedad relativa alta se conservara menos tiempo que al hacerlo en un ambiente seco. Sin embargo la asociación de un ambiente seco más el frío producirá una buena inhibición microbiana pero a la vez traerá consigo pérdidas de masa y por ende pérdidas económicas. En la industria se tomará la decisión de escoger una humedad que provoque una Aw en la carne que no produzca tal daño y a la vez de un buen aspecto a la carne con calidad higiénica satisfactoria (M. C. Burgeois & Mescle., 1994), (Amerling, 2001).



1.2.2.2 Potencial óxido reducción (Eh)

Al instante de la muerte del animal, el músculo todavía posee en profundidad reservas de oxígeno, lo que hace que el Eh sea positivo y elevado (250mV) y esto beneficiara al crecimiento de microorganismos aerobios; enseguida las reservas de oxígeno se terminan por falta de renovación por la sangre, en donde Eh profundo disminuye rápidamente, se hace negativo y en 4-6 horas alcanza de -200mV, con estas condiciones reductoras que se dan en la profundidad la carne es propicia para el desarrollo de microorganismos anaerobios propios de la putrefacción (M. C. Burgeois & Mescle., 1994), (Restrepo, 2001d).

1.2.2.3 pH

Los microorganismos son susceptibles a las variaciones de pH, es por esto que a una descenso de pH se inhibirá el crecimiento microbiano y los organismos más afectados serán las bacterias, luego las levaduras, finalmente los mohos. (M. C. Burgeois & Mescle., 1994), (Amerling, 2001).

Según lo descrito significa que las carnes con pH igual o superior a 6 estará más expuesta a las acciones microbianas, principalmente la putrefacción, que una carne normal, es por ello que es de importancia que la acidificación del músculo transcurra correctamente (M. C. Burgeois & Mescle., 1994).

1.2.2.4 Temperatura:

El músculo inmediatamente después del sacrificio posee todavía una temperatura alta de 37°C en relación a la temperatura normal del animal vivo que es de 39°C; la cual es ideal para el desarrollo de bacterias mesófilas, sin embargo es posible hallarlas a 10°C (M. C. Burgeois & Mescle., 1994).

Una vez obtenidas las canales y los diferentes cortes de carne en procesos posteriores, se sigue con la cadena de frío, en donde es común encontrar microorganismos psicrófilos; entre estos los géneros de microorganismos como *Pseudomonas*, *Achromobacter* que son los frecuentemente encontrados en carnes frescas sometidas a temperaturas de refrigeración, mientras más baja sea la temperatura más lentamente se multiplican los microorganismos (M. C. Burgeois & Mescle., 1994).



Entre 3°C y 10°C se paraliza la toxicogénesis de *Clostridium botulinum* y desaparece todo riesgo relacionado con el crecimiento y elaboración de toxinas de los microorganismos, por otra parte a 0°C es una temperatura recomendada para que el crecimiento microbiano sea muy limitado, y a -18°C se detiene por completo la multiplicación microbiana (M. C. Burgeois & Mescle., 1994).

1.2.3 Conservación de la carne

La calidad de la carne se ve afectada por cambios físicos, químicos y microbiológicos, por ello es indispensable conservarla en buenas condiciones, ya sea para usarla como producto fresco o como materia prima para la elaboración de otros productos (Amerling, 2001).

El sacrificio y exanguinación del animal constituyen una fuente de contaminación de microorganismos del tracto gastrointestinal a todo el cuerpo por ello la práctica de ciertos procedimientos como lo son la rápida evisceración, uso de implementos y utensilios limpios, correctas y eficientes operaciones de faenamiento y aplicaciones de ácido láctico superficial a las canales, pueden ayudar considerablemente a la disminución de la carga bacteriana inicial pero no la elimina totalmente (Restrepo, 2001a).

1.2.3.1 Refrigeración y congelación

La primera fase del proceso de refrigeración comienza con la obtención de las canales, que en ese momento su temperatura es de 38°C y la del ambiente puede hallarse en 22°C donde comienzan ya parte de los procesos bioquímicos que se asocian a su muerte, esta temperatura tiene poca capacidad de enfriamiento, es por eso que se le conoce como pre-refrigeración u “oreo” (Restrepo, 2001a).

La carne se conserva a temperaturas de refrigeración entre 0°C a 4°C incluso se desciende la temperatura a valores cercanos a -1.5°C

Las canales de cerdo son refrigeradas y astilladas (sin cabeza y sin espinazo), de esta manera se facilita el flujo de aire a su alrededor con el fin de evitar zonas muertas y el proceso sea más eficiente (Restrepo Molina Diego Alonso, 2001).

1.2.3.2 Ácidos Orgánicos

Son sustancias con acción bacteriostática que tienen la finalidad de reducir los niveles de contaminación microbiana superficial. Una de estas sustancias es el ácido láctico y sus sales de sodio y potasio que poseen un perfil aromático suave y actúan como



bacteriostáticos interviniendo en el metabolismo de la bacteria (acidificación intercelular, interferencia en la transferencia de protones a través de la membrana celular), también reduce la actividad del agua y tiene un espectro de acción muy amplio, siendo capaz de inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, de la flora alterante y también de patógenos (Ojeda & Vasquez, 2009).

Esta acción antimicrobiana inhibe el crecimiento por extensos períodos de tiempo aumentando la conservación y la seguridad intrínseca del producto. Desde el punto de vista sensorial, el nivel máximo de utilización se situaría entre 0,10 y 0,12% (Jerez, 2005).

1.2.3.3 Nitritos

El nitrito de sodio a niveles de 125 hasta 250ppm, en un medio ligeramente ácido como el que proporciona la carne, y en solución, se ioniza, dando origen al ión nitrito, muy reactivo, que puede actuar como agente oxidante o como reductor. El nitrito no actúa sobre la carne como tal, sino que la principal responsable de los efectos producidos es la molécula de óxido nitroso (Freixanet, 2013).

Desde el punto de vista de su efecto conservante, los mecanismos de acción del nitrito no están muy claros, si bien está demostrado su efecto bacteriostático sobre enterobacterias, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*, siendo especialmente letal para el *Clostridium botulinum*. Al ser este microorganismo muy resistente al tratamiento térmico, la adición de nitrito se convierte prácticamente en el único medio para evitar la transmisión del botulismo a través de productos cárnicos. (Restrepo, 2001c)

1.2.4 Criterios microbiológicos para el control de la materia prima cárnica

Los criterios microbiológicos en un alimento son de vital importancia puesto que sirven para indicar la aceptabilidad de un alimento o de un proceso basada en la ausencia o presencia, una cantidad de microorganismos, y/o cantidad de sus toxinas/metabolitos, por unidad de masa, volumen, superficie o lote (NTE INEN 2346, 2010).

Los criterios microbiológicos se aplican también para averiguar si se cumplen los reglamentos dictados para los alimentos en cuanto a higiene e inocuidad microbiológica; de igual manera se podrá verificar el estado microbiológico de materias primas como las



carnes o productos terminados y examinar la eficacia de las buenas prácticas de higiene y manufactura (NTE INEN 2346, 2010).

Es por esto que toda fábrica de alimentos deberá cumplir con todos los requisitos microbiológicos establecidos por las normativas. Los microorganismos sulfito reductores son gérmenes que pueden estar presentes en carnes crudas mal tratadas higiénicamente, los mismos que son causantes de toxiinfecciones alimentarias como *Clostridium perfringens* causante de procesos infecciosos graves como la enteritis necrosante o enfermedad de Pig-bel (CONAL, 2012).

La carne cruda debe cumplir con los requisitos microbiológicos indicados en la siguiente tabla 3.

Tabla N°- 3: Requisitos microbiológicos para la carne, aves y sus menudencias comestibles

	N	C	m	M	Método de ensayo
Aerobios mesófilos UFC/g	5	3	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	NTE INEN 1 529-5
<i>Escherichia coli</i> UFC/g	5	2	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	NTE INEN 1 529-8
<i>Staphilococcus aureus</i> UFC/g	5	1	$1,0 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	NTE INEN 1 529-14
<i>Clostridium sulfito reductores</i> UFC/g	5	1	$3,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$	NTE INEN 1 529-18
<i>Salmonella</i> / 25 g	5	----- -	ausencia	-----	NTE INEN 1 529-15

Fuente: NTE INEN 2 346:2010

Dónde:

- n = número de unidades de la muestra
- c = número de unidades defectuosas que se acepta
- m = nivel de aceptación
- M = nivel de rechazo



1.3 *Clostridium perfringens*

Es un bacilo esporulado Gram positivo bastante grueso, recto de extremos cuadrados, de 0.6 a 2.4 μ de ancho y de 1.3 a 1.9 μ de largo, presentándose solos o en parejas, es completamente inmóvil debido a que no presenta cilios. Los esporos muy raros de ver in vitro, son grandes, ovales, centrales o sub-terminales, deformantes. Este género de *Clostridium* posee una cápsula compuesta en gran parte por polisacáridos, distintos según las cepas. En cultivo sus colonias son negras con halo de bordes regulares. Su temperatura óptima de crecimiento es de 43°C a 47°C máximo 50°C, un pH de 7.5 y Aw de 0.9 (M. C. Burgeois & Mescle., 1994).

1.3.1 Características bioquímicas

Las principales características de *Clostridium perfringens* se presentan en la siguiente tabla:

Tabla N°- 4: Características principales de *Clostridium perfringens*

Movilidad	-
Indol	-
Producción de lecitinasa	+
Producción de lipasa	-
Producción de gelatinasa	+
Reducción de nitratos	±
Ureasa	±
Producción de ácido a partir de :	
● Glucosa	+
● Lactosa	+
● Maltosa	+
● Sacarosa	+
● Salicina	-
Reducción de sulfitos	+
Hemolisinas	+

Fuente: (C. M. Burgeois & Mescle, 1994)

1.3.2 Estructura antigénica y factores de virulencia:

Clostridium perfringens posee una cápsula de polisacáridos que tiene acción antifagocitaria, un antígeno somático el cual es inmunogénico; así como la enzima Neuraminidasa (No letal) capaz de hidrolizar las glicoproteínas séricas. Este género de *Clostridium* puede elaborar una gran variedad de toxinas (11 histotoxinas y 1 enterotoxina) y, dependiendo de la producción de las cuatro toxinas principales, la especie se divide en cinco, alfa es la más importante (Miranda & Rojo), (CONAL, 2012).



Tabla N°- 5: Tipos toxigénicos de *Clostridium perfringens*

	alfa	beta	epsilon	iota
<i>C. perfringens</i> tipo A	+	-	-	-
<i>C. perfringens</i> tipo B	+	+	+	-
<i>C. perfringens</i> tipo C	+	+	-	-
<i>C. perfringens</i> tipo D	+	-	+	-
<i>C. perfringens</i> tipo E	+	-	-	+

Fuente: (Miranda & Rojo)

La principal toxina de *Clostridium perfringens* es la α -Toxina (lecitinasa) que juega un papel primordial en la enteritis necrosante; degrada la lecitina en fosforilcolina y un diglicérido; es activada por calcio y magnesio. In vivo actúa sobre complejos lipoproteicos que contienen lecitina en la membrana celular y probablemente sobre la membrana mitocondrial; produce además alteración de las membranas de eritrocitos, plaquetas, leucocitos y células endoteliales ocasionando lisis de estas células; aumenta la permeabilidad vascular con hemólisis masiva y hemorragia, así como destrucción tisular y edema observados durante la enfermedad (Miranda & Rojo) (Villagra, 2011), (Adams & Moss, 2008).

Las enterotoxinas (citotoxinas A y B) son elaboradas por las cepas tipo A. En los enterocitos, la enterotoxina se fija a una proteína, esta unión es muy importante para que la toxina empiece su actividad biológica, interfiriendo en el transporte de agua, sodio, cloro y en la disminución de la absorción de la glucosa a nivel intestinal, además estimulan la secreción de proteínas hacia la luz intestinal (Villagra, 2011), (C. M. Burgeois & Mesclé, 1994).

1.3.3 Epidemiología

Tiene distribución universal; el reservorio de *Clostridium perfringens* lo constituye el suelo, el tracto gastrointestinal del hombre y de los animales bovinos, porcinos infectados, manos de manipuladores contaminados; los brotes ocurren durante todo el año. Este microorganismo y sus esporas están presentes siempre en aguas residuales; sin embargo no prolifera en medios acuáticos (Heymann, 2005).



Su incidencia es elevada siendo la primera causa de toxiinfección en Francia y la tercera en España (Heymann, 2005).

La mayoría de brotes son asociados a comidas de restaurantes e instituciones, debido que en estos lugares se prepara grandes cantidades de comida, siendo infrecuentes los brotes en el hogar. *Clostridium perfringens* ha sido aislado de una gran variedad de alimentos, predominando en carnes crudas de mamíferos, los alimentos salsas cocinadas a base de carne y no refrigeradas que se conservan a temperatura ambiente. Las esporas pueden sobrevivir a la cocción, luego germinar y multiplicarse durante etapas de enfriamiento lento o almacenamiento a temperaturas de 20°C. Su amplia difusión en carnes llevo a sugerir que las estirpes de *Clostridium perfringens* productoras de toxiinfecciones alimentarias se encuentran en todas las canales cárnicas comerciales (Heymann, 2005).

1.3.4 Enfermedades transmitidas por alimentos asociadas con *Clostridium perfringens*

1.3.4.1 Toxiinfección alimentaria

Clostridium perfringens es el agente etiológico causante de muchas enfermedades y es la tercera causa de toxiinfección alimentaria, dentro de las 5 especies de *Clostridium perfringens* (A, B, C, D, E) el de tipo A es el responsable de la mayoría de procesos infecciosos ya que la enterotoxina que produce se comporta como un súper-antígeno que promueve la liberación de mediadores de inflamación (CONAL, 2012), (Adams & Moss, 2008).

La enfermedad se produce cuando se ingiere alimento contaminado con un elevado número de células viables (por encima de 10^8); Cuando los alimentos llegan al intestino se produce la esporulación y la liberación de enterotoxinas, para confirmar la existencia de la enfermedad se deben recuperar al menos 100.000UFC de *Clostridium perfringens* por gramo de alimento y 1.000.000 de microorganismos por gramo de heces en las primeras 24 horas, la enfermedad no es transmisible en forma directa, de persona a persona. El periodo de incubación es de 6 a 24 horas, siendo común de 8 a 12 horas (CONAL, 2012), (Adams & Moss, 2008).

Debido a que las bacterias esporulan en el intestino en medio alcalino, la duración de este proceso es de 6 a 8h, cuando se da la ruptura del esporangio la enterotoxina contenida en el citoplasma de la bacteria se libera en el intestino delgado en donde se



une a un receptor de membrana del ribete en cepillo e induce una alteración de la permeabilidad calcio dependiente resultando en una pérdida de iones y metabolitos. Esta pérdida electrolítica altera la función metabólica intracelular provocando daño morfológico y eventual lisis (CONAL, 2012), (Adams & Moss, 2008).

En personas sanas produce una enfermedad leve y de corta duración, causando principalmente diarrea y dolores abdominales. Los síntomas aparecen de 8 a 12 horas después de haber ingerido el alimento contaminado donde se producen importantes dolores abdominales y diarrea profusa, la enterotoxina no produce lesiones en la mucosa intestinal y la enfermedad sufre una regresión espontánea en 24-48 horas, sin dejar secuelas (CONAL, 2012), (Adams & Moss, 2008).

1.3.4.2 Enteritis necrosante o enfermedad de pig-bel

La enteritis necrótica causada por *Clostridium perfringens* es poco frecuente. Esta enfermedad se inicia como resultado de la ingesta de un gran número de bacterias *Clostridium perfringens* de tipo C productora de β -toxina presente en alimentos contaminados. La enteritis necrótica se caracteriza por la infección y la necrosis de los intestinos así como también por la septicemia (CONAL, 2012) (Adams & Moss, 2008).

La enfermedad es asociada con un alto índice de mortalidad, especialmente cuando el paciente no es tratado a tiempo con antibioterapia. Se ha reportado esta enfermedad en zonas con prevalencia de malnutrición. La β -toxina es normalmente considerada responsable de la enfermedad necrótica (CONAL, 2012), (Adams & Moss, 2008).

1.3.5 Determinación de *Clostridium perfringens* en alimentos

1.3.5.1 Características generales

El método utilizado requiere de medios sólidos selectivos para el recuento y que contengan iones de hierro y sulfito, que permitan a *Clostridium perfringens* (sulfitos reductores) formar sus colonias negras características (C. M. Burgeois & Mescle, 1994) , (Pascual & Calderón, 2000).

Existen métodos diferentes para el aislamiento, numeración e identificación, el empleado para el aislamiento y numeración es mediante la utilización de placas de Agar Sulfito Cicloserina y fermentación de carbohidratos; esta técnica analítica tiene como principio el de inocular diluciones decimales en placas de Agar TSC (Agar Triptosa Sulfito



Cicloserina), en donde dicho microorganismo reducirá los sulfitos en sulfuros, los cuales reaccionan con las sales de hierro, dando el color negro de sulfuro ferroso.(Pascual & Calderón, 2000), (C. M. Burgeois & Mescle, 1994)

1.3.6 Medios selectivos para la determinación de *Clostridium perfringens*

1.3.6.1 Agar TSN (Tryptosa Sulfito Neomicina)

El medio de cultivo fue formulado para aprovechar la tolerancia de *Clostridium perfringens* a la elevada concentración de sulfito que, además de actuar como agente inhibidor, proporciona un fuerte ambiente reductor. La selección es ideal para *Clostridium perfringens* cuando se incuba a 46°C ya que la neomicina y la polimixina incluida en el medio impiden el desarrollo de *Clostridium bifermentans* y de toda la microbiota Gram negativa acompañante. Las colonias de *Clostridium perfringens* producen colonias negras muy características que, si se exponen al aire, se decoloran por oxidación (Microbiology, 2012b).

1.3.6.2 Agar SPS (Sulfito polimixina sulfa-diazina)

Es un medio selectivo para recuperar *Clostridium perfringens* de los alimentos frescos o conservados con ingredientes alimentarios. El Agar SPS contiene peptona como fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales. El extracto de levadura suministra complejo B lo que estimula el crecimiento de la bacteria. El citrato férrico y de sodio son indicadores de H₂S. *Clostridium* reduce el sulfito a sulfuro, el cual reacciona con el hierro del citrato férrico hasta formar un precipitado de sulfuro de hierro negro. El polisorbato 80 es un agente dispersante, el sulfato de polimixina B y la sulfadiazina son inhibidores de otros microorganismos diferentes de *Clostridium spp* (CONAL, 2012), (Microbiology, 2012).

1.3.6.3 Agar TSC (Tryptosa-sulfito-cicloserina)

El medio de Tryptosa-Sulfito-Cicloserina es una modificación del medio clásico del TSN de Marshall y colaboradores en el que se han sustituido los antibióticos tradicionales, polimixina y neomicina, por la cicloserina. Este último antibiótico parece disminuir la tendencia a producir el ennegrecimiento difuso que se presenta en este género con otros agares. El medio incorpora meta-bisulfito sódico y citrato férrico-amónico para poner de manifiesto la capacidad reductora de sulfitos y de esta forma se puede verificar en un solo ensayo las tres características diferenciales de esta especie anaeróbica: sulfito-reducción, crecimiento a 46°C y resistencia a la cicloserina. Sin embargo, hay que tener



en cuenta que la cicloserina no resiste temperaturas superiores a los 100°C y por otra parte su estabilidad en solución es muy limitada (Microbiology, 2012a).

1.3.7 Medios de enriquecimiento para *Clostridium perfringens*

Son medios líquidos que contienen un agente que inhibe las especies no deseadas pero que favorece el crecimiento absoluto del agente infeccioso que se quiere estudiar.

1.3.7.1 Caldo de Tioglicolato

En microbiología se usa por su capacidad de favorecer el desarrollo de una gran variedad de microorganismos aerobios y anaerobios. El medio de cultivo, tiene por sus componentes la calidad nutricional del caldo tripteína soya. Este permite el desarrollo de una variedad de microorganismos, incluidos los nutricionalmente exigentes. Las sustancias reductoras como tioglicolato de sodio y cisteína proporcionan una anaerobiosis suficiente y debido a los grupos -SH- de estos compuestos, se neutralizan los efectos bacteriostáticos de los derivados mercuriales, arsenicales y de otros metales pesados (M. D. García & Fernandez).

1.3.8 Pruebas confirmatorias para la determinación de *Clostridium perfringens*

Tabla N°- 6: Pruebas Bioquímicas confirmatorias para *Clostridium perfringens*

Prueba		Resultado
Medio Nitrato-Movilidad	Se observa desarrollo del microorganismo sólo en la línea de inoculación, Este microorganismo reduce nitratos a nitritos	Inmóvil.
Medio de cultivo SIM (sulfuro-Indol-Motilidad)	<i>Clostridium perfringens</i> es productor de hidrógeno sulfurado.	Indol negativo e inmóvil.
Fermentación de Azúcares	Capacidad de un microorganismo para degradar un hidrato de carbono específico (lactosa, glucosa maltosa, sacarosa)	Se observa ácido o gas visible. <i>Clostridium perfringens</i> no fermenta la salicina, sin embargo sí produce ácido y gas a partir de la rafinosa

Fuente: (C. M. Burgeois & Mescle, 1994).



CAPÍTULO 2

2 METODOLOGÍA

2.1 Tipo de Investigación

El presente trabajo fue de tipo observacional, descriptivo, prospectivo de corte transversal.

2.2 Población y área de estudio

El estudio se llevó a cabo en la empresa ITALIMENTOS CIA. LTDA ubicada en la Av. Octavio Chacón # 4-103 y Vía Patamarca (Parque Industrial) Cuenca-Ecuador,

Se obtuvieron las muestras de los distintos proveedores de materia prima cárnica en las instalaciones de la Empresa ITALIMENTOS CIA. LTDA, y el análisis microbiológico se realizó en el laboratorio del Proyecto VLIR-IUC “Alimentos, nutrición y salud de la Universidad de Cuenca”.

2.3 Muestreo

Se adoptó el muestreo aleatorio simple, de esta manera se dió a cada canal de res y de cerdo de cada lote la oportunidad de ser seleccionada, según Pascual Anderson y Calderón, 2000.

La frecuencia del muestreo fue de dos días por semana seleccionados también aleatoriamente poniendo como única condición adicional de que al menos uno de los días de cualquiera de las tres semanas sea fin de semana, pero debido a los días laborables del área de carnes de la empresa, el día viernes contó como fin de semana ya que las canales del viernes se procesan el día lunes

Antes de la generación de los números aleatorios para los días de la semana, se procedieron a codificar dichos días. (Tabla 7)



Tabla N°- 7: Codificación para la obtención de los días a muestrear por semana. Los números resaltados se corresponden con los días seleccionados

SEMANA	Código	Día de la semana					
		Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado
Semana 1	1	11	12	13	14	15	16
Semana 2	2	21	22	23	24	25	26
Semana 3	3	31	32	33	34	35	36

Para generar los números aleatorios y seleccionar los días de cada semana a evaluar, se introdujo en el programa excel la fórmula =ALEATORIO.ENTRE (#;#) y se le dió el rango desde 11 (lunes de la primera semana) a 36 (sábado de la tercera semana) Tabla 7. Se escogieron los primeros 6 números que incluyeran dos días de cada semana así como al menos un fin de semana.

Para la selección de las muestras de cada lote los números aleatorios se generaron el mismo día de la toma de muestra utilizando la fórmula citada anteriormente pero introduciendo el rango de los números desde 1 hasta el máximo real del total de unidades de ese lote, la totalidad de muestras analizadas fueron 30 canales de res y cerdo respectivamente.

Una vez elegidas las muestras, se rotularon con el número correspondiente para su identificación y posterior análisis luego de la desinfección y oreo de las canales transcurridas 24 horas.

2.4 Tamaño de la muestra

La Empresa ITALIMENTOS CIA. LTDA procesa alrededor de 400 canales de cerdo y 200 canales de res a la semana, dados estos antecedentes para el tamaño de la muestra se tomó como base la norma técnica Ecuatoriana NTE INEN 0776:2013. Carne y productos cárnicos (Anexo 1). El tamaño de la muestra fue el número establecido en la norma INEN por triplicado con el fin de aumentar el nivel de confianza del muestreo de la materia prima cárnica y a la vez acatar el tamaño de la muestra establecido en la norma ISO 17604:2003 Microbiología de alimentos y animales para alimentación: Muestreo de canales para análisis microbiológico. (Anexo 2)



El número de muestras a recolectar por día fueron 10 unidades para cerdo y 10 unidades para res antes y después de la desinfección. (Tabla 8)

Tabla N°- 8: Cronograma de trabajo para la determinación de *Clostridium perfringens*

Muestras	Semanas	Días	Número de muestras antes de la desinfección	Número de muestras después de la desinfección	Total de muestras analizadas por semana	Total de muestras analizadas en 3 semanas
Cerdo	Semana 1	Martes	10		20	120
		Miércoles		10		
	Semana 2	Lunes	10		20	
		Martes		10		
	Semana 3	Martes	10		20	
		Miércoles		10		
Res	Semana 1	Miércoles	10		20	
		Jueves		10		
	Semana 2	Viernes	10		20	
		Sábado		10		
	Semana 3	Jueves	10		20	
		Viernes		10		

2.5 Toma de Muestra

Canales de Res y Cerdo:

Para la toma de muestra se siguió el procedimiento establecido en la NTE INEN 1529.2: 2013. Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico (Anexo 3). Tanto para las canales vacunas y de cerdo se muestreó por disección en donde con un cuchillo o escarpelo y pinzas estériles, se tomaron lonchas superficiales muy delgadas de aproximadamente 2mm de espesor, de las canales vacunas las zonas a muestrea fueron en la herida del sacrificio, región pectoral, costado, regiones sacras, anal, renal y cuello; de las canales de cerdo, se tomó a partir del

cuello y del área situada detrás de las orejas. Se colocaron las lonchas en fundas estériles Whirl pack. La cantidad de muestra fue de aproximadamente de 100g las mismas que se rotularon con número, fecha y el tipo de animal.



Figura N°- 1 Toma de muestra canal de res. Empresa ITALIMENTOS CIA. LTDA

Fuente: Autoras

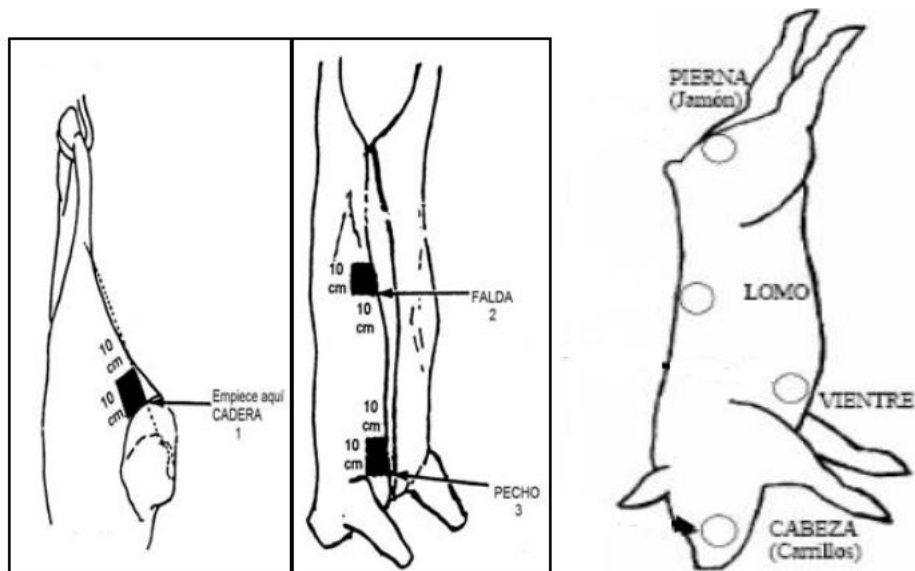


Figura N°- 2 Toma de muestra canal de res y cerdo. Fuente: (Ojeda & Vasquez, 2009)



**Figura N°- 3 Canal de res,
Empresa ITALIMENTOS CIA.
LTDA.**

Fuente: Autoras

**Figura N°- 4 Canal de
cerdo, Empresa
ITALIMENTOS CIA. LTDA**

Fuente: Autoras

2.6 Recursos Materiales

- Bolsas Whirl Pack estériles
- Cuchillo
- Alcohol 70%
- Mecheros
- Tubos tapa rosca de 16ml y 20ml
- Pipetas serológicas de 10ml, 5ml
- Pipeta automática de 1ml
- Asa redonda y asa en punta
- Cajas petri estériles de plástico
- Agua de peptona



- medio de cultivo Sulfito Polimixina Sulfadiazina Merck, F. exp. 2018/05/27 (Anexo 4)
- Medio de cultivo SIM Scharlau F. exp. 2017/10 (Anexo 5)
- Medio Agar- Agar 1% Oxoid F. exp. 2018/06
- Caldo de Tioglicolato Merck 2016/03/08 (Anexo 6)
- Reactivo de Kovacs Merck F. exp. 2016
- Bolsas de Anaerogen (ambientador de anaerobiosis)
- Agua destilada

Equipos

- Estufa MEMMERT INB200
- Balanza Analítica BOECO BBL31
- Autoclave TUTTAUER 2340Mk
- Cabina de Flujo Laminar LABCONCO 131285833
- Jarra Anaerocult
- Stomacher ® 400 circulator
- Microscopio.Olympus CX31



2.7 Métodos y técnicas de análisis microbiológico

2.7.1 Fundamento de la técnica de recuento para *Clostridium perfringens*

Es la determinación del número de células viables de *Clostridium perfringens* que, a partir de un gramo de alimento, se desarrollan sobre medios selectivos. Este método se basa en tres características importantes de este microorganismo: alta tolerancia a la polimixina, poder reductor del sulfito y su crecimiento óptimo a 46°C. La utilización de estas características para el cultivo primario es suficiente, por lo que es innecesario realizar pruebas confirmatorias adicionales.

2.7.2 Controles positivos para *Clostridium perfringens*

Los controles positivos se trabajaron con muestras de carne de res y cerdo procedentes de la misma Empresa ITALIMENTOS CIA. LTDA que fueron previamente inoculados con la cepa control activada de *Clostridium perfringens*, ATCC 13124 (Anexo 7), la cual fue importada por la compañía MEDIBAC Inc. S.A. y transportada al proyecto VLIR-IUC “Alimentos, nutrición y salud” de la Universidad de Cuenca, donde se realizó la recuperación de la cepa para su posterior inoculación en los cortes de carne (Anexo 8).

En el laboratorio se pesaron 25g de carne de res y cerdo simultáneamente, luego se las inoculó 250 µl de una suspensión de concentración conocida de *Clostridium perfringens* la que era igual a la concentración del patrón McFarland 0.5 (1.5×10^8 células) leído a una absorbancia de 625nm (Anexo 9); con la finalidad de conocer el número estimado de células viables de *Clostridium perfringens* inoculadas en los cortes de carne.

Una vez inoculadas las muestras se realizaron las respectivas diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) para la siembra en profundidad en cajas petri según la adaptación realizada a la norma técnica NTE INEN 1529.18:2013.

Se preparó una segunda inoculación tanto para carne de res y cerdo, pero esta vez se evaluó también la acción de la mezcla de ácidos orgánicos usados para el tratamiento de desinfección de las canales de la empresa. Se procedió a pesar 25g de carne para inocular 250 µl de la cepa de *Clostridium perfringens* y 25g de la misma carne también inoculada con 250 µl de la cepa pero adicionalmente se le añadió 3ml de la mezcla de

ácidos orgánicos y se trabajó normamente la técnica previamente citada. Todos los controles se trabajaron por duplicado.

2.7.3 Preparación de las muestras para el análisis microbiológico

Una vez obtenida las muestras por el método ya citado, fueron selladas y llevadas al laboratorio de calidad de “Italimentos” donde se procedió a pesar 25g de carne de cada una de las muestras en fundas Whirl pak con la ayuda de un cuchillo y pinzas estériles. Posteriormente se homogenizó con 225ml de agua de peptona al 0.1% (obteniendo una dilución de 10^{-1}) y se colocó en el stomacher por 2 minutos a 250 rpm.



Figura N°- 5 Muestra de res. Laboratorio de calidad Empresa ITALIMENTOS CIA. LTDA

Fuente: Autoras



Figura N°- 6 Homogenización. Laboratorio de calidad Empresa ITALIMENTOS CIA. LTDA

Fuente: Autoras

Las muestras homogenizadas se trasladaron en hieleras rápidamente a las instalaciones del Proyecto VLIR-IUC Alimentación, nutrición y salud de la Universidad de Cuenca para el análisis microbiológico para preparar las siguientes diluciones de 10^{-2} y 10^{-3} a partir de la dilución de 10^{-1}

2.8 Técnica de recuento de *Clostridium perfringens*

Para el desarrollo de la técnica de determinación y recuento de *Clostridium perfringens* se tomó en base a la NTE INEN 1529.18:2013. Control Microbiológico de los Alimentos. *Clostridium perfringens*. Recuento en tubo por siembra en masa (Anexo 10). Se realizaron dos variaciones en esta técnica de acuerdo al manual analítico bacteriológico (BAM) para *Clostridium perfringens* (Anexo 11), se utilizó el Agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS) por su selectividad en base a las propiedades sulfito reductoras de este microorganismo y la utilización de placas para un mejor recuento de colonias.



2.8.1 Siembra

En cajas con agar SPS (Agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina) fundido y temperado, se cogió de cada dilución decimal (10^{-1} hasta 10^{-3}) volúmenes de 1ml con una pipeta automática, se colocó en cajas petri y se homogenizó cada caja con movimientos suaves.

Una vez solidificado el agar se colocó en la jarra Anaerocult junto con la funda de Anaerogen para crear el ambiente anaeróbico y se incubó a 46°C por 18 horas (NTE INEN 1529.18, 1998).

2.8.2 Recuento de colonias

Para el recuento se eligieron las cajas de las diluciones que contenían entre 15 a 30 colonias negras características de *Clostridium perfringens*, se contabilizaron las mismas y se calculó el número de unidades formadoras de colonias (células vegetativas y esporos) por gramo de alimento. Si en la placa se obtuvieron más de 40 colonias se escogerá la placa inoculada con la dilución más alta.

Se observaron las características morfológicas de las colonias negras con halo y bordes regulares típicas de *Clostridium perfringens* y las colonias sospechosas (NTE INEN 1529.18, 1998).

2.8.3 Selección y purificación de colonias

De las colonias sospechosas contadas, se seleccionó las bien aisladas en un número equivalente a la raíz cuadrada del total, mínimo cinco colonias, con un asa se tocó el centro las mismas y se realizó un frotis; teñido por el método de Gram y se verificó la presencia sólo de bacilos Gram positivos, rectos, solos o agrupados, de $0,6$ a $2,4\mu$ de ancho y $1,3$ a $1,9\mu$ de largo.

En el caso de las colonias sospechosas que no se aislaron bien, se eligieron cinco colonias y se inocularon individualmente en tubos que contenían 5ml de caldo de tioglicolato para favorecer el crecimiento de microorganismos nutricionalmente exigentes y anaerobios, incubándose los mismo en anaerobiosis a 46°C durante 18 horas.



De este sub-cultivo, con un asa redonda se sembró en estría sobre la superficie seca de cajas con agar SPS incubándolas en las mismas condiciones anteriores. De cada caja, se seleccionó, una colonia típica bien aislada y se sometió a confirmación realizando la tinción de Gram y las pruebas de movilidad y producción de indol. (NTE INEN 1529.18, 1998)

2.8.4 Movilidad y producción de Indol

Con una asa y haciendo una picadura profunda en el tubo, se sembró individualmente cada una de las colonias purificadas. El tubo estaba compuesto de tres capas de medio de cultivo de 2 cm de alto cada una, la del fondo fue de agar SPS, la del medio de Agar-agar al 1% y la superior de medio SIM. Los tubos sembrados se incubaron en jarra de anaerobiosis a 46°C durante 16 a 18 h. (NTE INEN 1529.18, 1998)

2.8.5 Resultados

- **Lectura de la movilidad.-** Se observó el tipo de crecimiento a lo largo de la línea de siembra. *Clostridium perfringens* es inmóvil y debe crecer sólo a lo largo de la picadura sin extenderse fuera de ella. (NTE INEN 1529.18, 1998)
- **Lectura de la prueba del Indol.-** Se cubrió la superficie del medio con unas gotas de reactivo de Kovacs. El aparecimiento de un color púrpura indica una reacción positiva. *Clostridium perfringens* produce reacción negativa. (NTE INEN 1529.18, 1998)

2.8.6 Cálculos

2.8.6.1 Colonias típicas

Productos diluidos: Si al sembrar 1 cm³ de las diluciones solo se desarrollan colonias típicas, calcular el número (N) de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de muestra mediante la siguiente ecuación:

$$N = n \times f$$

En donde:

n = media aritmética de las colonias contada, f = factor de dilución (valor inverso de la dilución de la muestra)



2.8.6.2 Colonias atípicas

- Cuando se realizan pruebas complementarias, calcular N basándose en el número de las colonias atípicas confirmadas en relación al número total de las colonias atípicas contadas.
- **Productos diluidos:** Por ejemplo, si al sembrar 1,0 cm³ de la dilución 10⁻² de la muestra, en una de las placas se desarrollan 25 colonias típicas y en la otra 20; de la placa que contiene las 25, seleccionar cinco colonias y someterlas a confirmación. Si de éstas, todas fueren bacilos Gram positivos, inmóviles e indol negativos, considerar a las 25 colonias como de *Clostridium perfringens*. Si tres de las cinco colonias seleccionadas de la placa que contiene las 20, también presentaran estas características, considerar como de *Clostridium perfringens* a 12 colonias.

$$nc = \frac{Cx CT}{Cs}$$

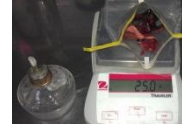
CT = número total de colonias atípicas contadas;

Cs = número de colonias atípicas sometidas a confirmación;

C = número de colonias atípicas confirmadas;

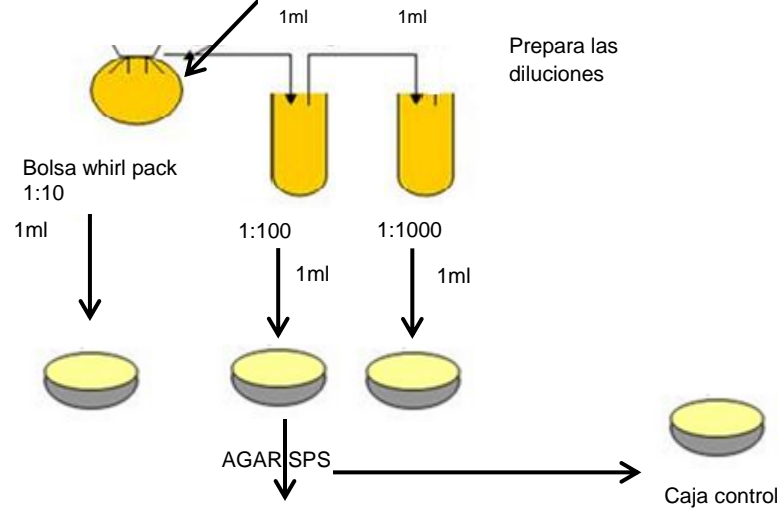
nc = número total calculado de colonias atípicas confirmadas.

2.9 Flujoograma de análisis



Pesar 25g de muestra en fundas whirl pack

Homogenizar con 225ml de agua de peptona 0.1% (2 minutos 250 rpm).

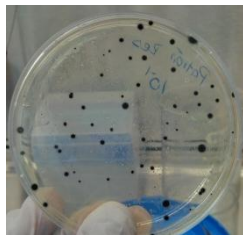


Prepara las diluciones

Incubar en anaerobiosis (18h 46°C)

Recuento de colonias negras características (típicas) y de colonias sospechosas (atípicas).

Colonias típicas.- Negras con halo de bordes regulares. Frotis tinción de Gram y observar al microscopio.

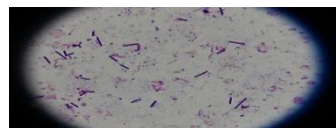


Colonias Atípicas.- Someter a identificación, pinchar con el asa el centro

Colocar en 5ml de caldo de tioglicolato e Incubar en anaerobiosis (18h 46°C)

Sembrar por estría en agar SPS e incubar en anaerobiosis (18h 46°C)

Frotis tinción de Gram y observar al microscopio.



Indol.- Gotas de reactivo de Kovacs, Viraje rosado; positivo para *Clostridium spp.*; Sin viraje; negativo para *Clostridium perfringens*



Pruebas bioquímicas: Pinchar la colonia aislada en un tubo de tres fases; 2ml de SPS, 2ml agar-agar 1% y 2ml SIM.

Motilidad.- Positivo; crecimiento fuera de la línea de picadura del medio. Negativo para *Clostridium perfringens*, crecimiento solo en la línea de picadura.





2.10 Análisis Estadístico

El procesamiento estadístico se realizó empleado los programas SPSS v.22.0 y Epidat v.3.0.

Las tablas de contingencia se analizaron por la prueba Chi-cuadrado de Pearson siempre que se cumplieran las condiciones pertinentes. En las tablas 2x2 cuando se disponía de un pequeño tamaño de muestra por casillas, se empleó la prueba exacta de Fisher. Para la comparación del recuento total entre grupos independientes se empleó el test U de Mann-Whitney y para muestras emparejadas el Test de Wilcoxon.

En todos los casos de comparación proporciones se empleó una probabilidad del 95% para determinar los intervalos de confianza. El riesgo relativo se empleó para establecer relaciones de dependencia entre variables cualitativas, considerando el estudio como prospectivo. El nivel de significancia empleado en todos los casos fue para $\alpha = 0,05$.



CAPÍTULO 3

3 RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 Determinación de *Clostridium perfringens* en muestras de cortes finos de carne de cerdo y res inoculadas con la cepa de *Clostridium perfringens* (Controles positivos)

Los resultados fueron analizados de forma cuantitativa, es decir, por recuento de unidades formadoras de colonias por gramo de alimento y se obtuvieron los siguientes datos.

TABLA N°- 9: *Clostridium perfringens* en los controles positivos (Sin adición de la mezcla de ácidos orgánicos)

<i>Clostridium perfringens</i> en los controles positivos (Sin adición de la mezcla de ácidos orgánicos) en muestra de cerdo						
	DILUCIONES					
muestra	10⁻¹	10⁻²	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵	TOTAL UFC <i>Clostridium perfringens</i>lg
1	200	15	7	0	0	7.4X10 ⁴
2	215	4	5	0	0	7.46X10 ⁴
Controles positivos (Sin adición de la mezcla de ácidos orgánicos) en muestra de res						
	DILUCIONES					
muestra	10⁻¹	10⁻²	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵	TOTAL UFC <i>Clostridium perfringens</i>lg
1	188	25	1	0	0	7.13X10 ⁴
2	202	9	1	0	0	7.1X10 ⁴

El análisis de *Clostridium perfringens* mediante la técnica de recuento en placa en los controles positivos sin adición de la mezcla de los ácidos orgánicos, presentó recuentos similares de 10⁴ en los 25g de muestra inoculada intencionalmente y en el duplicado. Lo que indica la efectividad de la técnica para la determinación de *Clostridium perfringens*.

TABLA N°- 10: *Clostridium perfringens* en los controles positivos (Con adición de la mezcla de ácidos orgánicos)

<i>Clostridium perfringens</i> en los controles positivos (Con adición de la mezcla de ácidos orgánicos) en muestra de cerdo						
	DILUCIONES					
muestra	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	TOTAL UFC <i>Clostridium perfringens</i>/g
1	0	0	0	0	0	$\leq 1 \times 10^1$
2	0	0	0	0	0	$\leq 1 \times 10^1$
Controles positivos (Con adición de la mezcla de ácidos orgánicos) en muestra de res						
	DILUCIONES					
muestra	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	TOTAL UFC <i>Clostridium perfringens</i>/g
1	0	0	0	0	0	$\leq 1 \times 10^1$
2	0	0	0	0	0	$\leq 1 \times 10^1$

En este caso el análisis de *Clostridium perfringens* mediante la técnica de recuento en placa en los controles positivos con adición de la mezcla de ácidos orgánicos, presentó ausencia de *Clostridium perfringens* en 25g de muestra, por lo que se verificó la eficacia de los ácidos orgánicos utilizados como tratamiento desinfectante de las canales de cerdo y res.

3.2 Recuento de *Clostridium perfringens* en canales de cerdo y de res antes y después del proceso de desinfección

Los resultados de los dos tipos de canales se analizaron de manera cuantitativa (mediante el recuento de unidades formadoras de colonias/g de muestra) y cualitativa (observación de las pruebas bioquímicas), partiendo de los controles positivos antes y después de la adición de los ácidos orgánicos, posterior a esto se realizó el análisis del recuento las UFC/g de *Clostridium perfringens*.



TABLA N°- 11: Semana1: Recuento de *Clostridium perfringens* en canales de cerdo y de res antes y después del proceso de desinfección

	Número de muestra	Antes de la desinfección	Después de la desinfección
		Martes3/03/15	Miércoles4/03/15
CERDO	8	4.3×10^4	$\leq 1 \times 10^1$
	12	5×10^2	$\leq 1 \times 10^1$
	16	2.5×10^2	$\leq 1 \times 10^1$
	17	4.8×10^4	$\leq 1 \times 10^1$
	20	6.5×10^3	$\leq 1 \times 10^1$
	28	4×10^2	$\leq 1 \times 10^1$
	29	$\leq 1 \times 10^1$	$\leq 1 \times 10^1$
	34	3×10^3	$\leq 1 \times 10^1$
	38	1.25×10^4	1×10^1
	42	2.35×10^4	2×10^1
RES	Número de muestra	Miércoles 4/03/15	Jueves 5/03/15
	4	$\leq 1 \times 10^1$	$\leq 1 \times 10^1$
	9	$\leq 1 \times 10^1$	$\leq 1 \times 10^1$
	11	1×10^4	6.5×10^1
	19	$\leq 1 \times 10^1$	$\leq 1 \times 10^1$
	21	$\leq 1 \times 10^1$	$\leq 1 \times 10^1$
	26	$\leq 1 \times 10^1$	$\leq 1 \times 10^1$
	29	$\leq 1 \times 10^1$	$\leq 1 \times 10^1$
	41	$\leq 1 \times 10^1$	$\leq 1 \times 10^1$
	52	4.7×10^4	1×10^2
77	$\leq 1 \times 10^1$	$\leq 1 \times 10^1$	

En los resultados obtenidos en la primera semana se observó que 9 de las 10 muestras de cerdo presentaron recuentos altos, en comparación con las muestras de res que solo 2 de las 10 estuvieron contaminadas con *Clostridium perfringens* con recuentos similares a las muestras de cerdo, pero después del tratamiento de desinfección en las muestras de res la reducción del recuento es significativa pero aún se detectaron recuentos hasta 10^2 ; en el caso de las muestras de cerdo después de la desinfección solo dos muestras quedaron contaminadas con recuentos bajos.



TABLA N°- 12: Semana2: Recuento de *Clostridium perfringens* en canales de cerdo y de res antes y después del proceso de desinfección

CERDO	Número de muestra	Antes de la desinfección Lunes 9/03/15	Después de la desinfección Martes 10/03/15
	5	$\leq 1 \times 10^1$	$\leq 1 \times 10^1$
	7	$\leq 1 \times 10^1$	$\leq 1 \times 10^1$
	10	$\leq 1 \times 10^1$	$\leq 1 \times 10^1$
	27	$\leq 1 \times 10^1$	$\leq 1 \times 10^1$
	30	$\leq 1 \times 10^1$	$\leq 1 \times 10^1$
	33	3×10^1	$\leq 1 \times 10^1$
	39	$\leq 1 \times 10^1$	$\leq 1 \times 10^1$
	84	$\leq 1 \times 10^1$	$\leq 1 \times 10^1$
	101	$\leq 1 \times 10^1$	$\leq 1 \times 10^1$
	109	$\leq 1 \times 10^1$	$\leq 1 \times 10^1$
RES	Número de muestra	Viernes 13/03/15	Sábado 14/03/15
	1	$\leq 1 \times 10^1$	$\leq 1 \times 10^1$
	5	$\leq 1 \times 10^1$	$\leq 1 \times 10^1$
	8	$\leq 1 \times 10^1$	$\leq 1 \times 10^1$
	10	$\leq 1 \times 10^1$	$\leq 1 \times 10^1$
	11	1×10^3	3×10^1
	16	$\leq 1 \times 10^1$	$\leq 1 \times 10^1$
	25	$\leq 1 \times 10^1$	$\leq 1 \times 10^1$
	26	2.4×10^1	$\leq 1 \times 10^1$
	30	$\leq 1 \times 10^1$	$\leq 1 \times 10^1$
	33	$\leq 1 \times 10^1$	$\leq 1 \times 10^1$



Los resultados obtenidos en la segunda semana muestran disminución de contaminación con *Clostridium perfringens* en las canales muestreadas así como en los recuentos de unidades formadoras de colonias en los dos tipos de carne.

TABLA N°- 13: Semana3: Recuento de *Clostridium perfringens* en canales de cerdo y de res antes y después del proceso de desinfección

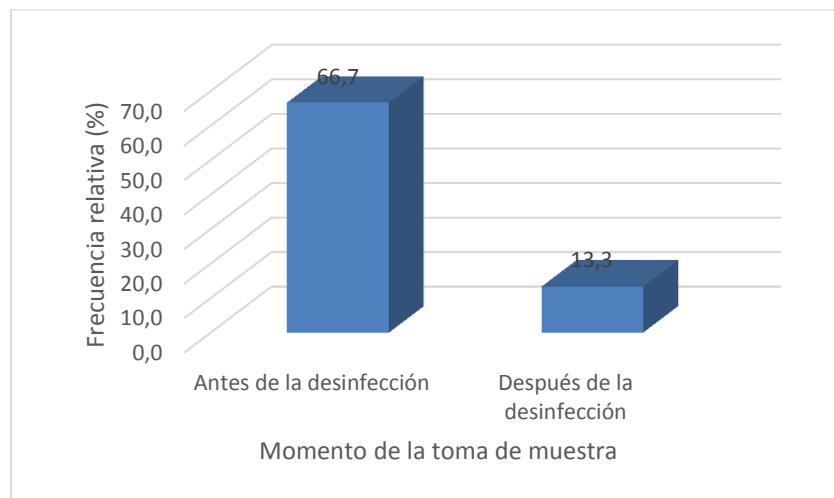
	Número de muestra	Antes de la desinfección Martes17/03/15	Después de la desinfección Miércoles18/03/15
	CERDO	4	5X10 ³
12		8X10 ³	≤1X10 ¹
15		8.45X10 ⁴	≤1X10 ¹
17		1X10 ³	≤1X10 ¹
19		1.5X10 ³	≤1X10 ¹
21		3.65X10 ⁴	≤1X10 ¹
27		5.25X10 ⁴	1.1X10²
37		1.5X10 ²	≤1X10 ¹
39		1.65X10 ⁴	≤1X10 ¹
40		1X10 ²	≤1X10 ¹
RES	Número de muestra	jueves 19/03/15	Viernes 20/03/15
	1	≤1X10 ¹	≤1X10 ¹
	4	≤1X10 ¹	≤1X10 ¹
	8	1x10³	≤1X10 ¹
	10	2X10³	≤1X10 ¹
	11	≤1X10 ¹	≤1X10 ¹
	16	≤1X10 ¹	≤1X10 ¹
	25	≤1X10 ¹	≤1X10 ¹
	26	≤1X10 ¹	≤1X10 ¹
	30	≤1X10 ¹	≤1X10 ¹
	33	≤1X10 ¹	≤1X10 ¹

El análisis de los resultados obtenidos indica que la contaminación de las canales de cerdo fue elevada en comparación con las de res; luego del proceso de desinfección dos muestras de cerdo presentaron recuentos por encima del nivel de rechazo (1×10^2 UFC/g) establecido por la normativa para recuento de sulfito reductores.

3.3 Frecuencia de muestras cárnicas positivas a *Clostridium perfringens* antes y después del proceso de desinfección

En el gráfico 1 se analiza la frecuencia de muestras contaminadas antes y después del tratamiento desinfectante en las canales de cerdo.

GRÁFICO N°- 1: Frecuencia de contaminación por *Clostridium perfringens* en las muestras de cerdo antes y después de la desinfección. Se presentan diferencias significativas para $P = 0,0001$

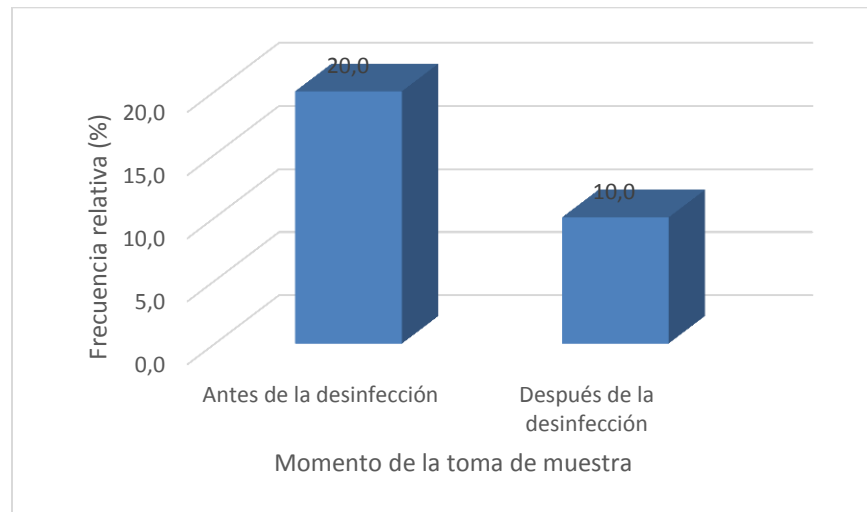


Se observa un 66.7% de contaminación en las muestras de carne de cerdo, la misma que se redujo en cinco veces después del tratamiento con el agente desinfectante. Esto indica que el tratamiento no es 100 % efectivo en la eliminación total de esta bacteria en las muestras de estudio, debido que un 13.3% de las muestras quedan positivas para *Clostridium perfringens* después de la desinfección.

En el análisis de la frecuencia de contaminación para las muestras de carne de cerdo si se presenta diferencias significativas antes y después del proceso de desinfección.

En el gráfico 2 se analiza cómo se presentó el porcentaje de contaminación de las canales de res.

GRÁFICO N°- 2: Frecuencia de contaminación por *Clostridium perfringens* en las muestras de res antes y después de la desinfección. No se presentan diferencias significativas con $P = 0,236$



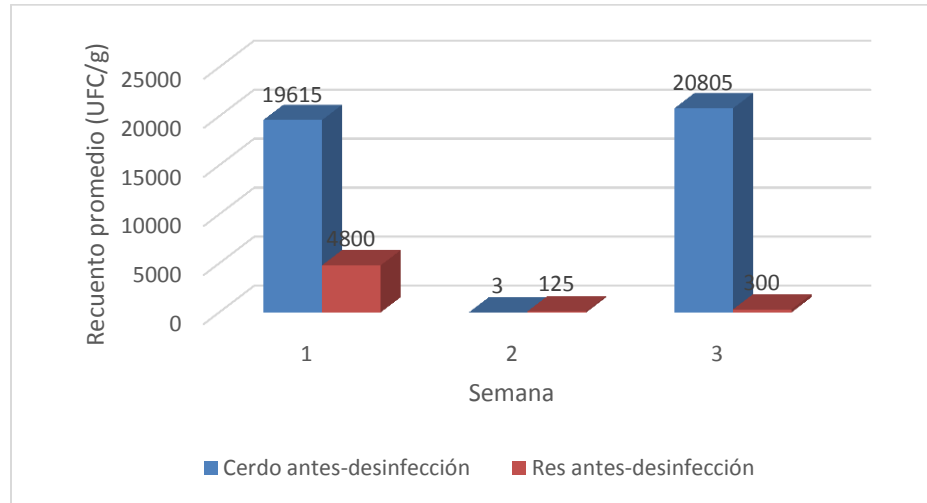
Al llegar a la empresa, dos de cada diez muestras de canales de res resultaron positivas para *Clostridium perfringens* pasando a ser la mitad de esta cantidad después del proceso de desinfección. El gráfico muestra que el 20% de las muestras estudiadas resultaron positivas y el 10% resultaron positivas después de la desinfección. La prueba estadística empleada no indicó diferencias significativas entre el porcentaje de contaminación antes y después del tratamiento desinfectante para el tamaño muestral empleado (Prueba exacta de Fisher; $P = 0,236$).

En los dos gráficos anteriores se observó la frecuencia relativa global de contaminación en las muestras investigadas.

La presencia de la bacteria en estudio antes y después del proceso de desinfección está determinada por algunas de las variables citadas en párrafos anteriores como la cantidad de desinfectante utilizado y tiempo de refrigeración de las canales.

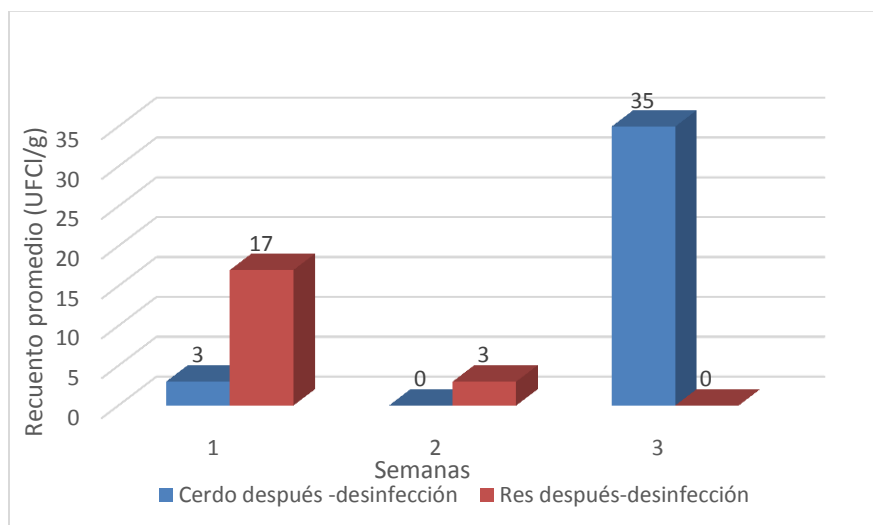
El comportamiento semanal del recuento promedio de esta bacteria en las muestras investigadas se presenta en los gráficos 3 y 4

GRÁFICO N°- 3: Recuento promedio de *Clostridium perfringens* por semana y por tipo de carne antes de la desinfección



Estos datos sugieren que existe una variabilidad en el número de colonias entre semana. Así, las canales sin desinfectar tuvieron un recuento mayor fundamentalmente en la primera y última semana debido a que en estas semanas el proveedor de materia prima cárnica fue el mismo y en la segunda semana de muestreo se trató de otro proveedor. Se observa además que los recuentos promedios son bastante superiores en la carne de cerdo en comparación con las muestras de res. En ambos casos los valores promedios de infección fueron relativamente bajos en la segunda semana.

GRÁFICO N°- 4: Recuento promedio de *Clostridium perfringens* por semana y por tipo de carne después de la desinfección



Los resultados después de la desinfección mostraron recuentos de colonias para la carne de res superiores a los de cerdo en las dos primeras semanas, en la tercera semana no se detectó contaminación por *Clostridium perfringens* en muestras de carne de res, pero sí en las canales de cerdo.

La presencia de *Clostridium perfringens* en alimentos de origen animal depende de un gran número de variables. Entre estas se pueden distinguir las referidas a la alimentación, cantidad de desinfectante aplicado, tiempo de desinfección, temperatura de conservación y manipulación, humedad, tiempo de almacenamiento en frío, carencia de medidas higiénicas al momento del sacrificio, estado de madurez de la carne entre otros (Drew et al., 2004; Jia et al., 2009; Juneja et al., 2013; Craven et al., 2001; Chan et al., 2012). Por ello no es de extrañar la variabilidad del recuento promedio de este microorganismo en la materia prima cárnica observada entre las diferentes semanas de estudio.

3.4 Cuantificación de *Clostridium perfringens* en muestras cárnicas antes y después del proceso de desinfección.

Los recuentos promedios de *Clostridium perfringens* según el tipo de carne y el momento de la toma de muestra, se presentan en la tabla 14.

TABLA N°- 14: Recuentos promedios de *Clostridium perfringens* según el tipo de carne y el momento de la toma de muestra

Tipo de carne	N	Antes de la desinfección		Después de la desinfección		P
		\bar{X} (UFC/g)	Rango (min-max)	\bar{X} (UFC/g)	Rango (min-max)	
Cerdo	30	$1,3 \times 10^4$	0 – $8,4 \times 10^4$	$1,2 \times 10^1$	0 – $2,3 \times 10^2$	0,001
Res	30	$1,7 \times 10^3$	0 – $4,7 \times 10^4$	$6,5 \times 10^0$	0 – $1,0 \times 10^2$	0,028
P	--	0,001		0,691		-----

P: probabilidad de error tipo I.

Algunas canales presentaron cargas microbianas relativamente elevadas, en el orden de las 10^4 UFC/g en ambos productos antes del proceso de desinfección. Sin embargo, estos valores aún están lejos de los considerados riesgosos para la salud humana. Según manifiestan Tirado et al. (2005) la toxinfeción se manifiesta por la capacidad de esporulación en el intestino cuando se alcanza una carga mínima de 10^6 células por g de alimento.

Por su parte el número promedio de UFC/g es superior en las muestras de cerdo respecto a las de res al momento de la recepción, y en ambos casos se reducen a un nivel tal después de la desinfección que no se presentan diferencias entre ellas.

3.5 Efectividad del desinfectante en el control de *Clostridium perfringens*

Se demostró en porcentaje la efectividad de la mezcla de ácidos orgánicos utilizada para el proceso de desinfección.

TABLA N°- 15: Efectividad del desinfectante en la eliminación de *Clostridium perfringens*.

Tipo de carne	Reducción promedio de la carga microbiana (%)	(%) Mínimo	(%) Máximo
Cerdo	99,7	95,3	100
Res	98,4	93,5	100

Se puede observar que el tratamiento desinfectante fue efectivo en la reducción de *Clostridium perfringens*, con porcentajes de eliminación en el rango del 93,5 % al 100 % de las UFC/g de los recuentos iniciales (Tabla 15). El promedio de efectividad fue relativamente similar en ambos tipos de carne con promedios de 98,4 % y 99,7% para las canales de res y cerdos respectivamente que inicialmente se detectaron contaminadas.



A pesar de esto se debe observar que en ambos casos presentan contaminación aún después del tratamiento desinfectante el 6.7% y 3.3% respectivamente con recuentos por encima del nivel de aceptación según la NTE INEN 2346-2010 consultada (3×10^1 UFC/g).

Una investigación previa realizada en la misma empresa optimizando el efecto desinfectante de diferentes mezclas de ácidos orgánicos sobre el crecimiento de microorganismos coliformes totales, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y mesófilos aerobios, indicó una reducción de la carga microbiana entre el 83,31 % y el 98,89% en muestras de carne fresca de res, mientras en las canales de cerdo el efecto fue 86,31 % y 92,75 % (Suquinagua Condo, 2012). Los resultados presentados en dicha investigación también indican una elevada efectividad del proceso de desinfección actual de la empresa para reducir la carga microbiana y también la ocasionada por *Clostridium perfringens*.

TABLA N°- 16: Intervalos de confianza para el porcentaje de muestras contaminadas por *Clostridium perfringens* antes y después del tratamiento desinfectante

Tipo de carne	N	Porcentaje antes del tratamiento IC (95 %)	Porcentaje después del tratamiento IC (95 %)	P
Cerdo	30	48,8 – 80,8	5,3 – 29,7	0,0001
Res	30	9,5 – 37,3	3,6 – 34,5	0,2358

P: probabilidad de error tipo I.

Estos resultados sugieren que a la empresa pudieran estar llegando hasta un 80,8 % de las canales de cerdo y un 37,3 % de las de res contaminadas con *Clostridium perfringens* según los márgenes de error permitidos para este trabajo.

Los porcentajes de contaminación para las canales de res reportados son bastante inferiores a los presentados en la revisión sobre el tema realizada por Troutt & Osburn (1997) quienes aseguran que esta bacteria puede llegar infectar el tracto gastrointestinal de hasta el 80 % de ganado vacuno. Estudios más recientes sugieren que este microorganismo afecta hasta el 92 % de los cerdos de engorde y el 67 % de ganado vacuno (Kukier and Kwiatek; 2010), resultados más cercanos a los obtenidos en la presente investigación.

En el ámbito latinoamericano, si bien algunos estudios sugieren que la carne cruda comercializada puede presentar elevados niveles de contaminación por microflora entérica (Cabrera Maldonado et al., 2013; Jiménez Edeza et al., 2012; Espino Stuard, 2006;



González Hernández y Vásquez del Cid, 2008; Méndez et al., 2011) son escasas las que evalúan la presencia de *Clostridium perfringens*. En este sentido solo se encontraron resultados similares en Brasil donde Porfida Ferrera et al. (2012) indicaron que aproximadamente 58,8 % de las carcasas de cerdo de las muestras obtenidas en los mataderos de Sao Pablo (oscilando entre el 20 % y el 90 %), estuvo contaminada por esta bacteria.

Otras investigaciones, esta vez desarrolladas Costa Rica indicaron que más del 60% de los establecimientos que vendían productos a base de carne tenían en algún momento contaminación por este microorganismo (Gutiérrez et al., 1999); mientras que en Perú el 100 % de las hamburguesas a base de carne que se preparaban de forma artesanal en la ciudad de Trujillo también estaban afectadas (Alvarado Salinas et al., 2013).

3.6 Comportamiento de la frecuencia de canales de cerdo y res contaminadas por semana y su intervalo de confianza al 95% de probabilidad

El análisis por semana indica un comportamiento muy variable, donde algunos días de la semana pueden llegar contaminadas el 100 % de las canales de cerdo y permanecer afectadas después del proceso de desinfección hasta un 50 % de ellas (tabla 17). Esto puede estar asociado a un elevado número de variables intervinientes. Por ejemplo, las oscilaciones de temperatura a la que se procese y almacene la carne puede constituirse en un factor importante para el desarrollo de este microorganismo (Çakmak et al., 2006).

TABLA N°- 17: Comportamiento de la frecuencia de canales contaminadas por semana y su intervalo de confianza al 95 % de probabilidad

	Porcentaje de contaminación (IC 95 %)		
	Semana 1 (n = 10)	Semana 2 (n = 10)	Semana 3 (n = 10)
Cerdo			
Antes de la desinfección	90,0 (50,6 – 98,2)	10,0 (1,8 – 40,4)	100,0 (72,3 – 100,0)
Después de la desinfección	20 (5,7 – 51,0)	0,0 (0,0 – 27,8)	20,0 (5,7 – 51,0)
Res			
Antes de la desinfección	20,0 (5,7 – 51,0)	20,0 (5,7 – 51,0)	20,0 (5,7 – 51,0)
Después de la desinfección	20,0 (5,7 – 51,0)	10,0 (1,8 – 40,4)	0,0 (0,0 – 27,8)



3.7 Riesgo de contaminación en las muestras de estudio.

Para comprender el significado de los resultados anteriores en el ámbito epidemiológico, se obtuvieron los riesgos relativos (RR) referidos a que la carne que llega a la empresa y sea destinada para otros procesos estuviera contaminada con recuentos superiores al límite de aceptación (30 UFC/g) dados por la NTE INEN 2346:2010

TABLA N°- 18: Riesgo de contaminación antes y después de la desinfección por comparación de las proporciones de contaminación de la carne del cerdo con la de res

Momento de la medición	% Cerdo contaminado	% Res contaminado	RR	IC (95 %)	P
Antes de la desinfección	66,7	20,0	3,33	1,56 – 7,12	< 0,05
Después de la desinfección	6,7	10,0	0,67	0,12 – 3,71	ns.

P: probabilidad de error tipo I.; ns: no significativo.

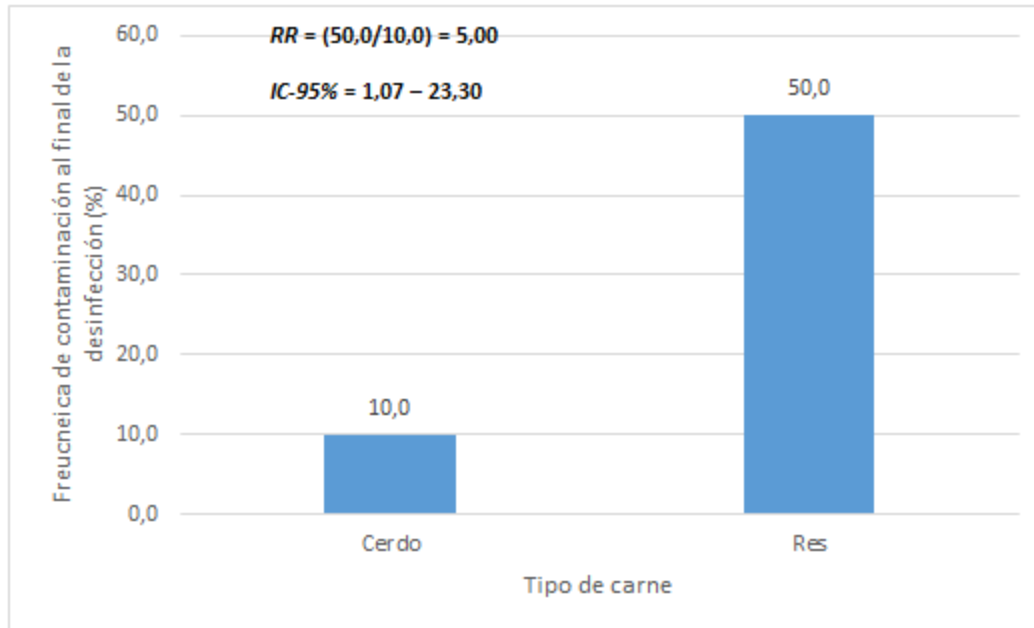
Este análisis resume el valor del Riesgo relativo (y su intervalo de confianza) al comparar las proporciones de contaminación de ambos tipos de carne antes y después del tratamiento descontaminante. Los resultados indican que al llegar a la empresa la carne de cerdo posee 3,33 veces más probabilidad que la carne res de presentar recuentos de *Clostridium perfringens* superiores al límite de aceptación. Por el contrario después del proceso de desinfección no existe diferencia significativa de contaminación entre los dos tipos de carne.

La tabla anterior presenta valores globales tomando en cuenta los que sobrepasan el límite de aceptación establecidos en la norma ecuatoriana mencionada.

3.8 Frecuencia de contaminación al final de la desinfección

La cantidad de muestras de cerdo que llegan contaminadas y las que persisten después de la desinfección no es la misma como el caso de las muestras res. Mientras en la primera llegan veinte muestras con recuentos superiores al nivel de aceptación y persisten después del proceso de desinfección solo dos con estas características (10 %), en la segunda solo llegan seis muestras con recuentos elevados y quedan tres afectadas (50 %), esto implica que el riesgo relativo es cinco veces mayor con respecto a que una canal de res pasado el proceso de desinfección incumpla con la norma establecida con relación a la de cerdo (RR = 5,00; IC-95,0 % = 1,07 – 23,30)

GRÁFICO N°- 1: Porcentaje de muestras que quedan contaminadas con recuentos superiores al nivel de aceptación en ambos tipos de carne, referidos al total de muestras que llegaron afectadas a la empresa. *RR*: riesgo relativo res frente cerdo; *IC-95,0%*: Intervalo de Confianza



Las diferencias entre los porcentajes de contaminación según el tipo de carne analizada pueden estar asociadas a múltiples factores, donde la dieta de ambas especies puede ser una variable muy importante. Algunos estudios realizados en aves de corral sugieren que la fuente de proteínas, el tipo y la composición de aminoácidos empleadas en su alimentación afectan la susceptibilidad a infectarse con *Clostridium perfringens* (Drew et al., 2004; Jia et al., 2009; Annett et al., 2002. No se descarta la posibilidad de que estas muestras estén afectadas por distintas cepas de la bacteria con diferente grado de susceptibilidad al tratamiento desinfectante (Guran et al., 2014).

Por último los resultados de este trabajo indican que solo 2 de cada 30 muestras de cerdo (6,7 %; IC: 1,9 – 21,3 %) y 1 de cada 30 muestras de res (3,3 %; IC: 0,6 – 16,7 %) terminan el proceso de desinfección con recuentos de *Clostridium perfringens* superiores al nivel de rechazo del producto (1×10^2 UFC/g); lo cual no sería significativo tomando en cuenta que la norma establece que solo se rechazaría el lote si una de cada cinco muestras analizadas incumple con este requisito. Sin embargo, las dos muestras de cerdo con valores elevados después de la desinfección se obtuvieron en la tercera semana sobre una muestra de 10



canales (o sea, el 20 % de la muestra afectada), lo que sugiere que en este caso el lote no cumplía con la especificación.

Se debe recalcar que el análisis anterior solo es válido para el período de las tres semanas de estudio lo que imposibilita hacer inferencias sobre un comportamiento permanente de las variables analizadas.



CONCLUSIONES

- Se determinó la prevalencia de *Clostridium perfringens* en materia prima cárnica de la Empresa ITALIMENTOS CIA. LTDA, la cual fue elevada en canales de cerdo (66,7%) comparada con las de res (20%). El recuento de *Clostridium perfringens* en las muestras analizadas antes del proceso de desinfección fue de un valor promedio de 10^4 confirmando su presencia tanto en canales de cerdo y de res, dicho valor disminuyó significativamente luego del proceso de desinfección encontrando valores por debajo de 10^2 dentro de lo que la normativa Ecuatoriana permite para *Clostridium* sulfitos reductores por lo tanto el tratamiento desinfectante es efectivo para reducir el contenido de *Clostridium perfringens* en la materia prima cárnica evidenciándose una reducción significativa del 99% para la carne de cerdo y un 98% para carne de res.
- Se determinó el riesgo relativo (RR) mostrando la probabilidad de que una canal de cerdo llegue contaminada a la empresa es 3,33 veces mayor en relación con las canales de res; sin embargo es cinco veces más probable que las muestras de res que llegan contaminadas terminen el proceso de desinfección con recuentos superiores a los niveles de aceptación que las canales de cerdo.



RECOMENDACIONES

- Socializar los resultados con los directivos de calidad de ITALIMENTOS CIA LTDA para que desarrollen las investigaciones necesarias por un período de más tiempo para determinar el verdadero nivel de riesgo microbiológico de las canales de cerdo y res que llegan a la empresa, así como los puntos determinantes en ello.
- Los resultados del estudio no reflejan datos de la influencia de variables como nutrición, crianza y sacrificio de ambas especie en los porcentajes de contaminación según el tipo de carne, por lo que lo anterior no sobrepasa de ser una hipótesis tentadora para futuras investigaciones.
- Implementar la técnica de manera periódica para el control de proveedores.
- Implementar la técnica para la detección y recuento de *Clostridium perfringens* en los producto cárnicos procesados en los que se exija este criterio microbiológico.
- Realizar la trazabilidad de la materia prima cárnica para garantizar el seguimiento y control de la calidad a lo largo del procesamiento y en los productos terminados.



GLOSARIO

1. **ATP:** El Adenosin Trifosfato es la moneda energética del metabolismo, es principalmente esta molécula la que intercambia la energía metabólica en todos los organismos vivos. Estructuralmente es un nucleótido formado por adenina unida a un azúcar de cinco carbonos (la ribosa) por el carbono número uno de esta última. El carbono cinco de la ribosa une un conjunto de tres fosfatos en cadena mediante enlaces fosfodiéster ricos en energía. Universal, E. I. (Ed.) (2008) La **Enciclopedia** Libre Universal en Español
2. **Cicloserina:** Antibiótico que inhibe la formación de la pared bacteriana. Es utilizado en el tratamiento de la tuberculosis. Universal, E. I. (Ed.) (2008) La **Enciclopedia** Libre Universal en Español
3. **Compuestos hemínicos:** Componentes sanguíneos que hacen referencia a la mioglobina y hemoglobina. Universal, E. I. (Ed.) (2008) La **Enciclopedia** Libre Universal en Español
4. **Enzimas catepsínicas:** son enzimas con actividad proteolítica, se encuentra en tejidos animales, catalizan la hidrólisis de proteínas a polipéptidos. Se encuentran en muchos tipos de células, incluyendo a todas las células de animales. Universal, E. I. (Ed.) (2008) La **Enciclopedia** Libre Universal en Español
5. **Glucógeno:** Principal hidrato de carbono almacenado en las células animales, mayoritariamente en el hígado y en menor cantidad en las células musculares. Se forma a partir de la glucosa mediante el proceso de glucogénesis. El glucógeno es una sustancia de reserva que se transforma en glucosa cuando el organismo necesita energía. Universal, E. I. (Ed.) (2008) La **Enciclopedia** Libre Universal en Español
6. **Glucolisis:** Es la vía metabólica encargada de oxidar o fermentar la glucosa y así obtener energía para la célula. Ésta consiste de diez reacciones enzimáticas que convierten a la glucosa en dos moléculas de piruvato, la cual es capaz de seguir otras



vías metabólicas y así continuar entregando energía al organismo. Universal, E. I. (Ed.) (2008) La **Enciclopedia** Libre Universal en Español

7. **Hipoxantina:** Es una forma metabólica de las purinas (adenina y guanina), se obtiene por la desaminación de la adenina. Universal, E. I. (Ed.) (2008) La **Enciclopedia** Libre Universal en Español.
8. **Lecitina:** es un fosfolípido que, junto con las sales biliares, ayuda a la solubilización de los ácidos biliares en la bilis. Universal, E. I. (Ed.) (2008) La **Enciclopedia** Libre Universal en Español.
9. **Lecitinasa C:** Enzima que cataliza la hidrólisis de la lecitina. Universal, E. I. (Ed.) (2008) La **Enciclopedia** Libre Universal en Español
10. **línea Z:** Estriación transversal (conjunto de estrías) estrecha, que corta en dos partes iguales la banda I de los músculos esqueléticos. La distancia entre las líneas Z es la longitud del sarcómero. También llamada disco intermedio, banda Z, disco Z. Universal, E. I. (Ed.) (2008) La **Enciclopedia** Libre Universal en Español
11. **Lipoproteínas:** Complejo macromolecular compuesto por proteínas y lípidos. Las lipoproteínas son esféricas y están compuestas por un núcleo de grasas rodeado de una capa externa polar. Al ser hidrosolubles el organismo las utiliza para transportar grasas a todo el cuerpo a través de la sangre. Universal, E. I. (Ed.) (2008) La **Enciclopedia** Libre Universal en Español.
12. **Miofibrillas:** Conjunto de miofilamentos de actina y miosina distribuidos muy ordenadamente por el citoplasma de las células musculares. Universal, E. I. (Ed.) (2008) La **Enciclopedia** Libre Universal en Español
13. **Mioglobina:** La mioglobina es una proteína cuya función principal es transportar el oxígeno a los músculos; La mioglobina también está considerada como un pigmento, ya que es la responsable del color rojo de los músculos. Universal, E. I. (Ed.) (2008) La **Enciclopedia** Libre Universal en Español



- 14. Mucoproteínas:** Compuesto presente en todos los tejidos conectivos y de sostén que contiene polisacáridos combinados con proteínas, y que es relativamente resistente a la desnaturalización. Universal, E. I. (Ed.) (2008) La **Enciclopedia** Libre Universal en Español.
- 15. Músculos Maseteros:** Es un músculo de la cara corto, cuadrilátero; Se inserta en el borde inferior del arco cigomático y en la cara externa de la rama del maxilar inferior o mandíbula, uniendo ambas estructuras óseas. Su función es cerrar y retraer la mandíbula. Universal, E. I. (Ed.) (2008) La **Enciclopedia** Libre Universal en Español.
- 16. Neuraminidasa:** Enzima que cataliza la escisión del ácido *N*-acetilneuramínico (forma parte de las membranas y cubiertas de las células de los animales superiores) de los mucopolisacáridos. Universal, E. I. (Ed.) (2008) La **Enciclopedia** Libre Universal en Español.
- 17. Proteínas del estroma:** constituyen un 10-15 % del contenido total de proteínas del músculo. Las dos proteínas principales del tejido conjuntivo son el colágeno y la elastina que representan más del 50 %de las proteínas del estroma. Universal, E. I. (Ed.) (2008) La **Enciclopedia** Libre Universal en Español
- 18. Proteínas del Sarcoplasma:** Son un conjunto heterogéneo de varias centenas de proteínas diferentes que contienen todas las enzimas que participan en la glicólisis así como numerosas enzimas asociadas al metabolismo de los glúcidos y proteínas. Universal, E. I. (Ed.) (2008) La **Enciclopedia** Libre Universal en Español
- 19. Sarcómero:** Es la unidad anatómica y funcional del músculo estriado. Está formado por actina y miosina. La contracción del músculo consiste en el deslizamiento de los miofilamentos finos de actina sobre los miofilamentos de miosina (miofilamentos gruesos), todo esto regulado por la intervención nerviosa y la participación del calcio. Universal, E. I. (Ed.) (2008) La **Enciclopedia** Libre Universal en Español



- 20. Sulfato de neomicina:** Antibiótico aminoglucósido, efectivo contra microorganismos Gram negativos y muchos Gram positivos. Universal, E. I. (Ed.) (2008) La **Enciclopedia** Libre Universal en Español
- 21. Sulfato de polimixina:** antibiótico polipeptídico producido por una cepa de *Bacillus polymyxa*. Su espectro de actividad se limita a las bacterias Gram-negativas. Universal, E. I. (Ed.) (2008) La **Enciclopedia** Libre Universal en Español
- 22. Sulfomioglobina:** Coloración formada por la adición de sulfuro de hidrógeno y oxígeno sobre mioglobina reducida, también de la incorporación de azufre al grupo hemo y la reducción de uno de los anillos pirrólicos. La producción bacteriana (*pseudomonas*, *lactobacilos*) de sulfuro de hidrógeno facilita el desarrollo de decoloraciones verdes en la carne. Universal, E. I. (Ed.) (2008) La **Enciclopedia** Libre Universal en Español



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarado Salinas, PA.; Vásquez Valles, MN., Saldaña Sevilla, WH. y Vargas Huamán, A. (2013). Clostridium perfringens sulfito reductores en hamburguesas que se comercializan en mercados de la ciudad de Trujillo, Perú. REBIOL 2013, 33 (1): 1-5.
- Adams, M. R., & Moss, M. O. (2008). Food Microbiology (Third ed., pp. 209-213).
- Annett, C. B. Viste, J. R., Chirino-Trejo, M., Classen, H. L, Middleton, D. M. & E. Simko (2002). Necrotic enteritis: Effect of barley, wheat and corn diets on proliferation of Clostridium perfringens type A. Avian Pathology, 31:6, 598-601, DOI: 10.1080/0307945021000024544
- Amerling, C. (2001). Conservación y procesamiento de la carne. In EUNED (Ed.), Tecnología de la carne: Antología (pp. 26-27).
- Antich, E. D., & Roberto, I. E. (2006). Gestión del autocontrol en la industria agroalimentaria: Ed. Univ. Politéc. Valencia.
- Astiz, C. S. (1992). La calidad organoléptica de la carne. Mundo Ganadero, II, 83-86.
- Atwa, El and Abou El-Roos, NA (2011). Incidence of Clostridium perfringens in Meat Products at Some Egyptian Governorates. International Journal of Microbiological Research 2 (3): 196-203.
- Burgeois, C. M., & Mescle, J. F. (1994). Clostridium perfringens. In Acibia (Ed.), Microbiología alimentaria. Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria (pp. 93-107). Zaragoza.
- Burgeois, M. C., & Mescle., J. F. (1994). Otras Carnes y Productos Cárnicos. In Acibia (Ed.), Microbiología alimentaria. Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria (Vol. 1, pp. 247-261). Zaragoza.
- Cabrera-Maldonado, C., León-Tello, G., Tejeda-Trujillo, F., Ramírez-Juárez, B., Flores-Encarnación, M. (2013). Estudio preliminar para investigar salmonella sp. Y e. Coli o157:h7 en carne molida de res, de venta en supermercados en la ciudad de Puebla, México. CienciaUAT. 26(2): 64-69.
- Cakmak, A., Bülür Ormanci, FS., Tayfur, M., Erol, U. (2006) . Presence and Contamination Level of Clostridium perfringens in Raw Frozen Ground Poultry and Poultry Burgers. Turk J Vet Anim Sci; 30:101-105.
- Chan, G., Farzan, A., Soltes, G., Nicholson, V.M., Pei, Y., Friendship, R. and Prescott, JF. (2012). The epidemiology of Clostridium perfringens type A on Ontario swine farms, with special reference to cpb2-positive isolates. BMC Veterinary Research, 8:156 Husnu



- Sahan Guran • Aydın Vural • Mehmet Emin Erkan (2014). The prevalence and molecular typing of *Clostridium perfringens* in ground beef and sheep meats. *J. Verbr. Lebensm.*; 8p. DOI 10.1007/s00003-014-0866-z. Fecha de consulta diciembre 13 del 2014
<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/8/156>
- Craven, SE, Stern, NJ, Bailey, JS, Cox, NA. (2001). Incidence of *Clostridium perfringens* in broiler chickens and their environment during production and processing. *Avian Dis.*;45(4):887-96.
- Carvajal, I. G. (2001). Valor Nutricional de la carne de res, pollo y cerdo Corporacion de fomento ganadero San Jose – Costa Rica (pp. 4-8).
- CONAL, R. N. d. p. d. A. (2012). Toxiinfección por *Clostridium perfringens* Enfermedades transmitidas por alimentos. Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- Drew, MD., Syed, NA., Goldade, BG., Laarveld, B. and Van Kessel, AG. (2004). Effects of Dietary Protein Source and Level on Intestinal Populations of *Clostridium perfringens* in Broiler Chickens. *Poultry Science*, 83:414–420.
- Espino Stuard, LR. (2006). Recuento de bacterias aerobias mesofilas totales en canales bovinas mediante el método de hisopado en un camal de Lima Metropolitana (Tesis). UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS: Perú.
- Freixanet, L. (2013). Aditivos e ingredientes en la fabricación de productos cárnicos cocidos de músculo entero. *Metalquímica*, 28-40.
- García, B. M. (2003). Higiene e inspección de carnes (Vol. 2): Ediciones Díaz de Santos.
- García, B. M. (2006). Higiene e inspección de carnes-I: Ediciones Díaz de Santos.
- García, M. D., & Fernandez, F. La Conservación de cepas microbianas Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). (pp. 1-9).
- González Hernández, VS y Vásquez del Cid, FJ. (2008). Identificación de *Listeria monocytogenes* en carne de res cruda comercializada en los principales supermercados del area metropolitana de San Salvador (Tesis). Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia: El Salvador.
- Gurmu, E. B, Hazarika, A., Borah, P., Barua, AG. (2013). Presence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in foods of animal origin, Guwahati, India. *Environ Occup Sci*;2(1):45-50
- Gutiérrez, A., Gamboa, M., Rodríguez, E., Arias, M. (1999). Presencia de *Clostridium perfringens* en preparaciones a base de carne en servicios de alimentación pública del cantón central de San José, Costa Rica (Resumen). *ALAN*; 49(3): 275-278. Fecha de



- consulta marzo 29 del 2015. Disponible en: http://www.alanrevista.org/ediciones/1999-3/presencia_clostridium_perfringens_preparaciones_carne.asp
- Heymann, D. L. (2005). Control de las Enfermedades Transmisibles. In C. Welchis (Ed.), Intoxicacion alimentaria por Clostridium perfringens (18a Edicion Washintong D.C ed., pp. 391,392).
- Jerez, J. J. R. (2005). El uso de lactatos en el control de productos cárnicos.
- Jia, W., Slominski,BA., Bruce, H., Blank, G., Crow, G., and O. Jones. (2009). Effects of diet type and enzyme addition on growth performance and gut health of broiler chickens during subclinical Clostridium perfringens challenge. Poultry Science 88:132–140 doi:10.3382/ps.2008-00204.
- Jiménez Edeza, M., Chaidez Quiroz, C., y León Félix, J. (2012). Calidad microbiológica de carne de res comercializada en el mercado municipal de Culiacán, Sinaloa. Vet. Méx., 43 (4):273-284
- Juneja, VK., Porto-Fett, ACS., Gartner, K., Tufft, L., and Luchansky, JB. (2013). Potential for Growth of Clostridium perfringens from Spores in Pork Scrapple During Cooling. Foodborne Pathogens and Disease; 7(2): 153-157. DOI: 10.1089=fpd.2009.0405
- Kukier, E. and Kwiatek, K. (2010). Occurrence of clostridium perfringens in food chain. Bull Vet Inst Pulawy 54, 571-576.
- Larrañaga, I. J., & Carballo, J. (1999). Características de carnes, aves,caza y derivados. In McGraw-Hill (Ed.), Control e higiene de los alimentos (pp. 294-303). Madrid.
- M., B. C., & Mescle, J. F. (1994). Clostridium perfringens. In Acribia (Ed.), Microbiología alimentaria. Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria (pp. 93-107). Zaragoza.
- Méndez, IA., Badillo, CA. Ortiz Parra, G., Faccini, AA. (2011). Caracterización microbiológica de Salmonella en alimentos de venta callejera en un sector universitario de Bogotá, Colombia. Julio a octubre de 2010. MÉD.UIS.;24(1):26-32.
- Microbiology, S. (2012a). AGAR TRIPTOSA SULFITO CICLOSERINA (TSC AGAR) (pp. 1-3).
- Microbiology, S. (2012b). TRIPTONA SULFITO NEOMICINA, AGAR (TSN AGAR) In S. Microbiology (Ed.).
- Microbiology, S. (2012). Clostridium perfringens, Selective Agar (SPS Agar). In T. w. c. Scharleu (Ed.).
- Miranda, C., & Rojo, M. D. Clostridium perfringens: INFECCIONES DE PIEL Y TEJIDOS BLANDOS.



- NTE INEN 1529.2, I. E. d. (1999). Norma Técnica Ecuatoriana: Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico. (Vol. 1).
- NTE INEN 0776, I. E. d. N. (1985). Norma Técnica Ecuatoriana: Carne y productos cárnicos. (pp. 6).
- NTE INEN 1529.18, I. E. d. N. (1998). Control Microbiológico de los alimentos. Clostridium perfringens. Recuento en tubo por siembra en masa (pp. 1).
- NTE INEN 2346, I. E. d. N. (2010). Carne y menudencias comestibles de animales de abasto. Requisitos.
- Ojeda, C., & Vasquez, G. (2009). Aplicación de ácidos orgánicos en la reducción de microorganismos aerobios mesófilos y, coliformes totales y fecales en canales de bovinos.
- Pascual, M. d. R., & Calderón, V. (2000). Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas Carnes y Derivados (Segunda ed.): Diaz de Santos.
- Porfida Ferreira, T., Micke Morenoll, A., Rodrigues, R. de Ribeiro Gomes, A., Sena de Gobbi, D., Nogueira de Lima Filsner, P., Moreno, M. (2012).. Molecular typing of Clostridium perfringens isolated from swine in slaughterhouses from São Paulo State, Brazil. Ciência Rural, Santa Maria;42(8):1450-1456.
- Restrepo, D. A. (2001a). Conservación de la carne. In A. C. A. Arango Mejía Claudia María, Restrepo Digiammarco Renato Arturo (Ed.), Industria de Carnes (pp. 100-127). Colombia.
- Restrepo, D. A. (2001b). Conversión del músculo en carne, cambios post - mortem. In A. C. A. Arango Mejía Claudia María, Restrepo Digiammarco Renato Arturo (Ed.), Industria de la carne (pp. 76-88). Colombia.
- Restrepo, D. A. (2001c). Ingredientes y aditivos usados en la industria cárnica - funcionalidad. In A. C. A. Arango Mejía Claudia María, Digiammarco Renato Arturo (Ed.), Industria de carnes (pp. 89-99). Colombia.
- Restrepo, D. A. (2001d). Microbiología de la carne. In A. C. A. Arango Mejía Claudia María, Restrepo Digiammarco Renato Arturo (Ed.), Industria de Carnes (pp. 1-15). Colombia.
- Restrepo Molina Diego Alonso, A. M. C. M., Amézquita Campuzano Alejandro, Restrepo Digiammarco Renato Arturo. (2001). Conservación de la carne. Industria de Carnes(5), 100-127.



- Suquinagua Condo, VH. (2012). Desarrollo de una mezcla antimicrobiana para la desinfección de canales de res y cerdo en la empresa ITALIMENTOS (Tesis). Universidad del Azuay: Cuenca, Ecuador.
- Swatland, H. J. (1995). pH and meat quality. On-line Evaluation of Meat(II).
- Tirado, J.; Paredes, D.; Velazquez, G.; Torres, J. A. (2005). Crecimiento microbiano en productos cárnicos refrigerados. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*; 5(1):66-76. Fecha de consulta noviembre 17 del 2015. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=72450110>
- Troutt, H.F. & B.I. Osburn. (1997). Meat from dairy cows: possible microbiological hazards and risks. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 16 (2), 405-414.
- Villagra, J. G. Q. (2011). Infecciones Bacterianas de Piel y Tejido. Apuntes de Microbiología. Retrieved from Scibd. website: <https://es.scribd.com/doc/48796276/Infecciones-Bacterianas-de-La-Piel-y-Tej>
- Warriss, P. D. (2003a). Calidad de la carne. In Acribia (Ed.), *Ciencia de la carne* (pp. 111-188). Zaragoza.
- Warriss, P. D. (2003b). Cambios postmortales en el músculo y su transformación en carne. In Acribia (Ed.), *Ciencia de la carne* (pp. 97-109). Zaragoza.
- Warriss, P. D. (2003c). Composición química y estructura de la carne. In Z. Acribia (Ed.), *Ciencia de la Carne* (pp. 39-69).



ANEXOS

ANEXO 1. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 0776: 2013: Carne y productos cárnicos

Tabla de muestreo para productos mayores a 4,5 kg

Tamaño del lote (Número de Unidades del lote)	Tamaño de la muestra Unidades de Materia prima cárnica
Menor a 90	3
91 a 150	3
151 a 280	3
281 a 500	3
501 a 1.200	5
1.201 a 3.200	5
3.201 a 10.00	5
10.001 a 35.000	5

Fuente: NTE INEN 0776 (2013): Carne y productos cárnicos



ANEXO 2. Fragmento de la norma ISO 17604:2003 Microbiología de alimentos y animales para alimentación: Muestreo de canales para análisis microbiológico, citada en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas.

21.6.2001

ES

Diario Oficial de las Comunidades Europeas

L 165/51

PROCEDIMIENTO DE MUESTREO Y NÚMERO DE MUESTRAS QUE SE TOMARÁN

Se recogerán muestras de entre 5 y 10 canales un mismo día, cada semana. La frecuencia podrá ser de un muestreo cada dos semanas cuando se obtengan resultados satisfactorios durante seis semanas consecutivas. El día de la toma de muestras cambiará cada semana, de modo que queden cubiertos todos los días de la semana. El veterinario oficial determinará la frecuencia con que se analizarán los canales en establecimientos de estructura reducida o de poca capacidad, como los define el artículo 4 de la Directiva 64/433/CEE, y también en los establecimientos que no trabajen a tiempo completo.

Se basará en su propio criterio de las normas de higiene de cada matadero en lo relativo al sacrificio. Se tomará una muestra de cuatro localizaciones de cada canal transcurrida media jornada de sacrificio, antes de comenzar la refrigeración. Se registrará la identificación, la fecha y la hora de toma de cada muestra. Antes de proceder a su examen, se mezclarán las muestras de las diversas localizaciones (por ejemplo, cadera, falda, pecho y cuello) de la canal que vaya a examinarse. Si se llega a resultados inaceptables y las acciones de corrección no conducen a una mayor higiene, no se mezclarán más muestras hasta que se hayan resuelto los problemas de preparación.



ANEXO 3. NTE INEN 1529.2 Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico.

- b) Toma de muestras de canales vacunas y ovinas. Muestrear las canales con una de las siguientes técnicas:
- b.1) Hisopos o torundas. Con guantes estériles colocar la plantilla (ver 5.3.1.5) sobre la superficie que se va a muestrear. Tomar asépticamente un hisopo, abrir un tubo que contenga el diluyente adecuado, humedecer el hisopo y con movimientos rotatorios presionarlo contra las paredes del tubo para retirar el exceso del diluyente. Friccionar fuertemente el área de la superficie que se va a examinar, haciendo frotos paralelos con una ligera rotación del hisopo. Friccionar nuevamente la superficie haciendo trazos paralelos perpendiculares a los anteriores, repetir tres veces este proceso humedeciendo cada vez el hisopo. Cuidar que se frote toda el área elegida. Regresar el hisopo al tubo y con una tijera estéril o cualquier otro implemento cortar o quebrar el palillo y dejar caer la cabeza dentro del tubo, tapar el tubo con la tapa de rosca y colocarlo en un envase a prueba de agua, acondicionar el envase con hielo picado o cualquier otro refrigerante disponible. Si el bastón no es de madera, agitar el hisopo en el tubo 10 veces hacia arriba y abajo. Identificar la muestra. Para realizar recuentos, utilizar la cantidad necesaria del diluyente para obtener una dilución inicial de 10^{-1}
 - b.2) Tomas de muestras por disección. Con un escalpelo y pinza estériles tomar lonchas superficiales muy delgadas de aproximadamente 2 mm de espesor de la herida del sacrificio, región pectoral, costado, regiones sacro, anal, renal y cuello. De las canales de cerdo, tomar a partir del cuello y del área situada detrás de las orejas. Colocar las lonchas en el frasco para muestras. Tomar una muestra no menor de 100 g.

**ANEXO 4.** Composición del medio selectivo Agar SPS.

Formula

Difco™ SPS Agar

Approximate Formula* Per Liter

Tryptone	15.0	g
Yeast Extract	10.0	g
Ferric Citrate	0.5	g
Sodium Sulfite.....	0.5	g
Sodium Thioglycollate	0.1	g
Polysorbate 80	0.05	g
Sulfadiazine	0.12	g
Polymyxin B Sulfate	0.01	g
Agar	15.0	g

*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria.

Directions for Preparation from Dehydrated Product

1. Suspend 41 g of the powder in 1 L of purified water. Mix thoroughly.
2. Heat with frequent agitation and boil for 1 minute to completely dissolve the powder.
3. Autoclave at 121°C for 15 minutes.
4. Test samples of the finished product for performance using stable, typical control cultures.

Procedure

1. Dispense inoculum into sterile Petri dish.
2. Pour medium cooled to 50-55°C over the inoculum.
3. Gently but thoroughly mix the inoculum and medium. Allow to solidify on a flat surface.
4. Incubate anaerobically at 35 ± 2°C for 24-48 hours.

Expected Results

Clostridium perfringens will grow as black colonies with good growth.



ANEXO 5. Medio de movilidad SIM

Formula

BBL™ SIM Medium

Approximate Formula* Per Liter

Pancreatic Digest of Casein	20.0	g
Peptic Digest of Animal Tissue.....	6.1	g
Ferrous Ammonium Sulfate.....	0.2	g
Sodium Thiosulfate	0.2	g
Agar	3.5	g

**Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria.*

Directions for Preparation from Dehydrated Product

1. Suspend 30 g of the powder in 1 L of purified water. Mix thoroughly.
2. Heat with frequent agitation and boil for 1 minute to completely dissolve the powder.
3. Dispense and autoclave at 121°C for 15 minutes.
4. Test samples of the finished product for performance using stable, typical control cultures.

Procedure

Loosen caps, boil and cool before use. Using growth from a pure culture, stab an inoculating needle two-thirds of the distance to the bottom in the center of the tube. Incubate tubes with loosened caps for 18-24 hours at 35 ± 2°C in an aerobic atmosphere.

ANEXO 6. Medio selectivo caldo de Tioglicolato

Application



Thioglycollate Broth

For cultivation and isolation of obligate and facultative anaerobic and microaerophilic bacteria and for sterility tests.

General Information

Both culture media comply with the recommendations of United States Pharmacopela XXVI (2003), the European Pharmacopela and APHA (1992).

Mode of Action

The reducing agents thioglycollate and cystine ensure an anaerobiosis which is adequate even for fastidious anaerobes. The sulfhydryl groups of these substances also inactivate arsenic, mercury and other heavy metal compounds.

The thioglycollate media are thus suitable for the examination of materials which contain heavy metals or heavy metal preservatives. The higher viscosity of the Fluid Thioglycollate Medium prevents rapid uptake of oxygen. Any increase in the oxygen content is indicated by the redox indicator sodium resazurin which changes its colour to red.

Typical Composition (g/litre)

Peptone from casein 15.0; yeast extract 5.0; D(+)-glucose 5.5; L-cystine 0.5; sodium chloride 2.5; sodium thioglycollate 0.5.

Preparation

Suspend 29 g Thioglycollate Broth/litre, dispense into tubes, autoclave 15 min at 121 °C).

pH: 7.1 ± 0.2 at 25°C.

The prepared media are clear and yellowish.

Storage

The culture media should always be freshly prepared.

Experimental Procedure and Evaluation

Inoculate the culture medium with the sample material taking care that the sample reaches the bottom of the tubes. In order to ensure anaerobiosis, the medium can then be overlayed with 1 cm of sterile liquid paraffin or agar solution.

Incubation: several days at the optimal incubation temperature (35-37°C).

Anaerobes grow in the lower part of the culture.

Literature

American Public Health Association: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. - 3rd ed. (1992).

European Pharmacopela II, Chapter VIII. 3.



Application



United States Pharmacopela XXVI, Chapter "Microbial Limit Tests", 2003.

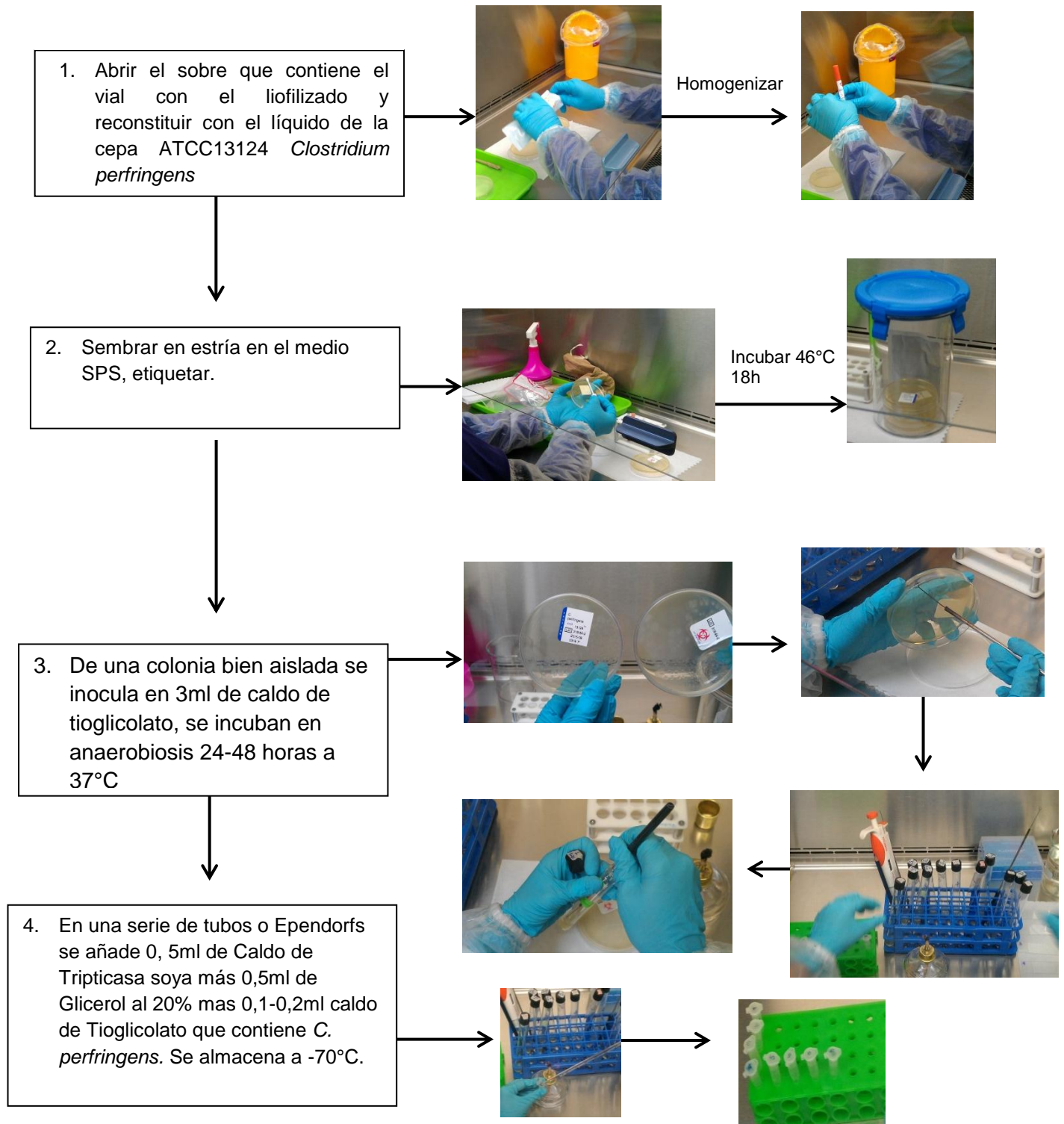
Ordering Information

Product	Ordering No.	Pack size
Thioglycollate Broth	1.08190.0500	500 g
Thioglycollate Broth	1.08190.5000	5 kg
Agar-agar purified	1.01614.1000	1 kg
Paraffin viscous	1.07160.1000	1 l

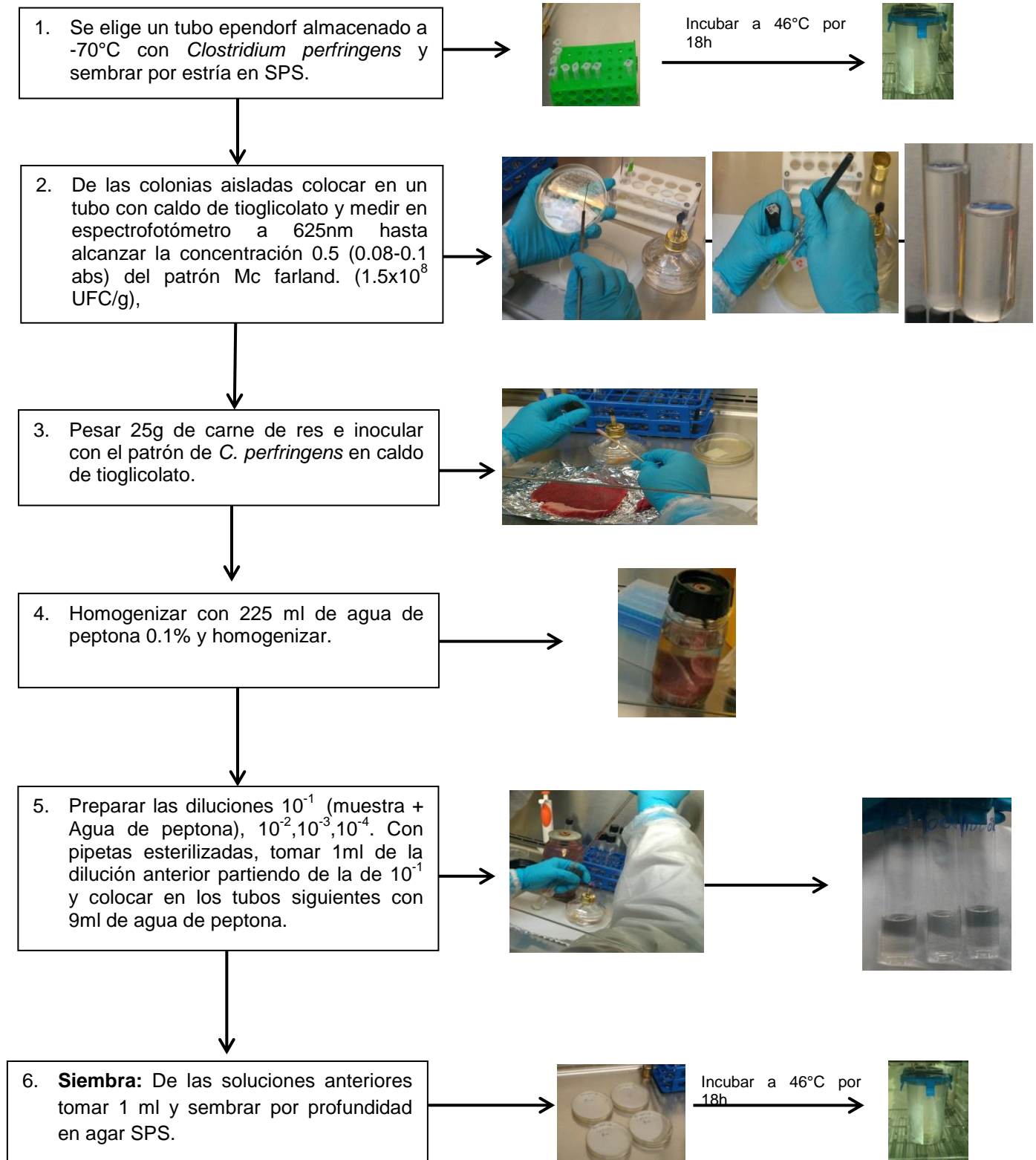
Quality control

Test strains	Growth
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	good
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 19404	good (anaerobic)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	good
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	good
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	good
<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482	good (anaerobic)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	good
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	good

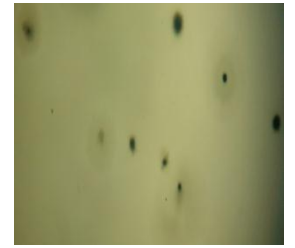
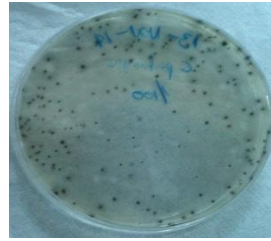
ANEXO 7. Activación de la cepa ATCC 13124 de *Clostridium perfringens*.



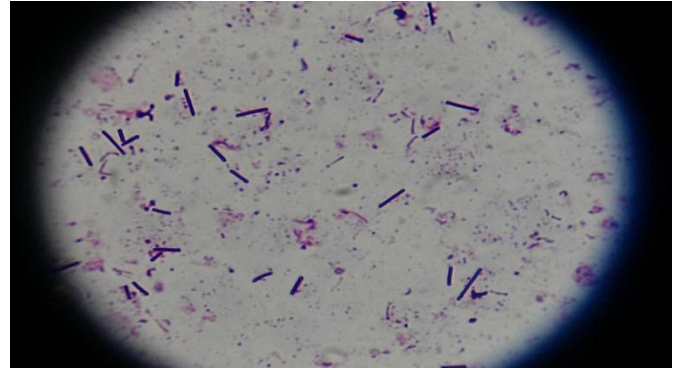
ANEXO 8. Control positivo en carne de cerdo y res



7. **Recuento:** De las siembras de las diluciones, se toma las placas que contengan entre 30 ± 10 colonias negras y calcular el número de UFC/gr muestra (contar rápidamente antes que las colonias empalidezcan).



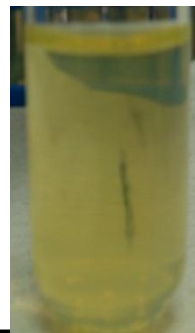
8. **Identificación:** Tomar como mínimo 5 colonias bien aisladas, pinchar en el centro y hacer un frotis tinción de Gram y observar los bacilos. Si NO es posible la identificación, enriquecer las colonias en caldo de tioglicolato, incubar del 16-18h a 46°C sembrar por estría en agar SPS e incubar nuevamente a 46°C 18h y repetir desde el paso 5.



9. Pruebas Bioquímicas

Prueba de motilidad: Positiva para *Clostridium spp.*, crece fuera de la zona de picadura. Negativa para *Clostridium perfringens*, crece solo en la zona de picadura del medio.

Prueba de indol: Positivo para *Clostridium spp.*, coloración rosada. Negativa para *Clostridium perfringens* color amarillo.





ANEXO 9. Patrón Mc Farland

- H_2SO_4 0.18M al 1%
 - $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.048M 1%
- 0.05ml $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 9.95ml H_2SO_4
equivale a 1.5×10^8 UFC/ml

• Preparación del patrón McFarland

- H_2SO_4 0.18M al 1%
Riqueza: 95-97%
Densidad: 1.84g/l
PM: 98g

$$M = \# \text{ moles por cada litro de solución} = \frac{\text{gr de soluto}}{\text{PM de soluto} \times L \text{ de disolución}}$$

$$\text{gr de soluto} = 0.18M \times 98 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 0.1l$$

gr de soluto= 1.764 g de soluto en una riqueza del 96%

gr de soluto= 1.837 g de soluto en una riqueza del 100%

$$d = \frac{m}{v} \quad V = \frac{m}{d}$$

$$v = \frac{1.83}{1.84} = 0.99 \text{ ml de } \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ en } 100 \text{ ml}$$

- $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.048M 1%
PM: 244g/mol

$$\text{gr de soluto} = 0.048M \times 244 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 0.1l = 1.17g \text{ de } \text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \text{ en } 100\text{ml}$$

- Mezcla del patrón:
0.05 ml de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.048M + 9.95 ml de H_2SO_4 0.018M

Leído a una longitud de onda de 625nm y
absorbancia de 0.092



ANEXO 10. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 559 18:2013 Control microbiológico de los alimentos Clostridium perfringens. Recuento en tubos por siembra en masa.

CDU: 614.31 :579.672 :579.85
ICS: 77.100.30



CIU: 9320
AL 01.05-315

<p>Norma Técnica Ecuatoriana Voluntaria</p>	<p>CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS CLOSTRIDIUM PERFRINGENS RECuento EN TUBO POR SIEMBRA EN MASA</p>	<p>NTE INEN 1529-18:2013 Primera revisión 2013-09</p>
<p style="text-align: center;">1. OBJETO</p> <p>1.1 Esta norma establece el procedimiento a seguir para el recuento en tubo por siembra en masa para determinar el número de células viables de <i>Clostridium perfringens</i>, presentes en un gramo o centímetro cúbico de muestra de alimento.</p> <p style="text-align: center;">2. ALCANCE</p> <p>2.1 Este método es útil para situaciones en que se requiera de un método rápido y altamente selectivo</p> <p style="text-align: center;">3. DEFINICIONES</p> <p>3.1 Para los efectos de esta norma, se adoptan las siguientes definiciones:</p> <p>3.1.1 <i>Clostridium perfringens</i>. Es una especie bacteriana del género <i>Clostridium</i>, que tiene forma bacilar, inmóviles, esporulados, con espora central o subterminal, capsulados, Gram. positivos, crece abundantemente a 43-47°C. Las esporas son resistentes al calor, frío y antisépticos.</p> <p>3.1.2 Recuento de <i>Clostridium perfringens</i>. Es la determinación del número de células viables de <i>Ci. Perfringens</i> que, a partir de un gramo o cm³ de alimento, se desarrollan sobre medios selectivos.</p> <p style="text-align: center;">4. MÉTODO DE ENSAYO</p> <p>4.1 Fundamento</p> <p>4.1.1 Este método se basa en tres características importantes del <i>Clostridium perfringens</i>: alta tolerancia a la polimixina y neomicina, poder reductor del sulfito y su crecimiento óptimo a 44°C. La utilización de estas características para el cultivo primario toma innecesario realizar pruebas confirmatorias adicionales.</p> <p>4.1.2 Para efecto de esta norma, se utiliza la técnica de recuento en tubos y el agar TSN que es altamente selectivo para el <i>Clostridium perfringens</i>. Utilizar el agar-triptosa-sulfito-cicloserina, TSC, para el cultivo de clostridios lesionados por el calor o el frío.</p> <p>4.2 Reactivos y medios de cultivo</p> <p>4.2.1 Requisitos básicos. Para que haya uniformidad en los resultados, es necesario que los componentes de los medios sean de una calidad uniforme y de grado analítico o, a su vez, se debe utilizar medios completos deshidratados, reconstituir y utilizarlos según las instrucciones del fabricante.</p> <p>4.2.1.1 Composición y preparación de los medios de cultivo y reactivos. Ver NTE INEN 1529-1.</p> <p>4.2.1.2 Agar TSN</p> <p>4.2.1.3 Agar triptosa-sulfito-cicloserina TSC</p> <p>4.2.1.4 Agar peptona 0,1%</p> <p>4.2.1.5 Medio SIM</p> <p style="text-align: right;">(Continúa)</p> <hr/> <p>DESCRIPTORES: Microbiología de los alimentos, control microbiológico, clostridium perfringens.</p>		

**4.2.1.6 Reactivo de Kovacs****4.2.1.7 Tubo para el diagnóstico de *Cl. Perfringens* (CPT)****4.2.1.8 Medio sioglicolato fluido****4.2.1.9 Vaselina líquida**

4.2.2 Materiales. La vidriería y utensilios que se utilicen en los ensayos deben ser de material inerte y resistente a esterilización repetidas, además, deben estar perfectamente limpios y estériles.

4.2.2.1 Pipetas bacteriológicas de boca ancha graduadas en 1/10 de cm³.**4.2.2.2 Tubos de ensayo de 22 mm x 200 mm****4.2.2.3 Tubos de ensayo de 12 mm x 120 mm****4.2.2.4 Frascos con tapa de rosca para muestra****4.2.2.5 Jarras anaeróbicas o cualquier otro equipo adecuado para cultivo anaeróbico****4.2.2.6 Incubador 46°C****4.2.2.7 Contador de colonias****4.3 Preparación de la muestra****4.3.1 Tomar las muestras según la NTE INEN 1529-2**

4.3.2 Las unidades de muestras perecederas que llegan al laboratorio deben mantenerse en refrigeración, entre 5°C ± 3°C, por no más de 24 h. En general, las muestras deben mantenerse en las condiciones adecuadas al producto, hasta el momento del examen.

4.3.3 La unidad analítica debe provenir de una muestra de por lo menos 100 g y ser preparada según la NTE INEN 1529-2.

4.4 Procedimiento**4.4.1 Siembra**

4.4.1.1 En tubos que contengan agar TSN fundido y temperado entre 44°C a 47°C, de cada dilución decimal, pipetear por duplicado volúmenes de 1 cm³, introduciendo la pipeta hasta el fondo y dejando caer la muestra al retirar la pipeta con movimiento helicoidal ascendente. Utilizar una nueva pipeta estéril para cada dilución.

4.4.1.2 Poner los tubos en pie en un baño de agua fría para que el agar se solidifique rápidamente.

4.4.1.3 Cubrir la siembra con una capa de vaselina líquida estéril de 1 cm de espesor (vaselina-parafina, agar al 2%, parafina) o poner los tubos en una jarra anaeróbica.

4.4.1.4 Incubar a 46°C por 16h a 18 h.

4.4.2 Recuento de colonias

4.4.2.1 Elegir los dos tubos de la dilución que contengan entre 30 ± 10 colonias negras, contarlas y calcular el número de unidades formadoras de colonias (células vegetativas y esporos) por gramo o centímetro cúbico de alimento. Cuando la siembra ha sido en placas, realizar el recuento inmediatamente después de abrirlas, antes que las colonias empalidezcan.

4.4.2.2 Si parte de los tubos están completamente ennegrecidos y es difícil contar las colonias aisladas características, hacer el recuento en los dos tubos de la dilución inmediata más alta y, aun cuando el número sea menor de 15, anotar la media aritmética de estos dos valores.

(Continúa)



4.4.2.3 Si todos los tubos contienen más de 40 colonias, contar en los tubos inoculados con la dilución más alta.

4.4.2.4 Si no hay desarrollo de colonias características en los tubos sembrados con muestras no diluidas (líquidas) o con la suspensión inicial (10^{-5}), anotar: "no se observan las colonia"

4.4.3 Pruebas confirmatorias

4.4.3.1 Selección y purificación de colonias

- De las colonias sospechosas contadas de 4.4.2, seleccionar al azar, las bien aisladas, en un número equivalente a la raíz cuadrada del total, con un mínimo de cinco, evitando cualquier roce, tocar en el centro de cada una de éstas y hacer un frofís; tefirlo por el método de Gram y verificar la presencia de sólo bacilos Gram positivos, rectos de extremos romos, solos o agrupados en pares, de $0,6$ a $2,4\mu\text{m}$ x $1,3$ a $19,0\mu\text{m}$: esporos grandes, ovales, centrales o subterminales y la célula distendida (en condiciones normales de cultivo raramente esporulan). Continuar con el numeral 4.4.4 para verificar la no producción de indol en movilidad
- Si no es posible seleccionar colonias sospechosas bien aisladas, elegir cinco colonias e inocularlas individualmente en tubos que contengan fioglicolato fluido.
- Incubar los tubos en anaerobiosis a 46°C durante 16h a 18 h.
- De este sub-cultivo, con un asa, sembrar en estria sobre la superficie seca de placas de agar TSC e incubarlas en anaerobiosis a 46°C durante 16h a 18 h.
- De cada placa, seleccionar por lo menos, una colonia típica bien aislada y confirmarla según 4.4.4.

4.4.4 Prueba de movilidad y producción de indol

4.4.4.1 Con una aguja de cultivo y haciendo una picadura profunda en el tubo de diagnóstico CPT, sembrar individualmente cada una de las colonias purificadas (4.4.3.1). El tubo CPT contiene tres capas de medio de cultivo de 2 cm de alto cada una, la del fondo es de agar TSN o TSC, la del medio de agar-agar y a la superior de medio SIM

4.4.4.2 Poner los tubos sembrados en jarras anaeróbicas e incubarlos a 46°C durante 16 a 24 h.

4.4.4.3 Lectura de la movilidad: ver el y tipo de crecimiento a lo largo de la línea de siembra. Si el crecimiento es difuso, fuera de la línea de picadura, la movilidad es positiva. El *Cl. Perfringens* es inmóvil, crecerá solo a lo largo de la picadura sin extenderse fuera de ella.

4.4.4.4 Lectura de la prueba del indol: cubrir la superficie del medio con unas gotas de reactivo de Kovacs. El aparecimiento de un color púrpura indica una reacción positiva. El *Cl. Perfringens* produce reacción negativa.

4.4.5 Interpretación

4.4.5.1 Considerar como *Cl. Perfringens* a aquellas bacterias que producen reacción negativa.

4.5 Cálculos

4.5.1 Colonias típicas

4.5.1.1 Productos diluidos: si al sembrar 1 cm^3 de las diluciones solo se desarrollan colonia típicas, calcular el número (N) de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo o centímetro cúbico de muestra mediante la siguiente ecuación:

$$N = n \times f \quad (1)$$

En donde:

n = media aritmética de colonias contadas

f = factor de dilución (valor inverso de la dilución de la muestra)



4.5.1.2 Productos líquidos no diluidos: Cuando se siembran alícuotas de 1 cm³ de productos líquidos no diluidos la ecuación que se aplica es:

$$N = n \quad (2)$$

4.5.1.3 Colonias atípicas: cuando se realizan pruebas complementarias, calcular N basándose en el número de las colonias atípicas confirmadas en relación al número total de las colonias atípicas contadas.

4.5.1.4 Productos diluidos: por ejemplo, si al sembrar 1,0 cm³ de la dilución 10⁻² de la muestra, en uno de los tubos se desarrollan 25 colonias típicas t en el otro, 20; del tubo que contiene las 25, seleccionar cinco colonias y someterlas a confirmación. Si de éstas, todas fueren bacilos Gram positivos, inmóviles e indol negativos, considerar a las 25 colonias como de *Cl. Perfringens*. Si tres de las cinco colonias seleccionadas del tubo que contiene las 20, también presentaren estas características, considerar como de *Cl. Perfringens* a 12 colonias.

Cálculo:

$$n_c = \frac{C \times CT}{C_s} \quad (3)$$

En donde:

- CT = número total de colonias atípicas contadas
- C_s = número de colonias atípicas sometidas a confirmación;
- C = número de colonias atípicas confirmadas;
- n_c = número total calculado de colonias atípicas confirmadas

Aplicando la fórmula al ejemplo presentado se tiene que

$$n_c = \frac{3 \times 20}{5} = 12 \quad (4)$$

$$n_c = \frac{3 \times 20}{5} = 12 \quad (5)$$

La media aritmética n es:

$$\frac{25 + 12}{2} = 18,5 \quad \text{redondear a 18 (NTE INEN 52)} \quad (6)$$

$$N = n_c \times f \quad (7)$$

$$N = 18 \times 100 \quad (8)$$

$$N = 1800 \quad \text{expresar como } 1,8 \times 10^3 \quad (9)$$

4.5.1.5 Productos líquidos no diluidos: Cuando se siembran alícuotas de 1 cm³ de productos líquidos no diluidos la ecuación que se aplica es:

$$N = n_c \quad (10)$$

(Continúa)

5. INFORME DE RESULTADOS

5.1 Expresar el resultado como *N* de UFC de *Cl. Perfringens*/g o *cm*³ de producto, utilizando solo dos cifras significativas multiplicadas por 10ⁿ, donde n es la correspondiente potencia de 10. Ejemplo:

$$\frac{N_{\text{de UFC de Cl Perfringens}}}{g \text{ o } cm^3} = 1,8 \times 10^3$$

5.2 Si en los tubos de la dilución inicial (10⁻¹) no hay colonias típicas, expresar el resultado como número estimado (*N*_E), de la siguiente manera:

$$\frac{N_{\text{E de UFC de Cl Perfringens}}}{g \text{ o } cm^3} = < 1,0 \times 10^1$$

5.3 Si no hay colonias características en los tubos sembrados con 1 *cm*³ de muestra no diluida (producto original líquido), expresar el resultado de la siguiente manera:

$$\frac{N_{\text{E de UFC de Cl Perfringens}}}{g \text{ o } cm^3} = < 1,0 \times 10^0$$

5.4 En el informe del ensayo, indicar la norma de referencia, temperatura de incubación, resultados obtenidos, todas las condiciones operativas no especificadas en esta norma aquellas consideradas como opcionales y los incidentes que puedan haber influenciado en el resultado. Además, se debe incluir toda la información necesaria para la completa identificación de la muestra.

(Continúa)



ANEXO 11. Bacteriological Analytical Manual (BAM)

BAM: *Clostridium perfringens*

January 2001

Bacteriological Analytical Manual Chapter 16 *Clostridium perfringens*

Authors: E. Jeffery Rhodehamel (ret.) and Stanley M. Harmon (ret.)

Plate count of viable *Clostridium perfringens*. Using aseptic technique, place 25 g food sample in sterile blender jar. Add 225 ml peptone dilution fluid (1:10 dilution). Homogenize 1-2 min at low speed. Obtain uniform homogenate with as little aeration as possible. Using 1:10 dilution prepared above, make serial dilutions from 10^{-1} to 10^{-6} by transferring 10-90 ml peptone dilution fluid blanks. Mix each dilution thoroughly by gently shaking before each transfer.



ANEXO 12. Certificado de aprobación de la Tesis “Determinación de *Clostridium perfringens* en la Empresa ITALIMENTOS CIA. LTDA “



Cuenca, a 28 de abril del 2015

Yo, Ing. Javier Moscoso Calle, Jefe de Gestión y Aseguramiento de Calidad de Alimentos La Italiana, en calidad de tutor

CERTIFICO

Que las Señoritas Verónica Catalina Rodas Bravo con CI: 0104162110 y María Gabriela Rodríguez Coronel con CI: 0105837710, estudiantes egresados de la Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas, Escuela de Bioquímica y Farmacia, realizaron en las instalaciones de ITALIMENTOS CIA, LTDA., la tesis denominada “Determinación de *Clostridium Perfringens* en materia prima cárnica en la empresa ITALIMENTOS CIA. LTDA”, cumpliendo satisfactoriamente los objetivos planteados inicialmente.

Es todo lo que puedo afirmar en razón a la verdad, pudiendo las estudiantes tesisistas dar uso en lo que mejor le convenga.

Ing. Javier Moscoso Calle

JEFE DE GESTIÓN Y ASEGURAMIENTO DE CALIDAD.