

Prevalencia de *Clostridium perfringens* en carnes y embutidos comercializados en Tegucigalpa, Honduras

Miriam Esther Arias Ortez, Silvia Pineda Alvarado,
Blanca Rosa Lavaire Carranza, Edgardo Tzoc Ramírez¹

RESUMEN

Este es un estudio de tipo cualitativo-descriptivo realizado con el objetivo de evaluar la calidad microbiológica de diferentes productos cárnicos, entre estos carne fresca molida de res o cerdo, embutidos procesados industrialmente como mortadela, jamón, salchichas, copetines, etc. y también de productos embutidos procesados artesanalmente como el chorizo criollo.

Se recolectaron 106 muestras en diferentes mercados y supermercados de la capital durante los meses de noviembre de 2012 a abril de 2013. Las muestras fueron analizadas por el método de recuento en placa para obtener el número de unidades formadoras de colonia por gramo de muestra (UFC/g) de *Clostridium perfringens*. Además se realizó el ensayo PET-RPLA para la detección de la enterotoxina causante de toxiinfección alimentaria.

Los resultados del análisis demuestran una prevalencia significativa (36.8 %), especialmente en los productos obtenidos en los mercados de la capital (52.7 %). De estos, los que presentaron los mayores recuentos fueron las carnes frescas y los embutidos artesanales, con niveles de hasta 1×10^5 ufc/g y 8.9×10^3 ufc/g, respectivamente. De acuerdo a estos resultados concluimos que estos productos representan un riesgo para la salud de los consumidores por cuanto la contaminación encontrada excede por mucho los valores de referencia consultados (10^2 /g).

Palabras clave: *clostridium perfringens*, embutidos, carne molida, calidad microbiológica.

¹ Profesores universitarios beneficiarios de una beca sustantiva de la DICYP. Sección de Bacteriología, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, UNAH: etzoc2000@yahoo.com

ABSTRACT

A descriptive-qualitative study was carried out in order to evaluate the microbiological quality of meat and processed meat products, specially ground beef, ground pork, sausages, ham, and traditional uncooked meat products (chorizo). One hundred and six samples were collected from markets and supermarkets located in Tegucigalpa, from november 2012 to april 2013. All samples were analyzed by standard plate count method for enumeration of *Clostridium perfringens* colony forming unit / gram (cfu/g). A subset of samples were also tested for enterotoxin production using PET-RPLA comercial kit, responsable of food poisoning. Results showed a significant prevalence (36.8 %), specially in samples from city markets (52.7 %). Fresh ground beef and traditional uncooked meat products showed levels of contamination as high as 1×10^5 cfu/g and 8.9×10^3 cfu/g respectively. According to our results, these products present a risk for consumers since they highly exceed reference guidelines for *C. perfringens* in meat products (10^2 /g).

Key words: *clostridium perfringens*, meat products, ground beef, sanitary quality.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones gastrointestinales pueden tener diversa etiología: parasitaria, bacteriana y viral. De estas, las infecciones bacterianas cuentan por el 99 % de los casos informados en el país y el 92 % con etiología desconocida (Kopper, Calderón, Schneider, Gutiérrez y Domínguez, 2009). En el caso de los clostridios, han sido reconocidos como causantes de ETA desde ya hace muchos años, sin embargo, la dificultad de su análisis incide en una baja prevalencia debido a un subregistro de los casos de infección causados por estas bacterias.

Clostridium perfringens es una especie ubicua en la naturaleza, especialmente en el suelo y el agua de donde fácilmente puede ser adquirida por los animales o contaminar hortalizas. En diversos países (Canadá y Estados Unidos) esta bacteria se encuentra entre las causas más comunes de intoxicación alimentaria, siendo las carnes inadecuadamente cocidas los principales vehículos de transmisión (Johnson, Summanen y Finegold, 2007). Es una bacteria comúnmente encontrada en el ambiente y puede ser aislada fácilmente del intestino de aves y animales; de hecho, los animales domésticos son fuentes conocidas de transmisión al ser humano, especialmente a través de alimentos de origen animal como la carne y sus derivados.

Dentro de la variedad de infecciones que causa en el ser humano están la gangrena gaseosa, la enteritis necrotizante, la diarrea asociada a antibióticos y más comúnmente la intoxicación alimentaria. Esta última es la tercera de importancia en su tipo en los Estados Unidos por el número de casos, con 250,000 anuales aproximadamente y 7 casos fatales.

En el Reino Unido el número de casos fatales es bastante más alto con 50 a 100 casos. En Finlandia, *C. perfringens* es la causa del 20 % de todos los brotes de ETA registrados durante 25 años (1975-1999), registrando un total de 6,900 casos en 298 brotes.

Algunos estudios demuestran que hasta un 31 % de los alimentos vendidos al detalle se encuentran contaminados, siendo la carne molida de cerdo la que presentó un mayor porcentaje de positividad (66 %). Aunque ninguno de los alimentos analizados fue implicado en casos o brotes de intoxicación, sí se demuestra la necesidad de establecer medidas de control que aseguren la inocuidad de los alimentos (Baldassi, 2005).

Desafortunadamente, la vigilancia epidemiológica de las ETA y más aun de la

calidad sanitaria de los alimentos en nuestro país deja un gran vacío de información, ya que las autoridades de salud no realizan una adecuada labor de control y vigilancia. La extensión del problema se agrava en vista de la poca capacidad analítica instalada en los laboratorios públicos nacionales.

En nuestro país no existe un sistema de recolección de información acerca de la calidad microbiológica de los alimentos destinados al consumo humano. La información conocida se obtiene de datos extrapolados y corregidos obtenidos a partir de los subregistros en el sistema de salud público y privado.

Los mayores esfuerzos actualmente se realizan con respecto a la evaluación de la calidad de productos alimenticios de origen animal y vegetal destinados a la exportación, más que todo por exigencias impuestas por los países destinatarios para beneficio de la salud de sus consumidores.

Esto trae beneficio inmediato a nuestro país por la generación de divisas derivadas de la exportación de estos productos. Sin embargo, los alimentos destinados a consumo interno no son objeto de un adecuado control microbiológico.

Con este estudio se genera nueva información al utilizar el recuento de *C. perfringens* como un indicador de la calidad microbiológica de productos cárnicos, especialmente aquellos que son sometidos a procesos térmicos para su elaboración o también como un indicador del proceso de obtención de la carne en las plantas procesadoras.

MÉTODO

La presente es una investigación aplicada en el campo de la microbiología de alimentos. Es un estudio de tipo descriptivo, ya que se describe y documenta la prevalencia de *C. perfringens* como contaminantes en carne cruda y en productos cárnicos listos para su consumo.

El estudio se realizó en muestras de carne, embutidos y chicharrón molido recolectadas en supermercados y mercados donde se comercializan estos productos, de la ciudad de Tegucigalpa y Comayagüela, departamento de Francisco Morazán, Honduras; durante el periodo comprendido entre noviembre de 2012 y abril de 2013. Se hizo un muestreo no aleatorio, recolectándose 106 muestras.

Para el recuento de *Clostridium perfringens* se utilizó el método descrito por Rhodehamel y col. en el Manual de Bacteriología Analítica (BAM) de la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos (Rhodehamel y Harmon, 2001). Con técnica aséptica se colocaron 25 gramos de la muestra en una licuadora y se agregaron 25 ml de agua peptonada (dilución 1:10). Se hicieron diluciones seriadas decimales desde 10^{-1} hasta 10^{-6} . Se inocularon por duplicado en placas de agar TSC (triptosa sulfito cicloserina). Se incubaron a 35 °C por 24 horas. El recuento se hizo en las placas que contenían entre 20-200 colonias con el siguiente aspecto: negras rodeadas de un halo de precipitado blanco. Como método de respaldo, alternativamente se inocularon de 3 a 4 tubos de medio de carne picada y se incubaron en atmósfera normal por 24-48 horas a 35 °C.

Para la identificación presuntiva se seleccionaron colonias típicas y se inocularon en tubos de caldo tioglicolato fresco, recién desoxigenado y enfriado. Se incubaron en atmósfera normal por 18-24 horas a 35 °C. Se examinó cada tubo por coloración de Gram, revisando la pureza. Se realizó la prueba de coagulación de la leche, inoculando tubos de medio Iron Milk modificado con 1 ml del caldo tioglicolato. Se incubaron a 46 °C en baño de agua. Después de 2 horas se revisaron por la característica fermentación de *C. perfringens* (rápida coagulación y fragmentación del cuajo) antes de 5 horas.

En la identificación confirmatoria se realizó la prueba de esporulación. Se inocularon tubos de caldo para esporulación a partir de los tubos de caldo tioglicolato. Se incubaron por 72 horas a 35 °C, se les hizo coloración de Gram y se examinaron microscópicamente para observación de esporas. Luego se les realizó identificación bioquímica usando el sistema RapID ANA II de REMEL®, siguiéndose las instrucciones del fabricante.

Para la producción de enterotoxina, del sobrenadante del caldo tioglicolato se realizaron pruebas para la detección de la enterotoxina. Estas se hicieron usando el kit PET-RPLA de Oxoid®. Se siguieron las instrucciones del fabricante.

El análisis de los resultados se realizó utilizando los métodos de la estadística descriptiva con Microsoft Excel, 2010. Este programa se eligió para realizar el análisis de las medidas de tendencia central: frecuencias, rango, moda y media. Se seleccionó la hoja de cálculo de Excel para los análisis estadísticos debido a la accesibilidad, además porque permite la introducción sencilla de la información, capacidad gráfica muy variada y análisis estadísticos.

Para la identificación definitiva de las cepas aisladas, usando el sistema RapID ANA II, se utilizó el software ERIC, el cual es una base de datos electrónica para

Windows, con acceso a través del internet. Este software permite la identificación a nivel de especies basado en la probabilidad expresada en porcentaje. Además permite conocer la biodiversidad de las cepas aisladas mediante la generación de un código.

RESULTADOS

En total se analizaron 106 muestras de diversos productos cárnicos para la determinación del recuento de *Clostridium perfringens*. De estas, 47 muestras pertenecen a productos cárnicos que reciben algún tipo de procesamiento, 30 artesanales y 17 industriales. Para efectos del estudio se consideraron como productos cárnicos procesados artesanales: el chorizo en tripa, el chorizo suelto y el chicharrón molido. Los productos procesados industrializados son del tipo embutido: mortadela, jamón, copetines, etc. El resto de las muestras son de carne molida fresca (de res o cerdo).

De acuerdo al punto de recolección de la muestra, tenemos que 32 fueron obtenidas en diferentes supermercados de la ciudad y de los mercados se obtuvieron 74 muestras. En general, estos productos son de gran demanda por la población general y como tal brindan una buena relación del posible riesgo por contaminación microbiana.

Los resultados de los análisis demuestran una contaminación significativa, especialmente para los productos que se expenden en los mercados de la capital. En el caso del recuento de *C. perfringens* más de la mitad de las muestras (39/74), que representan casi un 53 %, resultaron contaminadas con esta bacteria. Por otro lado, las muestras tomadas en los supermercados resultaron libres de contaminación (ver tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de aislamientos positivos por lugar de muestreo, noviembre 2012 - abril 2013, Tegucigalpa

Lugar de muestreo	No. de muestras analizadas	No. de muestras positivas por <i>C. perfringens</i>	%
Supermercados	32	0	0
Mercados	74	39	52.7
Total	106	39	36.8

Tomando en cuenta el nivel de contaminación, en la tabla 2 se observan algunas

medidas de tendencia central que indican este aspecto. El promedio de ufc/g es bastante alto, (10^4), con un rango tan bajo como 100 ufc/g y hasta niveles bastante peligrosos para la salud (10^5). Asimismo, estos niveles de contaminación inciden en el no cumplimiento de acuerdo a las normas consultadas, en el caso de las muestras tomadas en los mercados. El 39 % de estas se encuentran por sobre el límite recomendado, que es de $< 10^2$ ufc/g, pero solamente el 1.3 % incumple con el valor de referencia que normalmente se considera como asociado a casos de intoxicación alimentaria ($> 10^5$ ufc/g). El 100 % de las muestras tomadas en el supermercado sí cumplen con estos parámetros (ver tabla 3).

Tabla 2. Medidas de tendencia central para el recuento de *C. perfringens*, por tipo de producto analizado, noviembre 2012 - abril 2013, Tegucigalpa

Lugar de muestreo	No. de muestras analizadas	Promedio ufc/g*	Rango ufc/g	Moda ufc/g
Supermercados	32	< 100	-	-
Mercados	74	1.1×10^4	100 - 1×10^5	100

*ufc/g: unidades formadoras de colonia por gramo de muestra

Tabla 3. Porcentaje de muestras dentro del límite recomendado para el recuento de *C. perfringens* en productos cárnicos por sitio de muestreo, noviembre 2012 - abril 2013, Tegucigalpa

Lugar de muestreo	No. de muestras analizadas	No. de muestras positivas por <i>C. perfringens</i>	N (%) de muestras relevantes de acuerdo a	
			Valor norma	Valor de referencia
Supermercados	32	0	0 (0)	0 (0)
Mercados	74	39	32 (43)	1 (1.3)
Total	106	39	32 (30)	1 (1)

Los resultados por tipo de muestra también indican resultados interesantes. Los embutidos procesados industrialmente apenas muestran un 5.9 % de muestras contaminadas (una muestra de copetín tomada en un mercado) y, por otro lado, las muestras de productos embutidos artesanales y la carne molida fresca muestran niveles similares de contaminación: 46.7 % y 40.7 %. Lógicamente, el nivel de contaminación es notoriamente más alto para la carne molida fresca y para los embutidos artesanales, con promedios arriba de 10^3 y 10^4 , respectivamente, así como con rangos de entre 100 hasta casi 9×10^3 ufc/g para los cárnicos artesanales y de 100 ufc/g a 1×10^5 ufc/g para la carne molida (ver tablas 4 y 5).

Tabla 4. Porcentaje de aislamientos positivos por tipo de producto analizado, noviembre 2012 - abril 2013, Tegucigalpa

Lugar de muestreo	No. de muestras analizadas	No. de muestras positivas por <i>C. perfringens</i>	%
Carne procesada industrial	17	1	5.9
Carne procesada artesanal	30	14	46.7
Carne fresca	59	24	40.7
Total	106	39	36.8

Tabla 5. Medidas de tendencia central para el recuento de *C. perfringens*, por tipo de producto analizado, noviembre 2012 - abril 2013, Tegucigalpa

Tipo de producto	No. de muestras	Promedio ufc/g*	Rango ufc/g	Moda ufc/g
Carne procesada industrial	17	100	<100-100	100
Carne procesada artesanal	30	2.5×10^3	100 - 8.9×10^3	100
Carne fresca	59	1.6×10^4	100 - 1×10^5	2.1×10^3

*ufc/g: unidades formadoras de colonia por gramo de muestra

Con respecto a los resultados de cumplimiento de las normativas se puede observar que igualmente la carne fresca molida y los cárnicos artesanales están casi en niveles similares de muestras analizadas (37 % y 33 %), se encuentran por sobre la norma recomendada, lo cual es un claro indicador de riesgo para la población consumidora (ver tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de muestras dentro del límite recomendado para el recuento de *C. perfringens* por tipo de producto, noviembre 2012 - abril 2013, Tegucigalpa

Tipo de producto	No. de muestras analizadas	No. de muestras positivas por <i>C. perfringens</i>	N (%) de muestras relevantes de acuerdo a	
			Valor norma	Valor de referencia
Carne procesada industrial	17	1	0 (0)	0 (0)
Carne procesada artesanal	30	14	10 (33)	0 (0)
Carne fresca	59	24	22 (37)	1 (1.7)
Total	106	39	32 (30)	1 (1)

DISCUSIÓN

Los clostridios son bacterias ubicuas en la naturaleza y de ahí la razón por la cual se encuentran comúnmente como contaminantes en diferentes ambientes, inclusive muchas especies forman parte de la flora normal del ser humano. Sin embargo, esto no significa que deba permitirse su presencia en números altos en los alimentos. Las normas nacionales vigentes indican un valor máximo de hasta 100 ufc/g de muestra, aunque por otro lado, algunos autores indican una dosis infecciosa de entre 10^5 a 10^8 ufc/g de muestra como significativa y relacionada con la aparición de casos y brotes de gastroenteritis por *C. perfringens* (Rood y Cole, 1991).

Los resultados obtenidos para el recuento de *C. perfringens* muestran el nivel de riesgo para el consumidor que representan el tipo de productos analizados; de estos, la carne molida presenta los mayores niveles de contaminación alcanzando, inclusive, en una de las muestras, el número que se asocia a la aparición de enfermedad.

Es de hacer notar que esos criterios aplican a productos terminados y en este caso nos referimos a carne cruda, la cual va a ser sometida a un proceso de cocción previo a su consumo. En este sentido, los embutidos industriales listos para su consumo serían los de mayor riesgo, sin embargo, fueron los que resultaron libres de contaminación en su mayoría, apenas una muestra de diecisiete resultó contaminada y con un recuento de 100 ufc/g, lo cual está dentro de la norma vigente. Esto es lógico si tomamos en cuenta que en su elaboración llevan un proceso térmico que elimina gran parte de la flora bacteriana presente. Además, tienen aditivos como los nitritos que actúan especialmente contra especies del género *Clostridium* (James, 2000).

En contraste, en Costa Rica en un estudio realizado en embutidos, obtuvieron porcentajes significativos entre 12 a 28 % de muestras contaminadas para salchichón y mortadela (Morera, Rodríguez y Gamboa, 1999). No obstante, para productos artesanales en este mismo estudio encontraron porcentajes tan altos como 92 % para chorizo, con valores promedio de hasta 10^4 ufc/g y con rangos hasta de 10^5 ufc/g muy similares a los obtenidos en nuestra investigación, pero para los productos cárnicos procesados de origen artesanal.

En ambos casos esto se explica por la extensa manipulación a que son sometidos estos productos durante el proceso de elaboración, representando también un alto

riesgo su consumo, el cual se ve reducido por la adecuada preparación de estos productos.

Es interesante resaltar también el hecho que los productos que se expenden en los mercados son de una calidad sanitaria inferior a los que se expenden en los supermercados. Esto probablemente se debe a que los supermercados son abastecidos por proveedores que aseguran los mejores controles a lo largo de toda la cadena de producción, desde la salud de los hatos ganaderos, los procesos de sacrificio, destace, evisceración, corte y empaque de la carne. También los procesos de molido de la carne o de procesamiento para elaboración de embutidos que se realizan mediante sistemas estandarizados que garantizan la inocuidad, a diferencia de los productos que se venden en los mercados, los cuales tienen poco o ningún control. Todo esto incide en la calidad sanitaria del producto.

Rodríguez, Gamboa y Vargas (2002) evidenciaron este hecho al obtener resultados en donde se observó el aumento de la contaminación entre el producto fresco recién obtenido y el producto listo para su venta, después de haber pasado por todo el proceso de transporte y almacenamiento.

El mayor problema se presenta cuando los procesos de preparación, manipulación y almacenamiento de los productos o de los alimentos ya preparados no son los adecuados, permitiendo la multiplicación de los microorganismos desde unas pocas ufc/g hasta alcanzar los niveles entre 10^5 a 10^8 ufc/g que, como se mencionó anteriormente, están asociados a enfermedad.

Gutiérrez y otros (1999) en Costa Rica y Natividad-Bonifacio y otros (2010) en México, encontraron en alimentos preparados a base de carne listos para consumo una incidencia de entre 16 % a 46 % de productos contaminados (Natividad-Bonifacio y otros, 2010). El análisis de la capacidad de producción de la enterotoxina, involucrada en el cuadro de infección gastrointestinal por *C. perfringens*, resultó negativo en las cepas a las cuales se les hizo esta determinación. Esto puede deberse a que son cepas ambientales con baja virulencia raramente involucradas en procesos infecciosos. Sin embargo, la ausencia de la producción de toxina no necesariamente implica la ausencia del gen responsable de la misma y el riesgo de infección siempre existe, ya que cepas que poseen el gen lo expresan cuando la bacteria es sometida a repetidos choques térmicos frecuentes (Gutiérrez, Gamboa, Rodríguez y Arias, 1999).

CONCLUSIONES

Hasta el momento no se ha realizado en nuestro país la evaluación de productos alimenticios usando como indicador sanitario la *Clostridium perfringens*, en gran medida por la dificultad de su análisis. Este primer estudio demuestra que esta bacteria es un contaminante común de la carne y sus derivados y representa un riesgo grande para la salud de los consumidores. Las prácticas de manufactura tanto a nivel artesanal como industrial, las condiciones de almacenamiento y venta en mercados y supermercados son los principales factores que condicionan los niveles de contaminantes bacterianos en general y de *C. perfringens* en particular.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a la Dirección de Investigación Científica de la UNAH el financiamiento total de la presente investigación mediante la beca sustantiva 01-2012.

BIBLIOGRAFÍA

- Baldassi, L. (2005). Clostridial toxins potent poisons potent medicines. *J Venom Anim Toxin incl. Trop Dis*, 11(4), 391-411.
- Gutiérrez, A.; Gamboa, M.; Rodríguez, E. y 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. *Arch Latinoam Nutr.*, 49(3), 275-278.
- James, J.M. (2000). *Conservación de alimentos con sustancias químicas. Microbiología moderna de los alimentos*. España: ACRIBIA.
- Johnson, E.; Summanen, P. y Finegold, S. (2007). *Clostridium*. Manual of Clinical Microbiology. Washington: ASM Press.
- Kopper, G.; Calderón, G.; Schneider, S.; Gutiérrez, G. y Domínguez, W. (2009). *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Morera, J.; Rodríguez, E. y Gamboa, M. (1999). Determinación de *Clostridium perfringens* en embutidos de carne de cerdo del área metropolitana de Costa

- Rica. *Arch Latinoam Nutr.*, 49(3),279-281.
- Natividad-Bonifacio, I.; Vásquez-Quiñones, C.; Rodas-Suarez, O.; Fernández, F.; Rodríguez-Solís, E.; Quiñones-Ramírez, E. y otros. (2010). Detection of *Clostridium perfringens* in yearling lamb meat (barbacoa), head and gut tacos from public markets in México City. *Int J Environ Heal R.*, 20(3), 213-217.
- Rodríguez, E.; Gamboa, M. y Vargas, P. (2002). *Clostridium perfringens* en carnes crudas y cocidas y su relación con el ambiente en Costa Rica. *Arch Latinoam Nutr.*, 52(9),155-159.
- Reglamento Técnico Centroamericano. Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos. RTCA 67.04.50:08. Anexo de resolución No. 243-2009.
- Rhodehamel, E. y Harmon, S. (2001). *Clostridium perfringens*. Bacteriological Analytical Manual. Washington: Food and Drug Administration.
- Rood, J.I. y Cole, S.T. (1991). Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiol Rev.*, 55(4), 621–648.