



***EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DEL PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN
UTILIZADO EN UNA PLANTA DE BENEFICIO DE AVES UBICADA EN BOGOTÁ***

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

PROYECTO DE INVESTIGACION

BOGOTÁ D.C.

OCTUBRE DE 2018



***EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DEL PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN
UTILIZADO EN UNA PLANTA DE BENEFICIO DE AVES UBICADA EN BOGOTÁ***

PAULA FERNANDA OLIVEROS BETANCURT
KATHERINNE ANDREA MORENO BERMÚDEZ

LUCIA CONSTANZA CORRALES RAMÍREZ
ASESORA

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
PROYECTO DE INVESTIGACION
BOGOTÁ D.C.
OCTUBRE DE 2018

Dedicatoria

Especialmente a Dios porque me ha dado la fortaleza y sabiduría para cumplir otro de
mis proyectos de vida.

A mi familia por el apoyo brindado y la confianza que han depositado en mí, porque
gracias a ellos he logrado culminar esta importante etapa de mi vida profesional.

A mi compañera de tesis por su compañía y amistad durante toda la carrera.

Katherinne Andrea Moreno

A Dios por permitirme llegar a este momento tan importante de mi vida.

A mis padres porque ellos estuvieron siempre brindándome su apoyo y sus consejos
para hacer de mí una mejor persona.

A mis compañeras de estudio, amigas y colegas que estuvieron durante toda la
carrera brindándome su amistad y apoyo en nuestra formación profesional.

Paula Fernanda Oliveros Betancurt

Agradecimientos

A nuestra asesora, Mgs. Lucia Constanza Corrales Ramírez, por el tiempo dedicado, por compartir sus conocimientos y guiar nuestro trabajo con paciencia y compromiso.

A nuestra Universidad por prestarnos las instalaciones para el desarrollo de este proyecto.

A nuestros docentes quienes día a día dedican su tiempo para formarnos como profesionales íntegros.

Al gerente de esta industria y demás personas que permitieron la realización de este trabajo.

Tabla de contenido

1. Glosario.....	14
RESUMEN	16
2. Introducción	18
3. Objetivos	20
3.1 Objetivo general	20
3.2 Objetivos específicos	20
4. Antecedentes	21
5. Marco referencial	25
5.1 Principales patógenos en la carne de pollo.....	25
5.2 Desinfectante y características de un desinfectante ideal.....	27
5.3 Resistencia a desinfectantes.....	28
5.4 Rotación de desinfectantes	31
5.5 Factores que afectan los desinfectantes	32
5.6 Hipoclorito de sodio y su mecanismo de acción.....	33
5.7 Peróxido de hidrogeno y su mecanismo de acción	34
5.8 Método de dilución-neutralización	35
5.9 Relación de la resistencia bacteriana a antibióticos con la resistencia a los desinfectantes	36
5.10 Proceso de limpieza y desinfección de la planta de beneficio avícola evaluada 37	
5.10.1 Falencias detectadas en el proceso de limpieza y desinfección	37
5.11 Contaminación de la carne de ave en el proceso de producción	38
6. Marco legal	41
6.1 Normatividad Colombiana sobre la vigilancia de los productos cárnicos	41
7. Diseño metodológico.....	43
7.1 Tipo de investigación	43
7.2 Población de estudio	43
7.3 Muestra	43
7.4 Hipótesis	43

7.5	Variables	44
7.6	Puntos de muestreo	44
8.	Procedimiento	44
8.1	Aislamiento e identificación de los microorganismos presentes en las superficies.....	44
8.2	Preparación de suspensiones bacterianas y soluciones de prueba	45
8.3	Preparación de soluciones del producto que se somete a prueba	46
8.4	Procedimiento del método dilución/neutralización para verificar la actividad bactericida de los productos	47
8.5	Validación del método dilución/neutralización.....	48
8.6	Validación del neutralizante	48
8.7	Calculo de la disminución de la viabilidad.....	49
9.	Resultados	50
9.1	Aislamiento e identificación de los microorganismos presentes en las superficies.....	50
9.2	Recuento de la suspensión bacteriana de prueba	55
9.3	Método de dilución/neutralización para verificar la actividad bactericida de los productos	56
9.4	Validación del método dilución/neutralización.....	59
9.4.1	Preparación de la suspensión bacteriana y recuento para la validación del método (Nv).....	59
9.5	Validación del neutralizante	60
9.5.1	Control de toxicidad y control del método para validar el neutralizante.....	60
9.5.2	Valores obtenidos luego de aplicar las fórmulas descritas en la NTC 5150 de 2003	61
9.5.3	Recuentos viables para la mezcla de prueba (NA)	62
9.6	Reducción de la viabilidad bacteriana luego de estar en contacto con el desinfectante.....	64
10.	Discusión	66
11.	Conclusiones	77
12.	Referencias.....	79
13.	Anexos.....	87
13.1	Anexo 1. Diagramas de flujo del diseño metodológico.....	87

13.1.1 Aislamiento e identificación de los microorganismos presentes en las superficies	87
13.1.2 Preparación de suspensiones bacterianas y solución de los productos sometidos a prueba.....	88
13.1.3 Método de dilución-neutralización	90
13.1.4 Validación del método	91
13.1.5 Cálculo de la disminución de la viabilidad bacteriana.....	93
13.2 Anexo 2. Carta de solicitud de permiso para toma de muestras	94
13.3 Anexo 3. Protocolo de rotación de desinfectantes	95

Índice de figuras

Figura 1.	Tasa de contaminación bacteriana por fase del proceso de sacrificio según la FAO.	36
Figura 2.	Tanque de enfriamiento de vísceras.	47
Figura 3.	Canales de caída de vísceras.	47
Figura 4.	Empacador de víscera.	48
Figura 5.	Mesa de selección de producto.	48
Figura 6.	Banda transportadora de canales.	48
Figura 7.	Tanque 4 de enfriamiento de canales.	49
Figura 8.	Banda transportadora de vísceras.	49
Figura 9.	Canal de caída de pollo.	49
Figura 10.	Banda transportadora de pollo a tanque de pre-enfriamiento	50
Figura 11.	Descolgador de pollo.	50
Figura 12.	Aislamiento en agar nutritivo de bacilos Gram positivos a partir de la muestra tomada en las canales de caída de vísceras.	51
Figura 13.	Aislamiento en agar Mac Conkey de bacilos Gram negativos a partir de la muestra tomada del tanque de enfriamiento.	51
Figura 14.	Método de recuento de unidades formadoras de colonias.	55
Figura 15.	Disminución de la viabilidad bacteriana expresada en UFC/ml con hipoclorito de sodio a 5 minutos de contacto.	68
Figura 16.	Disminución de la viabilidad bacteriana expresada en UFC/ml con hipoclorito de sodio a 15 minutos de contacto.	70
Figura 17.	Disminución de la viabilidad bacteriana expresada en UFC/ml con peróxido de hidrogeno a 5 minutos de contacto.	71
Figura 18.	Disminución de la viabilidad bacteriana expresada en UFC/ml con peróxido de hidrogeno a 15 minutos de contacto.	72

Índice de tablas

Tabla 1.	Microorganismos indicadores que se deben incluir en el programa de verificación microbiológica según la resolución 2690 de 2015.	39
Tabla 2.	Puntos de muestreo y morfología observada mediante coloración de Gram.	47-50
Tabla 3.	Microorganismos identificados mediante el método BBL CRYSTAL.	51
Tabla 4.	Recuento de las suspensiones bacterianas de prueba.	52
Tabla 5.	Resultados del método de dilución/neutralización para verificar la actividad bactericida del hipoclorito de sodio y el peróxido de hidrogeno a los 5 minutos de contacto y 24 horas de incubación.	53
Tabla 6.	Resultados del método de dilución/neutralización para verificar la actividad bactericida del hipoclorito de sodio y el peróxido de hidrogeno a los 5 minutos de contacto y 48 horas de incubación.	54
Tabla 7.	Resultados del método de dilución/neutralización para verificar la actividad bactericida del hipoclorito de sodio y el peróxido de hidrogeno a los 15 minutos de contacto y 24 horas de incubación.	54
Tabla 8.	Resultados del método de dilución/neutralización para verificar la actividad bactericida del hipoclorito de sodio y el peróxido de hidrogeno a los 15 minutos de contacto y 48	55

	horas de incubación.	
Tabla 9.	Recuento de la suspensión bacteriana preparada a partir de la dilución 10^{-1} para la validación del método (Nv).	56
Tabla 10.	Control de toxicidad y control del método para validar el neutralizante.	57
Tabla 11.	Verificación de la metodología y validación del método.	58
Tabla 12.	Recuentos viables para el hipoclorito de sodio.	59
Tabla 13.	Recuentos viables para el peróxido de hidrogeno.	60
Tabla 14.	Reducción de la viabilidad bacteriana luego de estar en contacto con el hipoclorito de sodio.	61
Tabla 15.	Reducción de la viabilidad bacteriana luego de estar en contacto con el peróxido de hidrogeno.	62

Tabla de siglas

Significado	Sigla
Suspensión bacteriana utilizada en la prueba	N
Suspensión bacteriana utilizada en el proceso de validación	Nv
Control de la toxicidad del neutralizador	Nx
Control de dilución/neutralización	Ny
Número de UFC/ml en la suspensión de prueba	Na

1. Glosario

Beneficio de animales Conjunto de actividades que comprenden el sacrificio y faenado de animales para consumo humano¹.

Bactericida: Antimicrobiano que ejerce una acción letal para las bacterias².

Calidad Es el conjunto de propiedades y características de un producto, de un proceso o de un servicio¹.

Carne Es la parte muscular y tejidos blandos que rodean al esqueleto de los animales de las diferentes especies, incluyendo su cobertura de grasa, tendones, vasos, nervios, aponeurosis y que ha sido declarada inocua y apta para el consumo humano¹.

Carne contaminada Aquella que confiere sustancias o elementos naturales o artificiales, u organismos vivos extraños a su composición normal, adquiridos durante su sacrificio, almacenamiento y transporte, en tal magnitud o concentración que alteren sus características propias³.

Desinfección Es la destrucción de microorganismos en objetos inanimados, que asegura la eliminación de las formas vegetativa pero no la eliminación de esporas bacterianas⁴.

Desinfectante Agente químico utilizado en el proceso de desinfección de objetos, superficies y ambiente⁴.

Inocuidad Es la garantía de que un alimento no causará daño al consumidor cuando el mismo sea preparado o ingerido de acuerdo con el uso a que se destine¹.

Limpieza Es la eliminación por acción mecánica, con o sin uso de detergentes, de la materia orgánica y suciedad de superficies, objetos o ambiente. El agente básico para este proceso es el detergente⁴.

Planta de beneficio animal (matadero) Todo establecimiento en donde se benefician las especies de animales que han sido declarados como aptas para el consumo humano y que ha sido registrado y autorizado para este fin¹.



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA

*EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DEL PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN
UTILIZADO EN UNA PLANTA DE BENEFICIO DE AVES UBICADA EN BOGOTÁ*

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la efectividad del protocolo de desinfección utilizado en las diferentes superficies de una planta de beneficio avícola ubicada al sur de la ciudad de Bogotá, este se realizó a partir de 10 muestras tomadas de superficies que entran en contacto directo con el producto, a partir de estas se aislaron varios microorganismos y se seleccionaron *Bacillus licheniformis* y *Klebsiella oxytoca* para la aplicación del método de dilución neutralización propuesto en la norma técnica colombiana 5150 de 2003, el cual permitió valorar la actividad de dos sustancias desinfectantes, el hipoclorito de sodio y el peróxido de hidrogeno.

En los resultados obtenidos se observó que el hipoclorito de sodio presentó menor actividad bactericida en todas las concentraciones evaluadas, lo cual está relacionado

con el uso constante de esta sustancia en las actividades de desinfección de la planta, ya que al no aplicar protocolos de rotación de desinfectantes los microorganismos van creando mecanismos de defensa para resistir la acción de estos antimicrobianos; mientras que el peróxido de hidrógeno al 10 y 15 % en los dos tiempos de contacto presentó una mayor disminución de la viabilidad bacteriana, por tanto este fue incluido en el protocolo propuesto para optimizar los procedimientos actuales ya que demostró ser efectivo para ser utilizado en esta planta.

PALABRAS CLAVES

Desinfectante, viabilidad bacteriana, resistencia bacteriana, hipoclorito de sodio, peróxido de hidrogeno.

Estudiantes. Paula Fernanda Oliveros, Katherinne Andrea Moreno

Docente. Lucia Constanza Corrales Ramírez

Institución. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Fecha. 17 de agosto de 2018

2. Introducción

En la industria de los alimentos la elaboración y aplicación de un plan de saneamiento básico que incluya un programa de limpieza y desinfección, es indispensable para garantizar la calidad e inocuidad del producto final, lo cual se ve reflejado en la salud de los consumidores, ya que cuando estos protocolos no se aplican de una manera eficiente se desarrollan las ETAs (enfermedades transmitidas por alimentos), las cuales ocurren por la ingestión de un alimento contaminado que provoca efectos nocivos en la salud.

Según la OMS en su nota descriptiva del mes de octubre de 2017 ⁵, aproximadamente el 70% de las diarreas son producidas por la ingestión de alimentos contaminados con microorganismos o sus toxinas, se estima que cada año enferman en el mundo unos 600 millones de personas por esta misma causa. Además, se indica que los alimentos implicados con mayor frecuencia son los de origen animal, en particular la carne y los huevos.

En las plantas de beneficio avícola a diferencia de otro tipo de industrias de alimentos la materia prima de la que se parte, en este caso las aves, traen consigo gran variedad de microorganismos que son los que probablemente se distribuyen por las instalaciones de la planta y si no son eliminados efectivamente terminan siendo parte del producto final.

Lo que se realizó con este proyecto fue la evaluación de la efectividad del protocolo de desinfección empleado en una planta de beneficio avícola ubicada en la ciudad de Bogotá, este se elaboró para asegurar la inocuidad de este alimento, a través de la

prevención de la contaminación microbiológica que se puede presentar en las diferentes etapas del proceso, teniendo en cuenta que esta fase es un punto crítico de la cadena productiva que debe ser controlado para obtener carne de pollo y subproductos que cumplan con las condiciones de calidad sanitaria que garanticen su aptitud para el consumo humano.

El método de dilución neutralización propuesto en la norma técnica colombiana 5150 de 2003, permitió valorar la actividad del hipoclorito de sodio y el peróxido de hidrógeno, demostrando que el hipoclorito de sodio tiene menor actividad bactericida, lo cual está asociado con las malas prácticas en el empleo de esta sustancia, que favorece el desarrollo de mecanismos mediante los cuales las bacterias logran evadir la acción de los desinfectantes.

A partir de los resultados obtenidos se propuso un nuevo protocolo de desinfección el cual proporciona los siguientes beneficios:

- Previene la contaminación de la carne de pollo en la etapa de procesamiento y los problemas relacionados que puedan afectar la salud del consumidor.
- Reduce las pérdidas de producto ocasionadas por alteración microbiológica.
- Evita el desperdicio de los desinfectantes al tener control sobre las dosificaciones.
- Protege la salud de los manipuladores de estas sustancias, ya que el uso indiscriminado e inadecuado puede ocasionar enfermedades.
- Optimiza los tiempos de ejecución de las actividades de limpieza y desinfección.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Evaluar la efectividad del protocolo de desinfección utilizado en las diferentes superficies que se encuentran en las áreas de procesamiento de una planta de beneficio avícola ubicada en Bogotá.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar los microorganismos aislados a partir de las superficies de diferentes áreas de la planta de beneficio.
- Determinar la eficiencia del desinfectante en uso en la planta de beneficio de aves mediante el método de dilución neutralización propuesto en la norma técnica colombiana 5150 de 2003.
- Aplicar el método de dilución neutralización para la evaluación de la eficacia de otro desinfectante no empleado en esta industria.
- Proponer un protocolo de desinfección basados en los resultados obtenidos para optimizar los procedimientos actuales.

4. Antecedentes

Los procesos de desinfección han sido desarrollados y aplicados desde hace mucho tiempo, inicialmente de forma empírica sin tener idea de cuál era el principio o sobre qué estaban actuando dichas sustancias químicas, o cual era el fundamento de un proceso físico como la aplicación de calor sobre diferentes elementos, simplemente observaban que cuando hacían uso de estos se reducían las enfermedades, se conservaban los alimentos, se frenaban los procesos de descomposición, entre otros, que fueron la base de los desinfectantes y de los procesos de desinfección.

En la antigüedad, en la Odisea se describe el empleo del azufre 800 años A.C como un químico aplicado en los lugares donde había cadáveres para descontaminar, este mismo producto fue empleado para desinfectar superficies y utensilios contaminados después de la epidemia de la peste humana en Europa, y también en 1754 se usaron vapores de azufre sobre personas y objetos durante la epidemia de la peste bovina⁶.

En Italia en 1429 se emplearon los derivados de mercurio en la lucha contra la sífilis, pero fue finalmente Koch quien demostró la utilidad de éste sobre los microorganismos; otras sustancias de importancia fueron, la sosa la cual ha sido usada desde hace mucho tiempo sobre materia orgánica demostrando resultados muy positivos como desinfectante⁶, y los álcalis, de estos los de más antiguo empleo en la desinfección son los derivados de la cal.

También en la antigüedad se propusieron como desinfectantes los ácidos fuertes y los ácidos orgánicos como el vinagre, ya que estos evitan la degradación de las frutas y

vegetales. En este caso fue Van Leeuwenhoek en 1676 quien comprobó que el vinagre de vino inmovilizaba las bacterias de una muestra tomada de la boca⁶.

El químico sueco C.W. Scheeldeen en 1774 descubrió el cloro, pero su utilidad como desinfectante se conoció décadas después. En 1854 se empleó en Inglaterra en la lucha contra la epidemia de cólera. En 1792 se descubrió el hipoclorito cálcico, el cual fue el origen del hipoclorito sódico que servía igual como desinfectante, este se usó en Inglaterra en 1897 en la epidemia de fiebre tifoidea y luego fue útil en la desinfección de las manos⁷.

En 1822 un farmacéutico francés expresó que el cloruro de sodio servía como una sustancia desinfectante, ya que la misma eliminaba el mal olor de los cadáveres e indicó que el uso de esta podría servir para evitar las enfermedades⁸. Así mismo en 1867, Lister descubrió que el fenol o ácido carbólico actuaba como desinfectante, por tanto este fue incorporado en diversas prácticas⁹. Y así sucesivamente con el paso de los años se han ido encontrando nuevos productos desinfectantes de gran importancia no solo en las industrias de alimentos, sino también en el ámbito clínico y domiciliario, todo enfocado en el control de las enfermedades ocasionadas por la presencia de diversos microorganismos patógenos.

Adicionalmente y relacionado con los procesos de desinfección, desde hace varios años se empezó a tener en cuenta la resistencia a desinfectantes en las industrias, esto se puede evidenciar en lo expuesto por Sundheim et al¹⁰ en el año 1998, quien la definió como la capacidad de sobrevivir a una exposición corta a desinfectantes. En este mismo trabajo se mostraron diferentes frecuencias de resistencia a desinfectantes

que contenían compuestos de amonio cuaternario; en un estudio realizado por ellos mismos en el año 1992 demostró que alrededor del 13% de 200 estafilococos aislados de la industria alimentaria Noruega, eran resistentes a este tipo de desinfectantes, y que además las cepas resistentes dieron un total de 16 perfiles de plásmidos diferentes, lo que llevó a pensar que el desarrollo de resistencia a desinfectantes en la industria puede estar asociado a una adquisición de mecanismos genéticos por parte de los microorganismos¹⁰.

También demostraron que, de 30 cepas seleccionadas al azar entre 600 cepas de *Pseudomonas*, aisladas de canales de aves de corral congeladas, estas podrían crecer en altas concentraciones de desinfectante, siendo este un dato muy importante para esta investigación teniendo en cuenta que las *Pseudomonas* son uno de los principales grupos responsables de la alteración de productos cárnicos almacenados incorrectamente en condiciones de aerobiosis¹⁰.

Otro factor que hace algún tiempo se empezó a estudiar es la relación entre el uso constante y por años del mismo desinfectante y la resistencia generada por los microorganismos. Oren et al¹¹ junto con sus investigadores realizó un estudio donde demostró que en los últimos 5 años, el 0,2-3,1% de los pollos de engorde han sido positivos a *Salmonella*, ellos indican que las razones de esta tendencia nunca han sido aclaradas, pero asocian esta resistencia con el uso repetido de los productos elaborados por la misma empresa, afirmando que: “Los tipos de antibióticos que se utilizan comúnmente en la industria avícola, y en muchas granjas, son de la misma marca del desinfectante que se utiliza durante años”¹¹. Esto relaciona el uso de

materiales similares para la elaboración de estos dos tipos de productos que cumplen funciones diferentes.

Con respecto a la normatividad, las distintas crisis alimentarias que se han generado han sensibilizado aún más a productores y consumidores de las condiciones que deben cumplir los alimentos, por lo que cada vez son más exigentes las normas para asegurar que el consumo de estos no genere ningún riesgo para la salud. Por esta razón, muchos países han fortalecido y establecido nuevas reglamentaciones que aseguren inocuidad.

La documentación de cualquier programa de desinfección se debería regir con base en los principios generales de higiene de los Alimentos del Codex Alimentarius. Este fue creado en 1963 por la FAO y la OMS y consiste en una recopilación de normas alimentarias, códigos de prácticas y otras recomendaciones, cuya aplicación busca asegurar que los productos alimentarios sean inocuos y aptos para el consumo¹².

Basándose en estos códigos internacionales el ministerio de salud crea reglamentación para la aplicación de las BPM en Colombia. El principal es el decreto 3075 de 1997 actualmente modificado por la resolución 2674 de 2013, en el cual se establece la necesidad de un programa de limpieza y desinfección. En este decreto se indica que: “Los procedimientos de limpieza y desinfección deben satisfacer las necesidades particulares del proceso y del producto de que se trate. Cada establecimiento debe tener por escrito todos los procedimientos, incluyendo los agentes y sustancias utilizadas, así como las concentraciones o formas de uso y los equipos e

implementos requeridos para efectuar las operaciones y periodicidad de limpieza y desinfección”¹³.

5. Marco referencial

5.1 Principales patógenos en la carne de pollo

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) han sido reconocidas como un importante problema de salud pública a nivel mundial, la mayoría son infecciones ocasionadas por bacterias, virus o parásitos que se encuentran adheridos a los alimentos o a las superficies que se encuentran en contacto, ocasionando serios problemas de contaminación y numerosas pérdidas económicas por los productos que se desechan.

Los productos cárnicos al ser ricos en nutrientes, proporcionan un entorno adecuado para la proliferación de diversos microorganismos, deteriorantes y patógenos. Debido a la variedad de estudios que se han realizado sobre el tema, hay una lista de microorganismos que históricamente se han asociado a brotes por el consumo de cárnicos, destacando la carne de res y de pollo.

Dentro de estos microorganismos se incluyen: *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 y no-O157 productoras de toxina shiga (STEC), *Listeria*, *Campylobacter*, *Clostridium perfringens* y *Yersinia*¹⁴.

Con relación a la calidad microbiológica de la carne de pollo, se debe tener en cuenta que la demanda mundial de carne de pollo se ha incrementado en los últimos años

debido a su precio comparativamente bajo con otras carnes y por ser además una excelente fuente de proteína¹⁵.

Es importante entender que “Las poblaciones bacterianas en las canales de pollo, están determinadas por el tipo de poblaciones de bacterias presentes en el tracto gastrointestinal de las aves, así como de las bacterias que se adhieren en el proceso de sacrificio y después de el”¹⁶, por lo que la calidad de la carne se puede ver afectada en todas las fases del proceso.

A la carne de pollo se han asociado históricamente los microorganismos anteriormente nombrados y según Castañeda et al¹⁷ también se han encontrado: *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Pasteurella multocida*, *Riemerella anatipestifer*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio spp.*

Aunque recientes estudios demuestran que “en caso de la carne de ave, *Salmonella spp* y *Campylobacter spp*, son las causas más comunes de ETAs vinculadas, mientras que *L. monocytogenes* es un problema grave asociado a productos procesados de carne de ave”¹⁷.

La contaminación de las canales de las aves puede provenir de la flora propia de la piel del animal, microorganismos provenientes de las plumas que por contigüidad durante el sacrificio pasan a la carne o por el contacto que tienen las canales con los contaminantes durante el procesamiento¹⁸.

En la industria alimentaria se emplean los microorganismos indicadores para obtener información sobre las condiciones de higiene en las que se procesó el alimento, para establecer criterios microbiológicos e incluso determinar la vida útil del producto; como

lo indica Pérez¹⁸ los indicadores que con mayor frecuencia se asocian a la carne de pollo son mesófilos, psicrótrofos, estafilococos coagulasa positivo, *Clostridium* sulfito reductor y enterobacterias.

5.2 Desinfectante y características de un desinfectante ideal

Los desinfectantes son sustancias químicas empleadas principalmente sobre superficies inanimadas, con el objetivo de destruir los organismos patógenos, las características de un desinfectante ideal son las siguientes:

-Eficacia: que tenga acción sobre variedad de microorganismos, tanto bacterias Gram negativas como Gram positivas, de igual forma según lo señalado por Medina y Valencia¹⁹ deben también destruir la mayoría de esporas fúngicas y esporas bacterianas.

-Estabilidad: esta se relaciona directamente con la materia orgánica, pues este no debe reaccionar ni inactivarse en presencia de esta. Ya que “La materia orgánica que puede estar presente en los equipos o superficies es capaz de reducir la capacidad biocida de los desinfectantes, debido a su efecto diluyente”²⁰.

-Tiempo de exposición: siempre se busca que tenga un tiempo de acción menor, y aunque ningún desinfectante puede actuar inmediatamente, el desinfectante ideal tendrá un tiempo menor de contacto si se compara con otros.

-Debe tener una capacidad de penetración, la cual se relaciona directamente con la eficiencia de este al destruir a los microorganismos.

-Fácilmente solubles en agua, y arrastrables por enjuagado²⁰, lo que indica que no debe dejar residuos en las superficies; Además este no debe ser corrosivo, ni tóxico para el ser humano.

-Debe ser inodoro e incoloro, por lo que no debe teñir las superficies a las que se aplique.

-Económicamente competitivos, según Troya²⁰ esto significa que debe haber una relación positiva entre costo y efectividad.

5.3 Resistencia a desinfectantes

El principal mecanismo que utilizan los microorganismos para desarrollar resistencia a los desinfectantes se basa en la formación de biofilms; “El biofilm o biopelícula es una capa viscosa de polisacárido extracelular, que puede desarrollarse sobre superficies hidrófobas o hidrófilas, bióticas o abióticas, incluyendo vidrios, acero, plástico y goma, materiales generalmente usados en el procesamiento de alimentos”²¹.

Un claro ejemplo de esto, se expuso en el estudio de Dolores et al²¹ donde expone que los estafilococos coagulasa negativos (SCN) son grandes productores de biofilms y estos constituyen el mayor componente de la microflora normal de humanos por lo que pueden ser transferidos a los alimentos, a superficies de contacto o al ambiente de procesamiento de los mismos productos. En el mismo estudio se determinó la eficiencia del hipoclorito de sodio frente al microorganismo *Staphylococcus cohnii* ya que es un potente productor de biofilms y expusieron que este desinfectante producía un 100% de muerte bacteriana y una disminución en la formación de biofilm a las 18 h.

Existen microorganismos en los que se debe hacer mayor énfasis por ser causantes de ETAs y además por encontrarse habitualmente en carnes contaminadas al ser microorganismos zoonóticos. La *S. enterica* y el *S. aureus* son un importante problema de salud en todo el mundo y esto se asocia con la capacidad de estos agentes patógenos de adherirse a Biofilms²².

Gkana et al²² demostró la capacidad de diversos desinfectantes como el cloruro de benzalconio, hipoclorito de sodio (NaClO) o ácido peroxiacético frente a la eliminación de los biofilms formados por estos microorganismos y encontraron que el tratamiento con NaClO (10 ppm) fracasó en la eliminación de las células de biofilm de ambos patógenos en condiciones de cultivo. La resistencia de las células al cloro puede explicarse parcialmente por la limitación de la difusión de los desinfectantes al interior del biofilm.

En el estudio realizado por Vázquez et al²³ se demostró la resistencia de los biofilms a tres biocidas tradicionales (cloruro de benzalconio, ácido peracético e hipoclorito de sodio); además, se evidencio que las cepas de *S.aureus* tenían una alta capacidad de formación de biofilm en superficies de acero inoxidable y alta resistencia a los desinfectantes testeados, siendo este un importante patógeno bacteriano causante de intoxicación alimentaria.

Con respecto a *Listeria monocytogenes* este es uno de los microorganismos más importantes en la industria alimentaria, ya que a pesar de los tratamientos de limpieza y desinfección regulares creados para la eliminación de este y otros microorganismos, algunas cepas parecen persistir causando contaminación prolongada, según lo descrito por Lunden et al.²⁴ Además resalta que las respuestas adaptativas se desarrollan

cuando las bacterias se exponen a concentraciones subletales de desinfectantes, probablemente en plantas de procesamiento de alimentos como resultado de las perturbaciones en la limpieza y desinfección.

La resistencia a los desinfectantes puede conducir a la adaptación cruzada a otros desinfectantes, aumentando la supervivencia de las bacterias, sin embargo se aclara que esta adaptación no parece ser de gran importancia en la supervivencia de las células cuando el procedimiento de desinfección se realiza adecuadamente²⁴.

Se ha especulado que el aumento de la resistencia puede tener un efecto sinérgico con otros mecanismos de resistencia, con respecto a esto se pueden diferenciar dos tipos de resistencia²⁵:

-Innata: Es una resistencia natural asociada a la presencia de enzimas, bombas de flujo o diferencias estructurales en la composición de la pared celular, características que determinan el espectro de actividad de los desinfectantes²⁶.

-Adquirida: En la cual los microorganismos pueden desarrollar resistencia a los productos biocidas, debido a un cambio a nivel del genoma, que provoca una mutación²⁶. Por ejemplo, una mutación espontánea a nivel de un cromosoma puede otorgar a un organismo un carácter que le proporcione resistencia a una materia activa biocida, posteriormente, al multiplicarse transmite el gen de la resistencia, este carácter será cada vez más dominante en la población presente²⁶.

5.4 Rotación de desinfectantes

La resistencia microbiana es considerada como la pérdida de sensibilidad de un microorganismo a un antimicrobiano al que originalmente era susceptible. “Este hecho involucra necesariamente la aparición de un cambio permanente en el material genético del microorganismo que se transmite a sus descendientes, los que por este motivo resultan también insensibles al antimicrobiano en cuestión”²⁶.

Es por esta razón que la rotación de desinfectantes en cualquier área industrial es crucial, ya que se realiza con el objetivo de evitar generación de tolerancias en la microbiota contaminante, siempre teniendo en cuenta que la limpieza y desinfección centra su atención sobre aquellas superficies que contactan directamente con el producto fabricado²⁷.

La limpieza y la desinfección son etapas fundamentales en la higienización de superficies industriales pero no siempre se consigue el resultado esperado, por lo que la mayoría de las adaptaciones por parte de los microorganismos se relacionan con errores en la limpieza y desinfección rutinaria.

La rotación de desinfectantes se basaría entonces, en que cada cierto tiempo, dependiendo del lugar, el tipo de contaminación y la extensión de la misma, se cambia el tipo de desinfectante creando un ciclo con dos, y preferiblemente tres productos de desinfección diferentes. A pesar de la aparición de fenómenos de adaptación cruzada

entre desinfectantes, nombrados anteriormente, y sin saber cómo estos mecanismos puedan afectar la rotación, el sistema de rotación continúa siendo el que mejor respuesta ofrece para evitar la formación de biofilms y progresiones de los mismos²⁸.

5.5 Factores que afectan los desinfectantes

En el desempeño de un desinfectante intervienen cuatro grupos de factores que determinan su efectividad, seguridad y economía. Estos factores se identifican como físicos, físicoquímicos, estructurales y biológicos²⁹.

Físicos: Dentro de los factores físicos se encuentran la concentración, la temperatura y el tiempo de exposición o tiempo de acción. Cuando uno de estos factores permanece constante, los otros dos tendrán que variar en forma inversamente proporcional para mantener una equivalencia de actividad para el producto; por ejemplo, si se da una concentración fija y la temperatura decrece, el tiempo de exposición tendrá que incrementarse²⁹. En el caso de la temperatura, el hipoclorito de sodio mantiene eficacia a temperaturas muy bajas¹⁹.

Físicoquímicos: Dentro de este grupo de factores tenemos el pH o potencial de hidrógeno, el cual es importante para cambiar la carga iónica en la superficie de la bacteria o bien para alterar el grado de acidez o alcalinidad del medio en que vive. El pH determina el grado de disociación y la efectividad del agente químico, pues a menor disociación mayor permeabilidad y mayor efectividad¹⁹.

Sustancias interferentes: La presencia de materia orgánica en el ambiente es un excelente desafío al principio activo que se ensaya. En este caso, la materia orgánica es oxidada y es destruida la flora bacteriana de su superficie pero no siempre se

permite la penetración del desinfectante dentro de su masa, donde se alojan gérmenes infecciosos que no son exterminados, porque se ha constituido para ellos una defensa y en esta forma se establece un reservorio.

Biológicos: comprende puntos de vista relacionados al tipo de microorganismos y la cantidad de ellos (carga microbiana). En este aspecto se tiene en cuenta especie del microorganismo, presencia de formas vegetativas o el número de microorganismos iniciales³⁰.

5.6 Hipoclorito de sodio y su mecanismo de acción

El cloro es un agente oxidante que inactiva proteínas enzimáticas, es un potente germicida con amplio espectro de actividad, efectivo en la eliminación de bacterias, esporas, hongos, virus y protozoos³¹.

Los compuestos clorados tienen varias presentaciones comerciales: líquida (hipoclorito de sodio) y sólida (hipoclorito cálcico), frente al uso de esta sustancia se deben tener ciertas precauciones, ya que hay factores que pueden inhibir la acción de este: Es incompatible con detergentes iónicos, nunca debe mezclarse con ácidos o alcoholes porque puede desprender gases, tiene efecto corrosivo y es decolorante³¹.

Según lo expresado por Idalina et al³² el hipoclorito de sodio puede producir compuestos clorados carcinógenos en el agua y además de la producción de subproductos no saludables, su eficiencia en la desinfección se reduce en gran medida por la presencia de materia orgánica. Por consiguiente, esto debe ser tenido en cuenta para que el proceso de desinfección sea efectivo.

5.7 Peróxido de hidrogeno y su mecanismo de acción

El peróxido de hidrogeno está incluido en el grupo de los oxidantes, es decir que es una sustancia capaz de ceder oxígeno. “Este compuesto produce la formación de radicales libres hidroxilos, que contribuyen a desestabilizar las moléculas celulares”³³.

Este tipo de desinfectantes al ser oxidantes actúan sobre los grupos sulfhidrilos (–SH) de las proteínas de estructura y función de las bacterias, al momento de oxidar estos compuestos “los grupos sulfhidrilos libres dan lugar a puentes disulfuro, con lo que cambia la conformación de las proteínas que forman dichas enzimas, con pérdida de su función y como consecuencia la muerte celular”³⁴.

El peróxido de hidrogeno en contacto con otros catalizadores orgánicos e inorgánicos, como por ejemplo la enzima catalasa (enzima presente en todos los tejidos de los organismos vivos que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua), se descompone liberando moléculas de oxígeno³⁵.

La concentración del desinfectante es muy importante para asegurar la eficacia, según R.Vignoli³³ utilizado en solución al 3% es de escasa y breve actividad como antiséptico, ya que es rápidamente inactivado por enzimas, por el contrario en soluciones estabilizadas al 10% actúa como desinfectante de alto nivel.

Es un desinfectante de amplio espectro de acción, es efectivo frente a bacterias, hongos, algunos virus y esporas, los microorganismos anaerobios son incluso más sensibles por no disponer de actividad peroxidasa; en general, presenta mayor poder bactericida frente a especies Gram negativas que Gram positivas⁴.

5.8 Método de dilución-neutralización

Para valorar la actividad de un antiséptico o desinfectante, se determina su concentración mínima bactericida (CMB). Para ello, los procedimientos más utilizados son los test in vitro cuantitativos con microorganismos en suspensión, y entre ellos el método de dilución-neutralización, que se aplica para la valoración de antisépticos y desinfectantes para los que existe un neutralizante³⁶.

Como lo establece la NTC 5150 el principio del método consiste en tomar una suspensión de bacterias y añadirla a una muestra preparada del producto que va a someterse a prueba, después de un tiempo de contacto seleccionado entre uno de los siguientes: 1 min, 5 min, 15 min, 30 min, 45 min o 60 min \pm 10 s, se toma una alícuota y se neutraliza inmediatamente la acción bactericida o se suprime mediante un método validado. Se determina el número de bacterias sobrevivientes en cada muestra y se calcula la reducción que se ha producido en los recuentos viables³⁷.

El objetivo de un test biocida es la determinación exacta de las células sobrevivientes en relación al tiempo y la concentración del desinfectante que se está evaluando, es decir que mide la eliminación de microorganismos a partir del número de organismos capaces de crecer después de la exposición al agente antimicrobial³⁸.

5.9 Relación de la resistencia bacteriana a antibióticos con la resistencia a los desinfectantes

El aumento en la incidencia de comida contaminada por patógenos ha generado un gran costo social y económico porque se ven involucrados los organismos de salud pública y la industria de alimentos, lo cual demanda gran efectividad de los desinfectantes y los agentes de limpieza, a los que se les debe controlar temperatura, pH, tiempo de contacto, composición, concentración y rotación³⁹.

Según Huet A et al⁴⁰ concentraciones reducidas de los productos químicos denominados biocidas, pueden hacer que la bacteria *Staphylococcus aureus* elimine las sustancias químicas tóxicas de la célula de una forma todavía más eficaz, lo que la puede hacer resistente a la muerte causada por algunos antibióticos. Se demostró que esta bacteria crea bombas de flujo para contrarrestar la acción del desinfectante y que luego de exponerla a concentraciones subletales de esta sustancia, se producían mutantes que creaban más bombas de flujo de lo normal⁴⁰.

Por otro lado, Cabrera et al⁴¹ indica que uno de los factores que generan resistencia a ciertos antibióticos se debe a que las sustancias antibacterianas que presentan distintos biocidas, son semejantes a los antibióticos en su acción y pueden apresurar la resistencia en ciertas cepas. Según esto se puede indicar que el uso indiscriminado de ciertas sustancias desinfectantes en la industria puede acelerar el desarrollo de mecanismos de resistencia a los antibióticos más utilizados.

5.10 Proceso de limpieza y desinfección de la planta de beneficio avícola evaluada

- 1. Limpieza en seco:** Se remueven todos los restos de material orgánico presentes en el piso, paredes, techos y en las superficies de máquinas, equipos y utensilios.
- 2. Pre limpieza húmeda:** En esta fase se remueve el material que no se pudo eliminar en el paso anterior, usando agua fría potable con hidrolavadoras. Este procedimiento se realiza hasta que visualmente ya no se evidencie ningún tipo de residuo.
- 3. Lavado y desinfección:** Se emplea jabón desengrasante, esponjas abrasivas y escobas para retirar la grasa adherida a las superficies, y para la desinfección se usa hipoclorito de sodio.
- 4. Enjuague:** Se retiran las sustancias aplicadas en el paso anterior con abundante agua a presión.
- 5. Inspección final:** El encargado de control de calidad verifica la limpieza de las diferentes áreas y realiza las observaciones.

5.10.1 Falencias detectadas en el proceso de limpieza y desinfección

- Se emplea únicamente una sustancia desinfectante
- No se tiene control sobre la concentración de las soluciones desinfectantes, se realiza según criterio de las personas encargadas de ejecutar las actividades.
- En ocasiones se mezcla el desinfectante con el jabón empleado en la limpieza.

-No se tiene estandarizado el tiempo de acción del desinfectante.

5.11 Contaminación de la carne de ave en el proceso de producción

La contaminación de la carne de ave se puede presentar en distintos puntos de su proceso de producción, desde la crianza de las aves hasta la preparación del alimento para su consumo final. Para poder analizar esto la FAO⁴² proporciono un panorama general de los factores de riesgo de las enfermedades de transmisión alimentaria relacionadas con el consumo de aves de corral y productos avícolas, donde mostro que el riesgo más alto de adquirir una ETA por el consumo de este tipo de carne, se encuentra en el proceso de producción a nivel industrializado, resaltando que el riesgo se aumenta si en la cadena de producción se rompe la cadena de frío.

Durante el proceso de sacrificio y producción la tasa de contaminación bacteriana es muy representativa, aumentando o disminuyendo dependiendo de la etapa del proceso, como se evidencia en la Figura 1, donde el desplume representa el principal riesgo de contaminación de la carne debido a que hay un contacto directo entre todas las canales de las aves, además de que las plumas contaminadas quedan en la desplumadora, convirtiéndose así en punto crítico de contaminación. Esto confirma aún más la importancia de llevar un correcto control de calidad en los procesos de limpieza y desinfección de las superficies de la planta, especialmente en puntos críticos como el nombrado anteriormente.

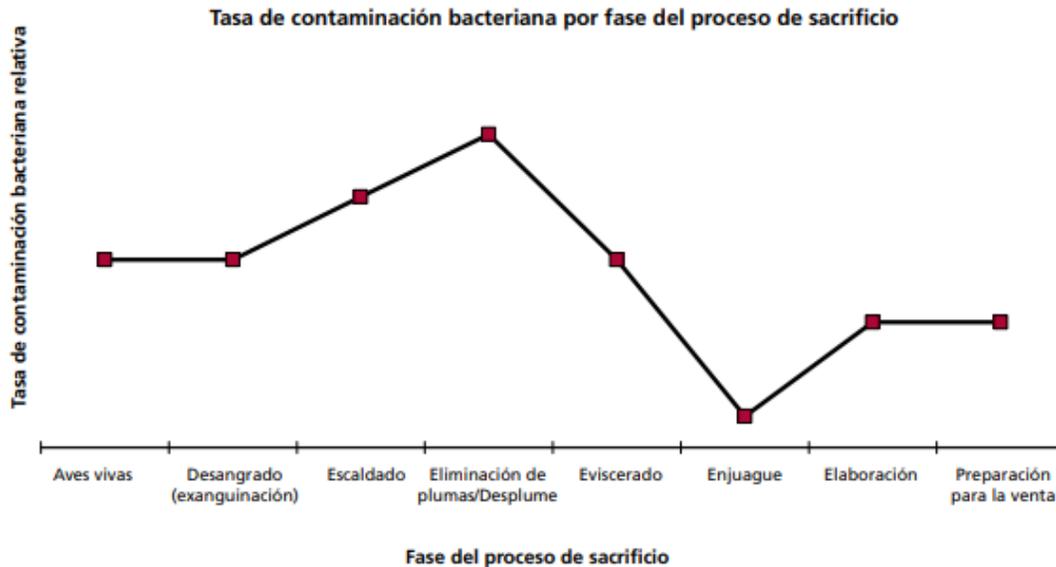


Figura 1. Tasa de contaminación bacteriana por fase del proceso de sacrificio según la FAO⁴².

La carne y sus derivados pertenecen al grupo de alimentos de mayor riesgo en salud pública, ya que sus características de composición favorecen la proliferación microbiana, y por consiguiente cualquier deficiencia en las condiciones de producción, procesamiento, manipulación, conservación, transporte y comercialización pueden ocasionar trastornos a la salud del consumidor, como lo indica Martínez⁴³, donde además señala que los puntos más críticos para el control de calidad de la carne son el desollado, ya que la piel del animal suele venir sucia y posiblemente contaminada, y el eviscerado ya que el contenido intestinal puede contaminar las demás canales y las superficies donde se hace la evisceración.

En el año 2012 en Venezuela se realizó un estudio donde se determinó la frecuencia total de muestras positivas a *Salmonella*, *Listeria* y aerobios mesófilos en 5 plantas de beneficio de pollos en 3 fases del proceso de producción: evisceración, pre-

enfriamiento y enfriamiento⁴⁴. Los resultados demostraron la presencia de *Salmonella spp* en los cinco mataderos, principalmente en la fase de evisceración donde fueron positivas 6 de 6, demostrando la criticidad en esta etapa. Además identificaron otros puntos críticos como lo son los tanques de pre-enfriamiento y enfriamiento, ya que se evidencio que no hay una disminución progresiva en el número de canales positivas a *Salmonella spp* desde el pre enfriamiento al envasado, teniendo en cuenta que el objetivo de sumergir las canales en estos tanques es reducir la temperatura de las canales y disminuir así la contaminación microbiana⁴⁴.

Todos los estudios relacionados anteriormente demuestran la importancia no solo de llevar un correcto control en el proceso de limpieza y desinfección, sino además expone la necesidad de que cada planta de beneficio identifique sus puntos críticos, donde el monitoreo de superficies debe ser más riguroso por la carga microbiológica que se presenta.

6. Marco legal

6.1 Normatividad Colombiana sobre la vigilancia de los productos cárnicos

En los últimos años el gobierno nacional ha venido expidiendo una serie de reglamentaciones, con el propósito de que el país consolide un sistema de vigilancia riguroso en los productos cárnicos destinados para el consumo humano.

Dentro de estas encontramos el decreto No 2270 de 2012 en el cual “se estableció el reglamento técnico a través del cual se crea el sistema oficial de inspección, vigilancia y control de la carne, productos cárnicos comestibles y derivados cárnicos, destinados para el consumo humano y se fijaron los requisitos sanitarios y de inocuidad que se deben cumplir en su producción primaria, beneficio, desposte, desprese, procesamiento, almacenamiento, transporte, comercialización, expendio, importación o exportación”⁴⁵.

En la resolución número 2690 de 2015 se establecen las directrices para la formulación del programa de verificación microbiológica del sistema oficial de inspección, vigilancia y control de la carne y productos cárnicos comestibles⁴⁶; en este documento como se puede observar en la tabla 1, se indican cuáles son los microorganismos que se deben incluir en el programa de vigilancia y el objetivo de controlarlos. Además, señala que es el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) quien tiene la autoridad para establecer los procedimientos que se deben llevar a cabo en el programa de verificación microbiológica.

Tabla N°1 Microorganismos indicadores que se deben incluir en el programa de verificación microbiológica según la resolución 2690 de 2015.

MICROORGANISMO	OBJETIVO
<i>E. coli</i> genérico	Evaluar la eficacia de la limpieza y desinfección y como criterio de verificación del control de procesos.
<i>Salmonella spp.</i>	Cumplimiento de estándar de desempeño
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	Control de microorganismos patógenos
<i>Escherichia coli</i> no 0157 (STEC) productores de toxina shiga	Control de microorganismos patógenos
<i>Campylobacter spp.</i>	Cumplimiento de estándar de desempeño

7. Diseño metodológico

7.1 Tipo de investigación

Descriptiva, transversal, prospectivo.

7.2 Población de estudio

Las sustancias desinfectantes: Hipoclorito de sodio y peróxido de hidrogeno

7.3 Muestra

Microorganismos aislados de las superficies presentes en las áreas de procesamiento de la planta de beneficio avícola.

7.4 Hipótesis

Teniendo en cuenta que esta industria de beneficio de aves emplea en su protocolo de desinfección únicamente hipoclorito de sodio, se esperaría que luego de poner a prueba las suspensiones bacterianas con este desinfectante los resultados indiquen una baja actividad bactericida, teniendo en cuenta que el uso constante de esta sustancia puede favorecer la aparición de mecanismos de resistencia bacteriana.

7.5 Variables

Dependientes

Cepa control y cepas bacterianas aisladas de las superficies que están en contacto con el alimento en la planta procesadora de beneficio avícola.

Independientes

Capacidad desinfectante del hipoclorito de sodio y el peróxido de hidrogeno frente a la cepa control y cepas bacterianas aisladas de las superficies de la planta de beneficio de aves.

7.6 Puntos de muestreo

Las áreas de muestreo seleccionadas son aquellas que tengan contacto directo con el producto, y que se consideren como puntos críticos de contaminación del alimento, por tanto, se tomaran muestras de las áreas de evisceración, empaque de vísceras y empaque de producto final.

8. Procedimiento

8.1 Aislamiento e identificación de los microorganismos presentes en las superficies

NOTA. Las muestras fueron tomadas después de terminadas las actividades de limpieza y desinfección diarias.

1. Seleccionar los puntos de toma de muestra: el criterio para escoger las superficies a muestrear era que tuvieran contacto directo con las canales o vísceras destinadas a consumo humano.

2. Antes de tomar las muestras se realizó una verificación visual del proceso de limpieza, para corroborar que no quedaran restos de materia orgánica.
3. Para tomar las muestras se utilizó la técnica de frotado con torundas o hisopos de algodón, la cual consiste en utilizar un hisopo previamente humedecido en agua peptonada para que los microorganismos se adhieran a este, luego se frota en el área previamente delimitada visualmente o con la plantilla seleccionada, que va aproximadamente de 20 a 100 cm² ⁴⁷.

En este caso se delimito un área de 20 cm², se realizó un frotis horizontal y luego vertical y se introdujo el hisopo en un tubo con agua peptonada; este procedimiento se repitió con cada una de las 10 superficies seleccionadas.

4. Se realiza la siembra de todas las muestras tomadas en agar nutritivo y agar Mac Conkey, y se incuba posteriormente a 37°C por 24 horas.
5. Para realizar la clasificación de los microorganismos se evalúa la morfología por medio de la coloración de Gram.
6. Se hacen réplicas de los microorganismos aislados dependiendo de la identificación anterior en los medios agar nutritivo y agar Mac Conkey.
7. Se realiza la identificación final mediante el método BBL Crystal.

8.2 Preparación de suspensiones bacterianas y soluciones de prueba

1. Para obtener los cultivos de trabajo de los organismos, a partir del primer cultivo, se realiza una siembra en agar Soya triptona (TSA) y se incuba de 18 a 24 horas.
2. En frascos de vidrio que contienen 20 ml de agua triptona bufferada se realizan las suspensiones de trabajo con el patrón 1 de la escala de Mac Farland.

2.1 Control de la concentración de cada suspensión bacteriana: se preparan diluciones 10^{-6} y 10^{-7} y se siembran por duplicado en 1 ml de medio TSA fundido, para realizar su posterior recuento luego de 24-48 horas de incubación.

2.2 Recuento de las suspensiones bacterianas de prueba (N): Se cuenta el número de colonias y se determina el número de UFC de cada una. Nuevamente se incuban las placas durante 24 h más y se realiza el conteo de las placas con colonias bien separadas. Para el resultado final, el número de colonias que se deja es el que presenta el número más alto para cada muestra, y se determina las UFC con la siguiente fórmula:

$$\text{Recuento inicial} = \frac{C}{(n1 + 0,1 * n2) * d} \text{ (Ecuacion 1)}$$

C= Es la suma de las colonias contadas sobre todas las placas que se tienen en cuenta.

n1= es el número de placas que se toman en cuenta en la primera dilución.

n2= es el número de placas que se toman en cuenta en la segunda dilución.

d= es el factor de dilución correspondiente a la primera dilución que se toma en cuenta.

8.3 Preparación de soluciones del producto que se somete a prueba

1. Utilizando aforos de 100 ml y como diluyente agua destilada se preparan las soluciones de cada desinfectante a evaluar: hipoclorito de sodio y peróxido de hidrogeno.

2. De la solución preparada en el paso anterior, se toman 8 ml de esta con 1 ml de agua destilada en tubos de vidrio. (Esta es la solución de prueba que se va a utilizar en la prueba de cada desinfectante a las 3 concentraciones probadas)

8.4 Procedimiento del método dilución/neutralización para verificar la actividad bactericida de los productos

1. Al tubo con 9 ml de la solución desinfectante preparada anteriormente se añade 1 ml de la suspensión del microorganismo, se mezcla, se empieza a medir el tiempo y se coloca en un baño de agua a 20°C.
2. Luego de finalizar los primeros 5 minutos, se toma 1 ml de la solución y se transfieren a un tubo que contiene 9 ml de la solución neutralizante.
3. Luego de 5 minutos de neutralización, se toma 1 ml de esta solución y se siembra por profundidad y duplicado en agar TSA, y se incuba durante 24 a 48h a 37 ° C.
4. Se realiza el mismo procedimiento anterior, pero utilizando como tiempo de contacto con el desinfectante 15 minutos.
5. Luego de 24 horas de incubación, se cuentan las colonias de las cajas que permitan el recuento y que están bien separadas, y se determina el número de UFC de cada placa.
6. Se incuban de nuevo las placas durante 24 horas y se vuelve a determinar el número de UFC.
7. Se realiza el recuento de la mezcla de prueba utilizando la siguiente fórmula:

$$Rp = \frac{c}{n * d} \text{ (ecuacion 2)}$$

Rp= Recuento de prueba

c=sumatoria del número de colonias en cada placa

n=número de placas tenidas en cuenta para el recuento

d=es el factor de dilución correspondiente a la dilución que se toma en cuenta
(10⁻¹)

8.5 Validación del método dilución/neutralización

1. Se realizan suspensiones de los microorganismos aislados en tubos de vidrio con 20 ml de agua triptona bufferada, utilizando el patrón número 0.5 de la escala de Mac Farland.
2. De cada suspensión se prepara una dilución 10⁻¹ utilizando agua triptona bufferada, y se siembra por profundidad en medio TSA.
3. Para el recuento de las suspensiones bacterianas de prueba (Nv) se determinan las UFC a las 24 y 48 horas. La determinación de las colonias se realiza con la ecuación 2 nombrada anteriormente.

8.6 Validación del neutralizante

1. Se colocan 8 ml del neutralizador elegido, en dos recipientes de capacidad adecuada y se llevan a baño de agua controlado de 20°C hasta su utilización.
2. Control de toxicidad: se añade 1 ml de agua destilada al primer recipiente, este va a ser el control de toxicidad del neutralizante. (Nx)

- 2.1 Control del método: Se añade 1 ml de la solución del producto a ensayar al segundo recipiente que contiene neutralizante, el cual va a ser el control de dilución-neutralización. (Ny)
3. Se dejan en contacto 5 minutos en los dos recipientes, y se añade 1 ml de la suspensión bacteriana preparada para la validación anterior, se deja reposar durante 30 minutos y se siembran 1 ml de cada recipiente por profundidad en agar TSA.
 4. Utilizando la ecuación 2 se realiza el recuento de Nx y Ny.
 5. Posteriormente se verifica si los recuentos obtenidos se correlacionan con los que estipula la NTC 5150, para indicar que el neutralizante fue validado correctamente.

8.7 Cálculo de la disminución de la viabilidad

Para cada organismo de prueba y cada concentración del producto a someter a prueba, se calcula y registra la reducción de la viabilidad (en UFC/ml) de la siguiente forma:

$$\text{Reducción de viabilidad} = \frac{Ri \cdot 10^{-1}}{Rp} \text{ (ecuación 3)}$$

Ri: Recuento inicial de la suspensión de prueba (ecuación 1).

Rp: Recuento de prueba (ecuación 2).

Nota: Debe considerarse que el producto ha pasado la prueba si se demuestra una reducción de la viabilidad de 10^5 UFC/ml o superior.

9. Resultados

9.1 Aislamiento e identificación de los microorganismos presentes en las superficies

Tabla N°2 Puntos de muestreo y morfología observada mediante coloración de Gram.

Área	Sitio de toma de muestra	Morfología
Empaque de víscera	 <p>Figura 2. Tanque de enfriamiento de vísceras</p>	No presentó crecimiento
Empaque de víscera	 <p>Figura 3. Canales de caída de vísceras</p>	Bacilos Gram positivos

<p>Empaque de víscera</p>	 <p>Figura 4. Empacador de víscera</p>	<p>Bacilos Gram negativos</p>
<p>Empaque de víscera</p>	 <p>Figura 5. Mesa de selección de producto</p>	<p>Bacilos Gram negativos Cocos Gram positivos</p>
<p>Empaque de canales</p>	 <p>Figura 6. Banda transportadora de canales</p>	<p>Cocos Gram positivos</p>

<p>Enfriamiento</p>	 <p>Figura 7. Tanque 4 de enfriamiento de canales</p>	<p>Bacilos Gram negativos</p>
<p>Evisceración</p>	 <p>Figura 8. Banda transportadora de vísceras</p>	<p>Cocos Gram positivos Bacilos Gram negativos</p>
<p>Evisceración</p>	 <p>Figura 9. Canal de caída de pollo</p>	<p>No presentó crecimiento</p>

<p>Evisceración</p>	 <p>Figura 10. Banda transportadora de pollo a tanque de pre enfriamiento</p>	<p>No presentó crecimiento</p>
<p>Evisceración</p>	 <p>Figura 11. Descolgador de pollo</p>	<p>Bacilos Gram negativos</p>

Luego de realizar las respectivas replicas para lograr el correcto aislamiento de los microorganismos, se tuvo en cuenta la obtención de colonias puras y se escogieron aquellos que se desarrollaron a partir de la muestra N°2 y la muestra N°6, para la identificación mediante el método BBL CRYSTAL.

Tabla N°3 Microorganismos identificados mediante el método BBL CRYSTAL.

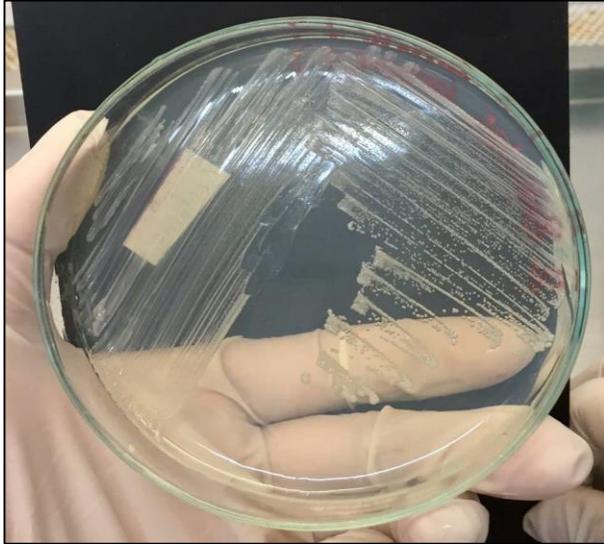


Figura 12. Aislamiento en agar nutritivo de bacilos Gram positivos a partir de la muestra tomada en las canales de caída de vísceras.



Figura 13. Aislamiento en agar Mac Conkey de bacilos Gram negativos a partir de la muestra tomada del tanque de enfriamiento.

Microorganismos identificados mediante el método BBL CRYSTAL

Bacillus licheniformis 98,5%

Klebsiella oxytoca 93,2%

9.2 Recuento de la suspensión bacteriana de prueba

Para obtener los cultivos de trabajo los organismos identificados y la cepa control fueron sembrados en agar TSA e incubados por 24 horas, a partir de estos se realizó la suspensión de trabajo en la cual se prepararon diluciones y se sembraron por duplicado en medio TSA fundido, para luego realizar el recuento de las UFC desarrolladas a las 24 y 48 horas de incubación, las cuales arrojaron los siguientes resultados:

Tabla N°4 Recuento de las suspensiones bacterianas de prueba.

Microorganismo	RECuento A LAS 24 HORAS DE INCUBACION			
<i>Klebsiella oxytoca</i>	130	280	92	116
<i>Bacillus licheniformis</i>	Incontable	90	198	Incontable
<i>Escherichia coli</i> - Control	67	68	36	29
Microorganismo	RECuento A LAS 48 HORAS DE INCUBACION			
<i>Klebsiella oxytoca</i>	210	Incontable	180	230
<i>Bacillus licheniformis</i>	Incontable	190	262	Incontable
<i>Escherichia coli</i> - Control	93	98	66	45
Incontable >300UFC				

NOTA: Los cuadros que están resaltados son los valores que se van a tener en cuenta para el cálculo de la suspensión bacteriana de prueba (N), ya que son los valores más altos obtenidos para cada muestra luego del recuento a las 24 y 48 horas y son menores a 300 UFC, por lo que cumplen el criterio establecido en la NTC 5150.

9.3 Método de dilución/neutralización para verificar la actividad bactericida de los productos

Las soluciones desinfectantes en concentraciones de 5%, 10% y 15% fueron puestas a prueba con las suspensiones de los microorganismos en diferentes tiempos de contacto (5 minutos y 15 minutos), estas preparaciones fueron sembradas e incubadas a 24 y 48 horas, transcurrido cada tiempo se determinó el número de UFC, las cuales arrojaron los siguientes resultados:

Tabla N°5 Resultados del método de dilución/neutralización para verificar la actividad bactericida del hipoclorito de sodio y el peróxido de hidrogeno a los 5 minutos de contacto y 24 horas de incubación.

5 MINUTOS DE CONTACTO- UFC / PLACA A LAS 24 HORAS DE INCUBACIÓN												
MICROORGANISMO	HIPOCLORITO 5%		HIPOCLORITO 10%		HIPOCLORITO 15%		PEROXIDO 5%		PEROXIDO 10%		PEROXIDO 15%	
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	163	155	21	25	11	9	21	16	7	0	0
<i>Bacillus licheniformis</i>	35	42	6	9	0	0	57	66	24	31	27	24
<i>Escherichia coli</i> - Control	68	78	12	17	8	4	11	7	0	0	0	0

Tabla N°6 Resultados del método de dilución/neutralización para verificar la actividad bactericida del hipoclorito de sodio y el peróxido de hidrogeno a los 5 minutos de contacto y 48 horas de incubación.

5 MINUTOS DE CONTACTO- UFC / PLACA A LAS 48 HORAS DE INCUBACIÓN												
MICROORGANISMO	HIPOCLORITO 5%		HIPOCLORITO 10%		HIPOCLORITO 15%		PEROXIDO 5%		PEROXIDO 10%		PEROXIDO 15%	
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	235	288	61	53	31	29	36	19	13	3	0
<i>Bacillus licheniformis</i>	63	50	18	15	2	0	61	77	28	39	31	26
<i>Escherichia coli</i> - Control	93	103	21	28	13	9	17	7	0	0	0	0

Tabla N°7 Resultados del método de dilución/neutralización para verificar la actividad bactericida del hipoclorito de sodio y el peróxido de hidrogeno a los 15 minutos de contacto y 24 horas de incubación.

15 MINUTOS DE CONTACTO- UFC / PLACA A LAS 24 HORAS DE INCUBACION												
MICROORGANISMO	HIPOCLORITO 5%		HIPOCLORITO 10%		HIPOCLORITO 15%		PEROXIDO 5%		PEROXIDO 10%		PEROXIDO 15%	
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	38	44	14	14	1	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus licheniformis</i>	22	28	0	0	0	0	14	9	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> - Control	3	1	4	0	0	2	0	0	0	0	0	0

Tabla N°8 Resultados del método de dilución/neutralización para verificar la actividad bactericida del hipoclorito de sodio y el peróxido de hidrogeno a los 15 minutos de contacto y 48 horas de incubación.

15 MINUTOS DE CONTACTO- UFC / PLACA A LAS 48 HORAS DE INCUBACION													
MICROORGANISMO	HIPOCLORITO 5%		HIPOCLORITO 10%		HIPOCLORITO 15%		PEROXIDO 5%		PEROXIDO 10%		PEROXIDO 15%		
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	72	66	32	34	3	12	2	0	0	0	0	0
<i>Bacillus licheniformis</i>	29	38	5	0	0	0	21	17	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> - Control	13	11	11	0	6	3	0	0	0	0	0	0	0

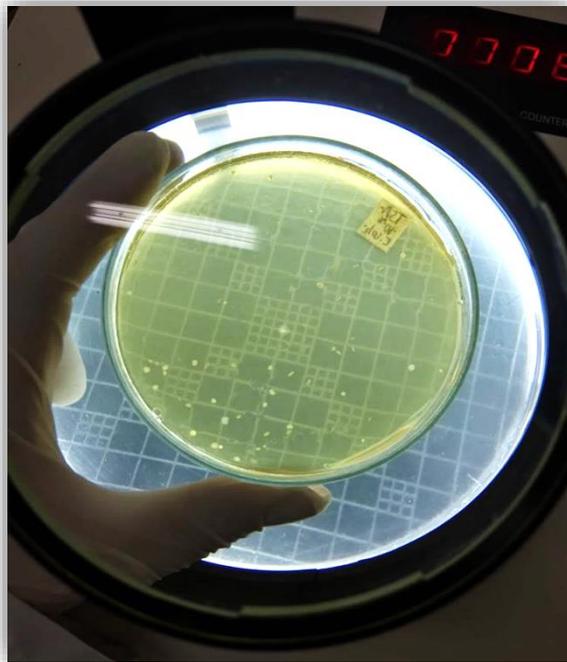


Figura 14. Método de recuento de unidades formadoras de colonias.

9.4 Validación del método dilución/neutralización

9.4.1 Preparación de la suspensión bacteriana y recuento para la validación del método (Nv).

Se realizaron suspensiones de los microorganismos aislados y a partir de estas se prepararon diluciones 10^{-1} , se sembraron por profundidad en medio TSA y se realizó el recuento a las 24 y 48 horas, el cual arrojó los siguientes resultados:

Tabla N°9 Recuento de la suspensión bacteriana preparada a partir de la dilución 10^{-1} para la validación del método (Nv).

	DILUCIÓN 10^{-1} A LAS 24 HORAS DE INCUBACIÓN (UFC)	
	1	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	265	242
<i>Bacillus licheniformis</i>	39	45
	DILUCIÓN 10^{-1} A LAS 48 HORAS DE INCUBACIÓN (UFC)	
	1	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Incontable (> 300 UFC)	258
<i>Bacillus licheniformis</i>	193	Incontable (>300 UFC)

9.5 Validación del neutralizante

9.5.1 Control de toxicidad y control del método para validar el neutralizante

Con el tiosulfato de sodio escogido como neutralizador de las sustancias desinfectantes se realizó el control de toxicidad y el control del método como lo describe el procedimiento y se sembró por profundidad en medio TSA, posteriormente se realizó el recuento a las 24 y 48 horas, el cual arrojó los siguientes resultados:

Tabla N°10 Control de toxicidad y control del método para validar el neutralizante.

A LAS 24 HORAS DE INCUBACIÓN (UFC)						
	Control toxicidad*		Control dilución neutralización** hipoclorito (15%)		Control dilución neutralización peróxido (15%)	
	1	2	1	2	1	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	160	142	25	29	2	8
<i>Bacillus licheniformis</i>	230	198	6	8	28	15
A LAS 48 HORAS DE INCUBACIÓN (UFC)						
	Control toxicidad		Control dilución neutralización hipoclorito (15%)		Control dilución neutralización peróxido (15%)	
	1	2	1	2	1	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	280	220	36	52	13	22
<i>Bacillus licheniformis</i>	Incontable (>300 ufc)	263	18	23	36	20

***Control de toxicidad:** Agua destilada + neutralizador + suspensión bacteriana preparada para la validación.

****Control dilución neutralización:** Neutralizador + solución del producto a evaluar + suspensión bacteriana preparada para la validación.

9.5.2 Valores obtenidos luego de aplicar las fórmulas descritas en la NTC 5150 de 2003

Tabla N°11 verificación de la metodología y validación del método.

Organismo de la prueba	Recuento viable (UFC/ml)				
	Suspensión bacteriana de la prueba (N)	Suspensión bacteriana de la validación (Nv)	Control de la toxicidad del neutralizador (Nx)	Control de dilución/neutralización (Ny) Hipoclorito (15%)	Control de dilución/neutralización (Ny) Peróxido (15%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.8x10 ⁸	2.5x10 ³	2.5x10 ³	4.4x10 ²	1.8x10 ²
<i>Bacillus licheniformis</i>	4.1x10 ⁸	1.9x10 ³	2.6x10 ³	2.2x10 ²	2.8x10 ²

9.5.3 Recuentos viables para la mezcla de prueba (NA)

Tabla N°12 Recuentos viables para el hipoclorito de sodio.

Organismo de la prueba	Recuentos viables (UFC/ml)		
	Hipoclorito - 5 minutos de contacto		
	5%	10%	15%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.6x10 ³	5.7x10 ²	3.0x10 ²
<i>Bacillus licheniformis</i>	5.6x10 ²	1.6x10 ²	2.0x10 ¹
<i>Escherichia coli</i> - Control	9.8x10 ²	2.4x10 ²	1.1x10 ²
Organismo de la prueba	Recuentos viables (UFC/ml)		
	Hipoclorito - 15 minutos de contacto		
	5%	10%	15%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	6.9x10 ²	3.3x10 ²	7.5x10 ¹
<i>Bacillus licheniformis</i>	3.4x10 ²	5.0x10 ¹	< 1,5 x10 ²
<i>Escherichia coli</i> - Control	1.2x10 ²	1.1x10 ²	4.5x10 ¹

Tabla N°13 Recuentos viables para el peróxido de hidrogeno.

Organismo de la prueba	Recuentos viables (Ufc/ml)		
	Peróxido - 5 minutos de contacto		
	5%	10%	15%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.8×10^2	8.0×10^1	$< 1,5 \times 10^2$
<i>Bacillus licheniformis</i>	6.9×10^2	3.4×10^2	2.8×10^2
<i>Escherichia coli</i> - Control	1.2×10^2	$< 1,5 \times 10^2$	$< 1,5 \times 10^2$
Organismo de la prueba	Recuentos viables (Ufc/ml)		
	Peróxido - 15 minutos de contacto		
	5%	10%	15%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.0×10^1	$< 1,5 \times 10^2$	$< 1,5 \times 10^2$
<i>Bacillus licheniformis</i>	1.9×10^2	$< 1,5 \times 10^2$	$< 1,5 \times 10^2$
<i>Escherichia coli</i> - Control	$< 1,5 \times 10^2$	$< 1,5 \times 10^2$	$< 1,5 \times 10^2$

9.6 Reducción de la viabilidad bacteriana luego de estar en contacto con el desinfectante

-Debe considerarse que el producto ha pasado la prueba si se demuestra una reducción de la viabilidad de 10^5 UFC/ml o superior.

-La concentración más alta debe producir una reducción de la viabilidad mayor o menor de 10^5 UFC/ml.

Tabla N°14. Reducción de la viabilidad bacteriana luego de estar en contacto con el hipoclorito de sodio.

Organismo de la prueba	Recuentos viables (UFC/ml)		
	Hipoclorito - 5 minutos de contacto		
	5%	10%	15%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.07692×10^4	4.91228×10^4	9.3×10^4
<i>Bacillus licheniformis</i>	7.3×10^4	2.5×10^5	2.0×10^6
Organismo de la prueba	Recuentos viables (UFC/ml)		
	Hipoclorito - 15 minutos de contacto		
	5%	10%	15%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5.9×10^4	8.4×10^4	3.7×10^5
<i>Bacillus licheniformis</i>	1.2×10^5	8.2×10^5	2.7×10^5

Tabla N°15. Reducción de la viabilidad bacteriana luego de estar en contacto con el peróxido de hidrogeno.

Organismo de la prueba	Recuentos viables (UFC/ml)		
	Peróxido - 5 minutos de contacto		
	5%	10%	15%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.0 x10 ⁵	3.5 x10 ⁵	1.8 x10 ⁵
<i>Bacillus licheniformis</i>	5.9 x10 ⁴	1.2 x10 ⁵	<1.46 x10 ⁵
Organismo de la prueba	Recuentos viables (UFC/ml)		
	Peróxido - 15 minutos de contacto		
	5%	10%	15%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.4 x10 ⁶	<1.8 x10 ⁵	<1.8 x10 ⁵
<i>Bacillus licheniformis</i>	2.1 x10 ⁵	<2.7 x10 ⁵	<2.7 x10 ⁵

10. Discusión

El aislamiento y la identificación de los microorganismos presentes en las superficies fue la primera etapa de la metodología, esto con el objetivo de trabajar con la flora real que se encuentra en esta industria avícola en específico, y con la intención de poder evaluar realmente la acción que ejercían las sustancias desinfectantes sobre los mismos, con respecto a esto se encontraron de mayor a menor proporción bacilos Gram negativos, cocos Gram positivos, bacilos Gram positivos, de estos se purificaron e identificaron 2 microorganismos mediante el método BBL CRYSTAL los cuales correspondieron a *Bacillus licheniformis* y *Klebsiella oxytoca*.

Las bacterias del género *Bacillus* se encuentran ampliamente distribuidas en diversos hábitats que incluyen ecosistemas de agua dulce, marinos y en el suelo. A parte de la producción de endosporas, se destacan características como la degradación de la mayoría de los sustratos derivados de plantas y animales, incluyendo celulosa, almidón, pectina, proteínas, etc., factores que aumentan la facilidad de este tipo de bacterias para sobrevivir a casi todo tipo de ambientes⁴⁸.

Como lo señala Tejero et al⁴⁸ la presencia de endosporas bacterianas constituye una estructura de resistencia que puede permanecer viable durante una gran cantidad de tiempo hasta que las condiciones se tornen favorables para el desarrollo de la forma vegetativa.

Según información de la Organización Panamericana de la Salud⁴⁹ acerca de los peligros biológicos, se indica que algunas cepas de *B. subtilis* y *B. licheniformis* fueron aisladas en ovejas y aves, identificadas en episodios de ETA. Estos organismos

producen toxinas altamente termoestables, que pueden ser semejantes a la toxina emética producida por *B. cereus*.

Las bacterias del género *Klebsiella*, actualmente son de gran importancia en salud, ya que las enterobacterias comprenden universalmente el 50% de los aislados encontrados en infecciones adquiridas en los hospitales y 80% de todos los aislados Gram negativos como lo señala Echeverry et al⁵⁰. Adicional al incremento en su prevalencia, se reporta un aumento de microorganismos de este género resistentes a los antimicrobianos alrededor del mundo y en nuestro país, ya que en los últimos cinco años se ha presentado una mayor frecuencia de enterobacterias productoras de BLEE (Betalactamasas de espectro extendido), generando tasas de resistencia hasta de 40% en los aislamientos en América Latina⁵¹.

En un estudio realizado en Ecuador para determinar la susceptibilidad a los antibióticos de uso veterinario en Enterobacterias aisladas de pollos faenados que se expenden en el mercado, demuestran que de 72 muestras de enjuague de pollo analizadas se identificaron 11 bacterias entre las cuales *Klebsiella oxytoca* fue la bacteria con mayor incidencia representando el 22,22% del universo total de la muestra, además se encontró que esta fue resistente a 11 de los 12 antibióticos puestos a prueba. Finalmente concluyen que el uso de antibióticos en la producción de aves de corral es un factor de riesgo que favorece la aparición de bacterias Gram negativas resistentes, más teniendo en cuenta que por facilidad en los galpones muchas veces se suministra tratamiento innecesario a pollos que no se encuentran enfermos⁵².

En el año 2017 la organización mundial de la salud publicó la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos, la cual se encuentra dividida en tres categorías: prioridad crítica, alta y media. El grupo de prioridad crítica incluye las bacterias multirresistentes que son especialmente peligrosas ya que pueden provocar infecciones graves y a menudo letales, como infecciones de la corriente sanguínea y neumonías, entre estas bacterias se encuentra incluido el género *Klebsiella*⁵³.

Según las características nombradas anteriormente se evidencia que los dos microorganismos que se escogieron para el desarrollo de la prueba, pueden generar un gran impacto a la salud de los consumidores de la carne de ave procesada en la planta de beneficio. Por un lado, *Bacillus licheniformis* gracias a que es productor de endosporas como se relacionó anteriormente, permitió evidenciar como actúan los desinfectantes evaluados a este tipo de formas de resistencia y *Klebsiella oxytoca* permitió demostrar el comportamiento que tienen los productos frente a microorganismos de importancia clínica, que también presentan diferentes mecanismos de resistencia.

Con respecto al desarrollo de la metodología la validación del método fue la garantía de que los resultados obtenidos eran confiables, este se realizó verificando tanto el neutralizador utilizado como los desinfectantes, en las mismas condiciones del ensayo. El control de toxicidad (Nx) permitió evaluar que el tiosulfato de sodio empleado como neutralizador no afectaba el crecimiento bacteriano por tanto se podía emplear para el desarrollo de la prueba. Conjuntamente el control del método de dilución neutralización (Ny) se realizó con el fin de evaluar en condiciones reales, la capacidad del tiosulfato de

inhibir efectivamente la acción bactericida de las sustancias desinfectantes utilizadas en el ensayo, además se evalúa también que el neutralizante y el agente activo no se combinen para formar un compuesto tóxico.

Para validar el método, se debe cumplir según la NTC 5150 los siguientes parámetros:

-N (Recuento de la suspensión bacteriana de prueba) comprendido entre $1,5 \times 10^8$ ufc/ml y 5×10^8 ufc/ml

-Nv (Recuento de la suspensión bacteriana de la prueba de validación) comprendido entre 6×10^2 y 3×10^3 ufc/ml

-Nx (Control de toxicidad del neutralizador) es igual o superior a 0,05 veces el valor de Nv (Control del método dilución-neutralización)

-Nv es igual o superior a 0,05 veces el valor de Ny

De acuerdo con lo anterior se puede corroborar que se cumplen las condiciones de la prueba establecidas en la norma, por lo tanto, se validan los procedimientos realizados, los materiales utilizados y los resultados.

Las unidades formadoras de colonias que se desarrollaron indican que el hipoclorito de sodio empleado presenta una menor actividad bactericida con respecto al peróxido de hidrógeno, lo cual puede estar relacionado con el uso constante de este desinfectante en las actividades de limpieza y desinfección de la planta, ya que al no aplicar protocolos de rotación de estas sustancias químicas los microorganismos van creando mecanismos de defensa para resistir la acción de estos antimicrobianos,

haciendo que con el paso del tiempo se pierda la efectividad de las mismas. Con el choque de desinfectantes se pretende alternar el mecanismo mediante el cual se destruyen los microorganismos, en el caso del hipoclorito de sodio este tiene propiedades oxidantes debido a la presencia del ion ClO^- , que ataca la membrana citoplasmática, diferente al peróxido de hidrógeno que tiene efectos oxidantes por producir OH y radicales libres, los cuales atacan componentes esenciales como lípidos, proteínas y ADN⁵⁴.

Adicionalmente el conteo inicial de UFC demuestra la importancia de respetar el tiempo de acción o de contacto sugerido por el proveedor, ya que se evidencia claramente que a los 15 minutos hay un menor desarrollo bacteriano, es decir una mayor actividad desinfectante con las dos sustancias probadas.

Respecto a la concentración del producto, se puede evidenciar claramente que a las dos concentraciones más altas (10 % y 15%) tanto el peróxido de hidrogeno como el hipoclorito de sodio tienen mayor acción bactericida. Estos resultados en el caso del hipoclorito de sodio contradicen las recomendaciones del proveedor, ya que este recomienda utilizar el hipoclorito al 5%, por lo que se podría sugerir que cada planta dependiendo de las materias primas que trabajen y de sus necesidades específicas, deben evaluar si las recomendaciones del distribuidor son efectivas o no en los procesos de desinfección. En este caso utilizar la concentración sugerida por los proveedores significaría un proceso de desinfección deficiente.

Sin embargo, según los resultados se puede asegurar que a pesar de que se utilicen los desinfectantes a las dos concentraciones más altas, si no se tiene en cuenta el

tiempo de contacto en las superficies, el proceso de desinfección no estaría correcto. Esto se evidencia en el tiempo de 5 minutos, donde en la concentración de 10% y 15% se observa desarrollo bacteriano, a diferencia del tiempo de 15 minutos donde en estas mismas concentraciones de los productos evaluados, el crecimiento de los microorganismos es mínimo. Lo anterior indica que se debe cumplir conjuntamente con estas dos características (tiempo/concentración) para que el proceso de desinfección sea exitoso.

En los resultados de la disminución de la viabilidad cabe aclarar que estos resultados expresan el número de UFC que disminuyeron después de estar en contacto con el desinfectante, más no de los microorganismos que crecieron después del experimento, esta aclaración se realiza con el fin de que la interpretación de las gráficas sea la correcta.

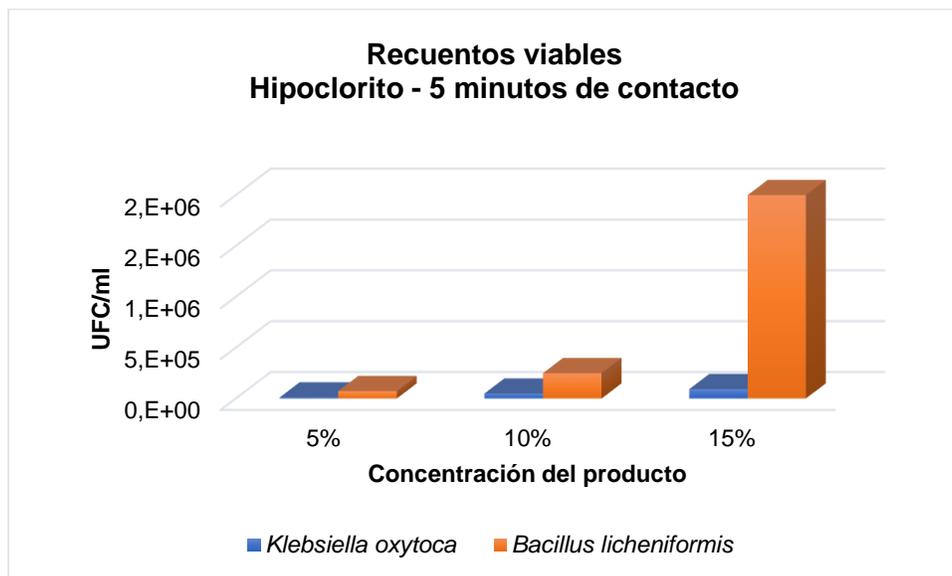


Figura 15. Disminución de la viabilidad bacteriana expresada en UFC/ml con hipoclorito de sodio a 5 minutos de contacto.

En la gráfica número 1 se evidencian los resultados de la disminución bacteriana cuando se expusieron al hipoclorito de sodio con 5 minutos de contacto, se puede observar que la mayor disminución bacteriana alcanzada fue utilizando el desinfectante únicamente en su concentración más alta como era de esperarse, pero se puede notar que en las otras dos concentraciones la disminución bacteriana fue mínima, por lo que sugiere que este desinfectante a estas concentraciones (5% y 10%) y tiempo de contacto no es eficiente.

Otro factor que se puede resaltar de esta gráfica, es que la mayor disminución bacteriana pertenece al microorganismo *Bacillus licheniformis*, mientras que la *Klebsiella oxytoca* a pesar de exponerse a la concentración más alta del desinfectante, la disminución de la viabilidad es muy poca. Esto se le puede atribuir a los diferentes mecanismos de resistencia que se han identificado en las bacterias Gram negativas tanto de forma intrínseca como adquirida.

Las bacterias Gram negativas por lo general son más resistentes a los antisépticos y desinfectantes que las Gram positivas, esto se puede relacionar con la composición de su membrana externa, ya que como lo refiere Cabrera et al⁴¹ esta actúa como una barrera que limita la entrada de varios tipos de agentes antibacterianos, debido a que las moléculas hidrofílicas de bajo peso molecular pasan fácilmente a través de las porinas, en cambio las moléculas hidrofóbicas se difunden a través de la bicapa de la membrana, ya que esta membrana está repleta de proteínas de clase de las porinas, los cuales son canales llenos de agua que sirven como difusores y que además tienen la capacidad de diferenciar moléculas por su tamaño⁵⁵. Estos microorganismos no solo presentan resistencia innata al desinfectante, sino que además pueden desarrollar

resistencia adquirida por medio de material genético en forma de plásmidos o transposones⁴¹.

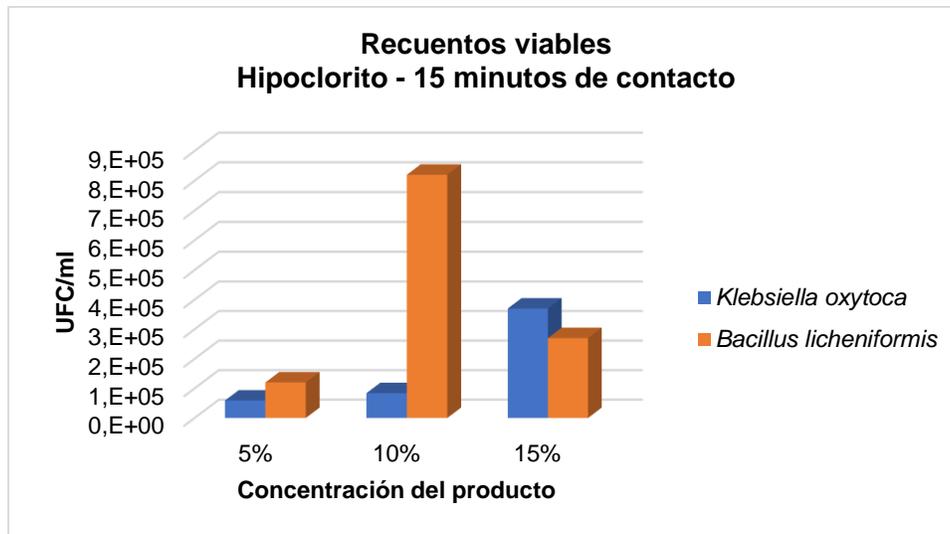


Figura 16. Disminución de la viabilidad bacteriana expresada en UFC/ml con hipoclorito de sodio a 15 minutos de contacto.

En esta grafica se puede observar que se maneja un patrón similar al grafico anterior, al observarse una mayor disminución de crecimiento bacteriano para *Bacillus licheniformis*, mientras que *Klebsiella oxytoca* en las 3 concentraciones estudiadas muestra mayor resistencia al desinfectante.

En el gráfico de la figura 15 se evidencia que en los dos microorganismos y en las 3 concentraciones la disminución de la viabilidad fue mucho más notoria con respecto a los resultados anteriores, por lo que se puede inferir que el tiempo de contacto fue el factor que influyó sobre la acción desinfectante. A pesar de que se observó que la disminución del crecimiento bacteriano fue mayor a este tiempo de contacto (15 minutos), se sigue evidenciando crecimiento de los microorganismos, aun en la concentración más alta, por lo que se puede asumir que las bacterias presentes en las

superficies muestreadas en la empresa si generaron un sistema de resistencia bacteriana frente a este desinfectante.

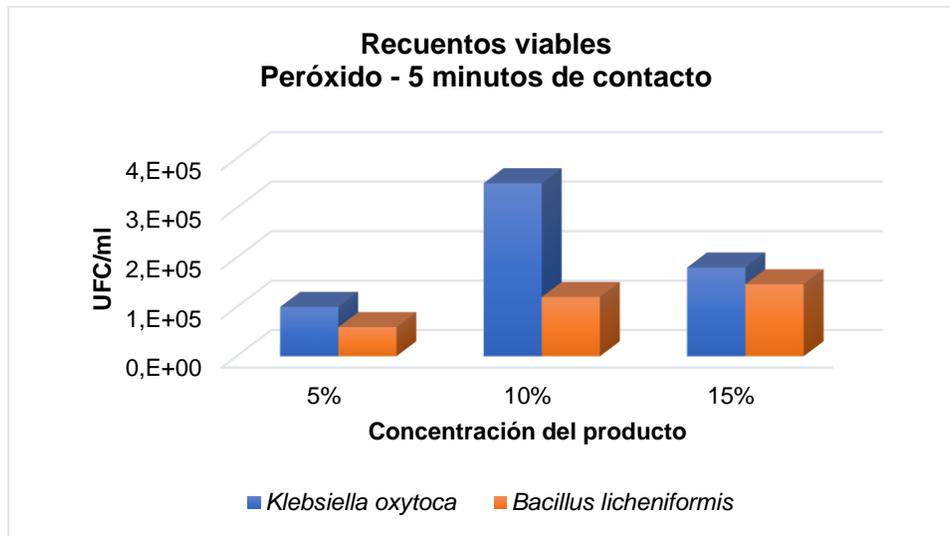


Figura 17. Disminución de la viabilidad bacteriana expresada en UFC/ml con peróxido de hidrógeno a 5 minutos de contacto.

En este gráfico podemos observar que la disminución del crecimiento bacteriano fue similar en las 3 concentraciones empleadas, a diferencia de los dos gráficos anteriores, podemos evidenciar que *Klebsiella oxytoca* fue el microorganismo que más sensibilidad presentó al peróxido de hidrógeno frente a *Bacillus licheniformis*, posiblemente esto se podría atribuir a que *Klebsiella oxytoca* no ha desarrollado aun algún tipo de resistencia adquirida frente a este producto o que la producción de esporas de *Bacillus licheniformis* le permitió mayor supervivencia.

A pesar de esto el peróxido de hidrógeno cumple el estándar para aprobar el producto como desinfectante en todas las concentraciones trabajadas, según lo establecido en la norma técnica 5150. Esto indica que el peróxido de hidrógeno

presenta mayor actividad bactericida sobre la población estudiada lo que indica que es un desinfectante óptimo para usar en este ambiente.

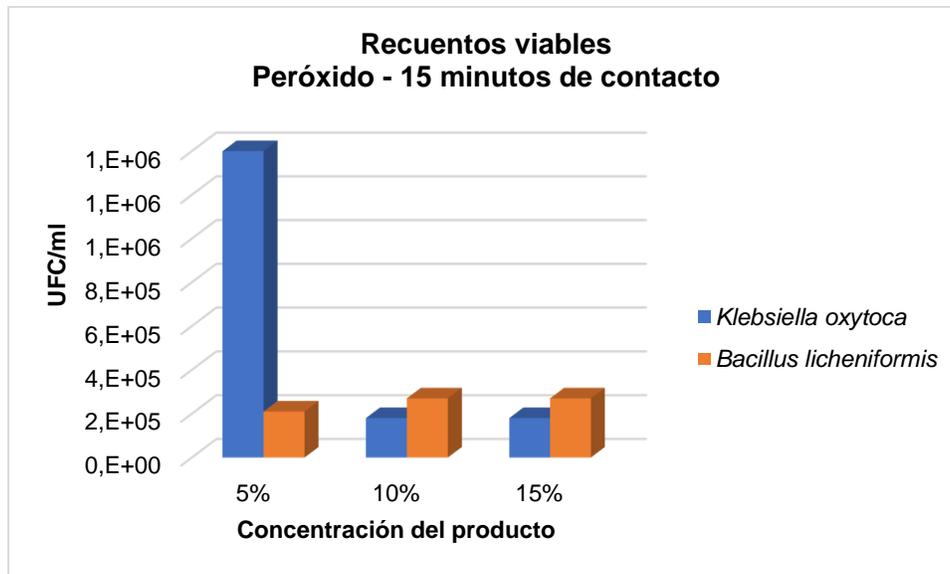


Figura 18. Disminución de la viabilidad bacteriana expresada en UFC/ml con peróxido de hidrogeno a 15 minutos de contacto.

La mayoría de las especies del género *Bacillus* son saprofitos distribuidos en la naturaleza, particularmente en suelo, agua y en materiales de origen animal o vegetal⁵⁶, gracias a esto y a su capacidad de producir endosporas, este género bacteriano ha creado diferentes mecanismos de resistencia tanto a antibióticos de uso hospitalario como a sustancias desinfectantes, sin embargo el peróxido de hidrógeno a las 3 concentraciones con un tiempo de contacto de 15 minutos cumple en todos los casos la condición de la NTC 5150 que indica que el producto tiene una acción desinfectante efectiva, además que a este tiempo de contacto fue la única vez que se logró una reducción de la viabilidad de 10^6 .

Los resultados que se mostraron anteriormente indican que el peróxido es efectivo tanto a 5 como a 15 minutos de contacto, por lo que utilizarlo 5 minutos ayudaría a

agilizar los procesos de desinfección. Adicionalmente se corrobora que es un desinfectante ideal para este tipo de industria y que es propuesto para ser implementado en el programa de rotación (**Anexo 3**).

11. Conclusiones

Se demostró que el hipoclorito de sodio presentó menor actividad bactericida en las concentraciones evaluadas, lo cual está relacionado con el uso constante de esta sustancia en las actividades de desinfección, mientras que el peróxido de hidrógeno al 10 y 15 % en los dos tiempos de contacto presentó una mayor disminución de la viabilidad bacteriana, por tanto este fue incluido en el protocolo propuesto para optimizar los procedimientos actuales ya que demostró ser idóneo para ser utilizado en esta industria.

El método de dilución neutralización resultó confiable para evaluar la actividad bactericida de estas sustancias desinfectantes, además sirvió para demostrar que la concentración propuesta por los proveedores no se ajusta a todas las industrias por igual, esto debido a la variada carga microbiana.

Demostrar una reducción de la viabilidad de 10^5 o superior es el criterio propuesto por la norma técnica colombiana 5150 de 2003 que determina si el producto ha pasado la prueba, por tanto, fue el criterio tenido en cuenta para escoger los tiempos y concentraciones que deben ser empleados para que la desinfección sea un proceso efectivo.

El tiempo de acción es un factor crucial en la efectividad del proceso de desinfección, ya que aunque se utiliza el desinfectante a la concentración más alta, si no se deja actuar por el tiempo correcto no se alcanza a eliminar cantidad de flora bacteriana deseada, además de ayudar a generar diferentes mecanismos de resistencia.

El protocolo de rotación es un documento que debe estar establecido en cada empresa según sus necesidades, y debe estar de forma escrita, en donde se muestren todos los desinfectantes que entran en el protocolo, la fecha en la que se usa cada uno, la constancia con la que se rota y la concentración a la que se debe utilizar, además cada empresa debe verificar diariamente que el proceso de desinfección se realizó en todas las áreas llevando un registro constante de esto, con el fin de lograr la trazabilidad de los lavados y desinfecciones realizadas.

Como se observó en los resultados el peróxido de hidrogeno es eficiente para microorganismos como *Klebsiella Oxytoca* y *Bacillus licheniformis* los cuales se caracterizan por presentar diferentes mecanismos de resistencia, lo que indica que es un desinfectante óptimo para usar en empresas con carga microbiológica muy alta como lo es una empresa de beneficio avícola.

A lo largo del desarrollo del trabajo se evidenció la falta de normatividad vigente en Colombia sobre la evaluación de los desinfectantes tanto a nivel industrial como a nivel hospitalario, lo que indica que la implementación de este tipo de normas técnicas sería una ayuda para asegurar la calidad de los alimentos comercializados, y en el caso del área hospitalaria garantizar un ambiente estéril a los pacientes y evitar así que siga aumentando la tasa de infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) en Colombia.

12. Referencias

1. Departamento nacional de planeación. [Internet]. Bogotá; 2016 [Citado 24 septiembre 2018]. Disponible en: <https://proyectostipo.dnp.gov.co/images/pdf/animal/ptanimal.pdf>
2. Calvo J, Martinez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*2009; 27(1): 44-52.
3. Decreto 2278 de 1982 [Internet]. Alcaldía Mayor de Bogotá. 2012 [citado 5 Agosto 2018]. Disponible en: <http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=24295>
4. Diomedi A, Chacon E, Delpiano L, Herve B, Jemenao I, Medel M. Antisépticos y desinfectantes: apuntando al uso racional. *Rev chil infectol.* 2017; 34(2):156-158.
5. Inocuidad de los alimentos [Internet]. OMS; 2017 [citado 4 Septiembre 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>
6. Delgado E, Díaz PA. Elaboración y documentación del programa de limpieza y desinfección de los laboratorios del departamento de microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana. [Internet]. 2006 [Citado 07 abr 2017]; 20-22. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis281.pdf>.
7. CAPÍTULO 2. HISTORIA DE LOS DESINFECTANTES [Internet]. [Citado 07 abr 2017]. Disponible en: <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/23129/Capitulo2.pdf>.
8. Padrón E, Companioni F, Rosales S. Apuntes históricos sobre el lavado de las manos. *Revista Cubana de Estomatología.* [Internet]. 2015 [Citado 07 abr 2017];

52(2). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072015000200011.

9. Korolkovas A, Burckhalter J. Compendio esencial de química farmacéutica. España: Editorial Reverte S.A; 1983
10. Sundheim G, Langsrud S, Heir E, Holck A. Bacterial resistance to disinfectants containing quaternary ammonium compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 1998;41(3-4):235-239.
11. Gradel K, Randall L, Sayers A, Davies R. Possible associations between Salmonella persistence in poultry houses and resistance to commonly used disinfectants and a putative role of mar. *Veterinary Microbiology*. 2005;107(1-2):127-138.
12. Diaz A, Uria R. Buenas Prácticas de Manufactura Una guía para pequeños y medianos agroempresarios. Costa Rica: IICA; 2009.
13. Decreto 3075 de 1997 [Internet]. INVIMA. 2012 [citado 12 Agosto 2018]. Disponible en: https://www.invima.gov.co/images/stories/aliamentos/decreto_3075_1997.pdf
14. Heredia N, Davila J, Soto L, Garcia S. Productos cárnicos: 80teel80do80s patógenos y estrategias no térmicas de control. *Nacameh*. 2018; 8(1):20-42.
15. Castañeda M, Braña Varela D, Cortes C, Martinez Valdes W. Calidad microbiologica de la carne de pollo [Internet]. Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. 2018 [citado 2 Abril 2018]. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Documents/MANUALES%20INIFAP/19.%20C alidad%20microbiol%C3%B3gica%20de%20la%20carne%20de%20pollo.pdf>

16. Tirado J, Paredes D, Velazquez G, Torres J. CRECIMIENTO MICROBIANO EN PRODUCTOS CÁRNICOS REFRIGERADOS. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 2005;5(1):66-76.
17. Moreno Temprado R. Calidad de la carne de pollo. *Selecciones avícolas*. 2005;17(2):423-430.
18. Perez I, Calidad y seguridad microbiológica de la carne de pollo: con especial referencia a la incidencia de *Salmonella*, *Campylobacter* y *Listeria monocytogenes* en las distintas etapas de la producción y procesado. [Tesis doctoral]. España: Universidad de La Rioja. Facultad de ciencias, estudios agroalimentarios e informática; 2015.
19. Medina Cordoba L, Valencia Mosquera L. Evaluación de la eficacia de un desinfectante de alto nivel, a base de peróxido de hidrogeno empleado en la esterilización de dispositivos e instrumentos hospitalarios. Pontificia universidad Javeriana. [Internet]. 2008 [citado 7 Abril 2017]. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis146.pdf>
20. Troya Chavarriaga J. Evaluación de los desinfectantes Divosan forte y MH en la desinfección de equipos y áreas de trabajo en una empresa procesadora de helados. Pontificia Universidad Javeriana. [Internet]. 2007 [citado 7 Abril 2017]. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis280.pdf>
21. Porcel N, Urueña R, Gaudioso M, Castillo M. Bactericidia de hipoclorito de sodio sobre *Staphylococcus cohnii* productor de biofilm en una fábrica. *Acta bioquím clín latinoam*. 2013;47(4):693-700

- ²²Gkana E, Giaouris E, Doulgeraki A, Kathariou S, Nychas G. Biofilm formation by *Salmonella* Typhimurium and *Staphylococcus aureus* on stainless steel under either mono- or dual-species multi-strain conditions and resistance of sessile communities to sub-lethal chemical disinfection. *Food Control*. 2017;73:838-846.
- ²³Vázquez-Sánchez D, Cabo M, Ibusquiza P, Rodríguez-Herrera J. Biofilm-forming ability and resistance to industrial disinfectants of *Staphylococcus aureus* isolated from fishery products. *Food Control*. 2014;39:8-16.
- ²⁴Lundén J, Autio T, Markkula A, Hellström S, Korkeala H. Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *International Journal of Food Microbiology*. 2003;82(3):265-272.
- ²⁵Desinfectantes utilizados en la industria alimentaria: Características, modo de actuación y aspectos que inciden en su eficacia [Internet]. Betelgeux. 2017 [citado 5 Mayo 2017]. Disponible en: http://www.betelgeux.es/images/files/Documentos/Articulo_boletin_Desinfectantes_y_Modo_de_accion_en_IIAA.pdf
- ²⁶Sanidad, Inocuidad y Calidad de Alimentos. [Internet]. AgroBioTek; 2016 [Actualizado 1 junio 2016; citado 5 Mayo 2017]. Disponible en: <https://sanidadealimentos.com/2016/06/01/rotacion-de-desinfectantes-para-evitar-la-resistencia/>
- ²⁷Burguet N, Brito L, Canovas I. Evaluación de la efectividad de un desinfectante mediante el método de placas de contacto. *Revista Cubana de Farmacia*. 2013;47(2):185-192.

- ²⁸.Delgado Medina E, Diaz Roa P. Elaboración y documentación del programa de limpieza y desinfección de los laboratorios del departamento de microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana. Pontificia Universidad Javeriana. [Internet]. 2006 [citado 6 mayo 2017]. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis281.pdf4>
- ²⁹.Engormix. [Internet]. Ilender CORP; 2012[Citado 6 mayo 2017]. Disponible en: http://www.adiveter.com/ftp_public/Acerca%20de%20los%20Desinfectantes.pdf
- ³⁰.Universidad de granada. [Internet]. España; 2012 [Citado 6 mayo 2017]. Disponible en: https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/14agquimicos.htm#_Toc61792029
- ³¹.Sanchez Saldaña L, Saenz Anduaga E. Antisepticos y desinfectantes. Dermatologia Peruana. 2005;15(2):82-103.
- ³².Meireles A, Machado I, Fulgêncio R, Mergulhão F, Melo L, Simões M. Efficacy of antimicrobial combinations to reduce the use of sodium hypochlorite in the control of planktonic and sessile Escherichia coli. Biochemical Engineering Journal. 2015;104(45):115-122.
- ³³. Vignoli R. Esterilización, desinfección y antisepsia. CEFA. 2008;609-617.
- ³⁴. Tormo Maicas V, Rochina I. [Internet].España: Universidad de Valencia; 2010 [citado 9 Abril 2018]. Disponible en: https://www.uv.es/curafisiologica/documentos/publicaciones/muestra_web_antisepticos.pdf

- ³⁵Lopez L, Gutierrez I, Menendez E, Lluch N, Morato L. Introducción a los antisépticos. Atención primaria. 2013;46(2):1-9.
- ³⁶. Álvarez A, Espigares E, Gálvez R. Valoración de desinfectantes. Método de dilución neutralización. Higiene y Sanidad Ambiental, 2001;(1): 1-5
- ³⁷.NTC 5150 [Internet]. ICONTEC. 2003 [citado 4 Abril 2018]. Disponible en: <https://tienda.icontec.org/wp-content/uploads/pdfs/NTC5150.pdf>
- ³⁸. Marin J, Navarro N, Santo N. Evaluación del método de dilución neutralización aplicado a un desinfectante según la norma técnica 5473 de 2007. [Internet]. 2008 [Citado 05 Ago 2017]; 1-22. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis111.pdf>
- ³⁹. Ruiz Z, Poutou R, Carrascal A. Resistencia antimicrobiana y a desinfectantes de *Listeria spp.* NOVA. 2018; 6(10):101-236.
- ⁴⁰.Huet A, Raygada J, Mendiratta K, Seo S, Kaatz G. Multidrug efflux pump overexpression in *Staphylococcus aureus* after single and multiple in vitro exposures to biocides and dyes. Microbiology. 2008; 154(10):3144-3153
- ⁴¹.Cabrera C, Gomez R, Edmundo A. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. Colombia Médica. 2007; 38(2):150-156.
- ⁴². Food and Agriculture Organization. [Internet]. Países Bajos: Marisa Ventura; 2013 [Citado 25 septiembre 2018]. Disponible en: <http://www.fao.org/documents/card/en/c/fe3b6616-08d5-5f6f-a07a-3b93828323d0>

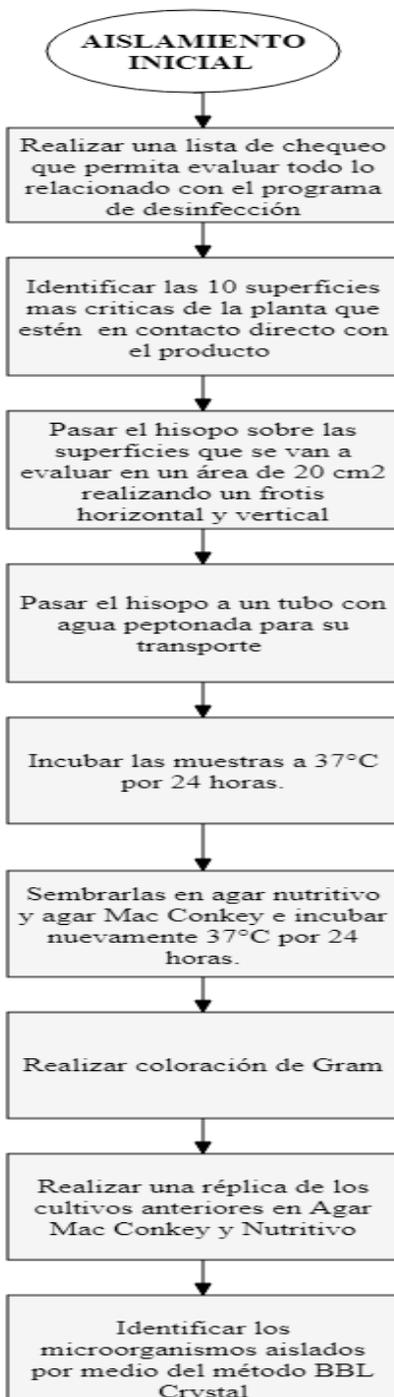
43. Martinez C, Verhelst A. Calidad microbiológica de carne bovina en plantas de beneficio. *Limentech ciencia y tecnología alimentaria*. 2015; 13(1):72-80.
44. Molero G. Análisis microbiológico de canales de pollo en los mataderos del estado Zulia, Venezuela. [Internet]. 2012 [Citado 25 septiembre 2018]; 52-78. Disponible en: <https://helvia.uco.es/bitstream/handle/10396/8380/2012000000663.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
45. Decreto 2270 de 2012 [Internet]. INVIMA. 2012 [citado 4 Abril 2018]. Disponible en: <https://www.invima.gov.co/decretos-alimentos/decreto-no-2270.../download.html>
46. Decreto 2690 de 2015 [Internet]. INVIMA. 2012 [citado 4 Abril 2018]. Disponible en: www.biblioteca.saludcapital.gov.co/img_upload/.../resolucion-2690-de-2015.pdf
47. Moreno Garcia B. Higiene e inspección de carnes. Vol I. España: Ediciones Diaz de Santos;2006
48. Tejera B, Rojas M, Heydrich M. Potencialidades del genero *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal, y el control biológico de hongos fitopatogenos. *CENIC*. 2011; 42(3):131-138.
49. PAHO [Internet]. Washington D.C. 2012 [Citado 12 Agosto 2018]. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10838%3A2015-peligros-biologicos&catid=7678%3Ahaccp&Itemid=41432&lang=en
50. Echeverri L, Rueda Z, Maya W, Agudelo Y, Ospina S. *Klebsiella pneumoniae* multi-resistente, factores predisponentes y mortalidad asociada en un hospital universitario en Colombia. *Rev chil infectol*. 2012; 29(2):175-182.

- ⁵¹Gonzales L, Cortes J. Revisión sistemática de la farmacorresistencia en enterobacterias de aislamientos hospitalarios en Colombia. *Biomedica*. 2014; 34(2):5-10.
- ⁵². Dota C, Resistencia a antibióticos de uso veterinario en Enterobacterias y *Campylobacter* aisladas de pollos faenados expendidos en el mercado “El arenal” de Cuenca.Univesidad de Azuay. [Internet]. 2017 [Citado 12 Agosto 2018]. Disponible en: <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/7556/1/13438.pdf>
- ⁵³.OMS [Internet]. Ginebra: World Health Organization; 2017 [citado 12 Agosto 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- ⁵⁴.Betelgeux [Internet]. España: Betelgeux; 2013 [citado 12 Agosto 2018]. Disponible en:http://www.betelgeux.es/images/files/Documentos/Articulo_boletin_Desinfectantes_y_Modo_de_accion_en_IIAA.pdf
- ⁵⁵.Valenzuela L, Lopez C, Romero C, Luevanos M. Mecanismos de resistencia intrínseca y adquirida a antibióticos en bacterias. *RMT*. 2016; 8(2):67-70.
- ⁵⁶.Reyes J, Cagnasso M, Corser P, Garcia A. Resistencia a los antimicrobianos de especies de *Bacillus* aislados de leche cruda. *Revista Científica*. 2004; 11(6):479-484.

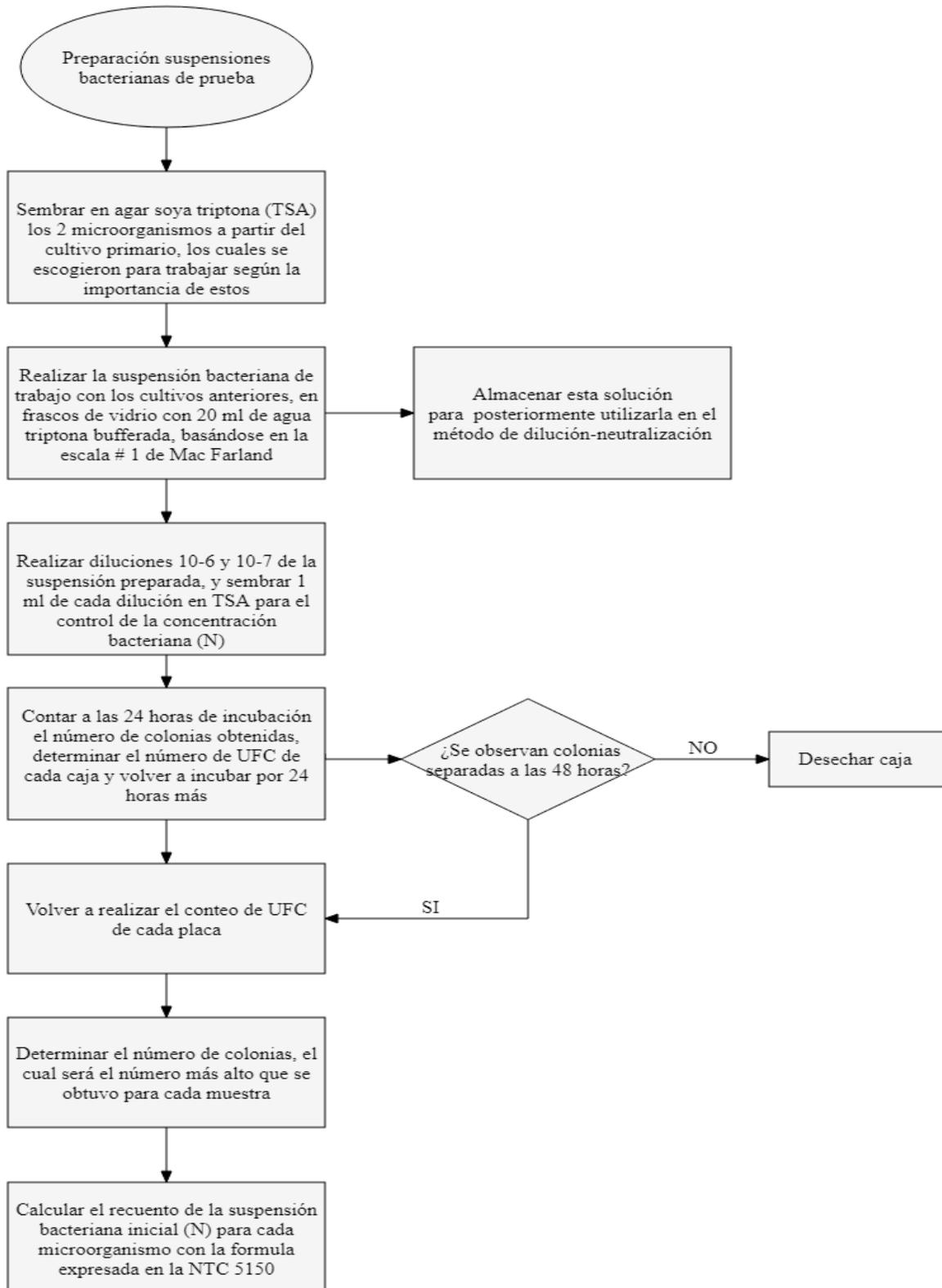
13. Anexos

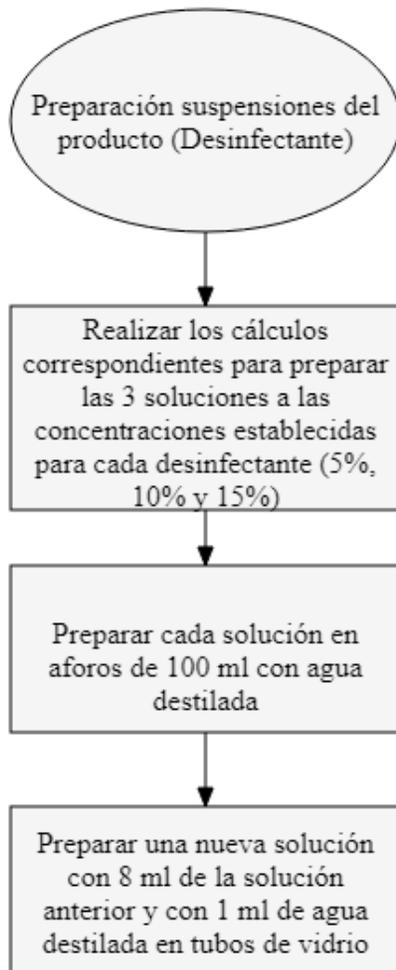
13.1 Anexo 1. Diagramas de flujo del diseño metodológico

13.1.1 Aislamiento e identificación de los microorganismos presentes en las superficies

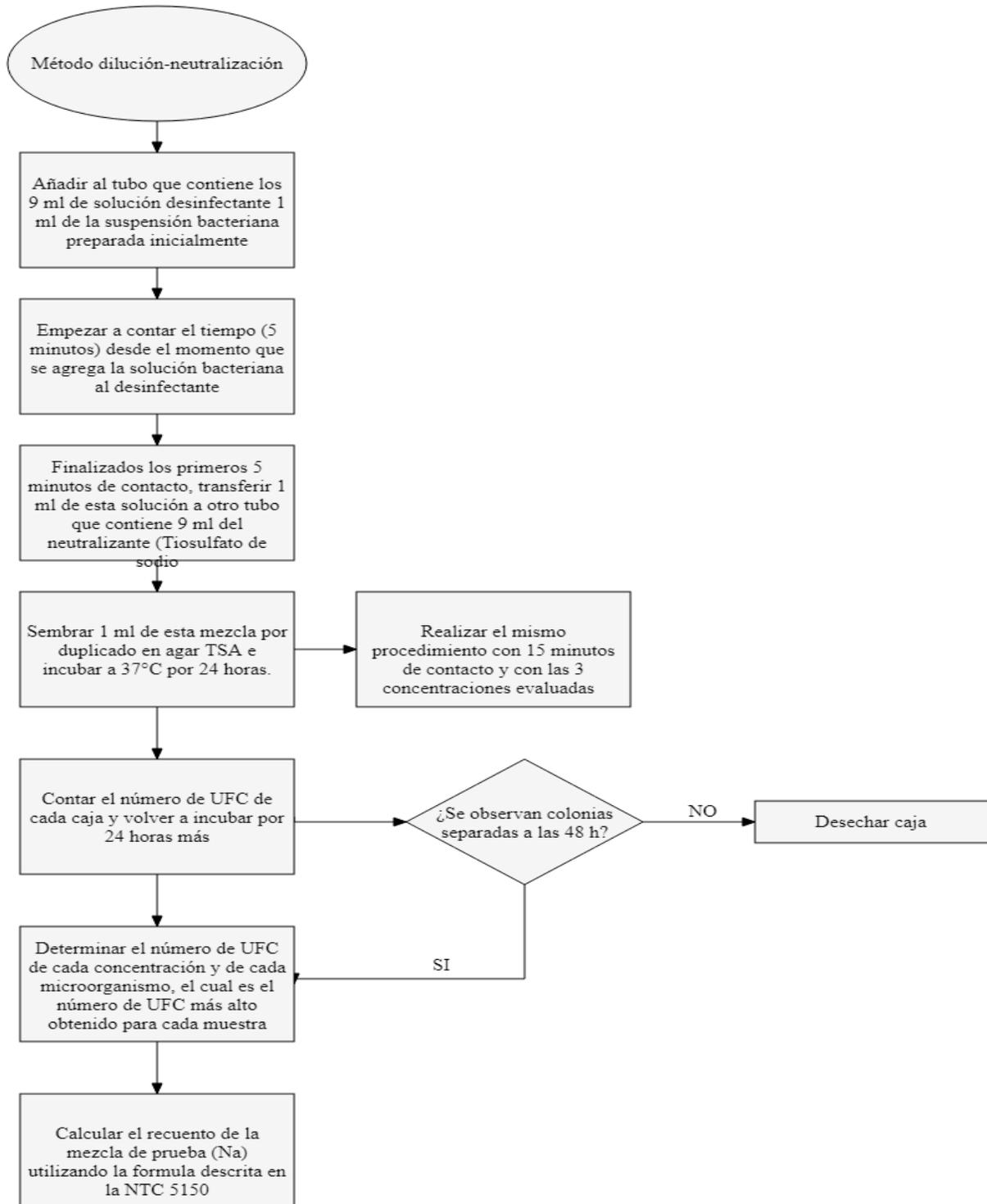


13.1.2 Preparación de suspensiones bacterianas y solución de los productos sometidos a prueba

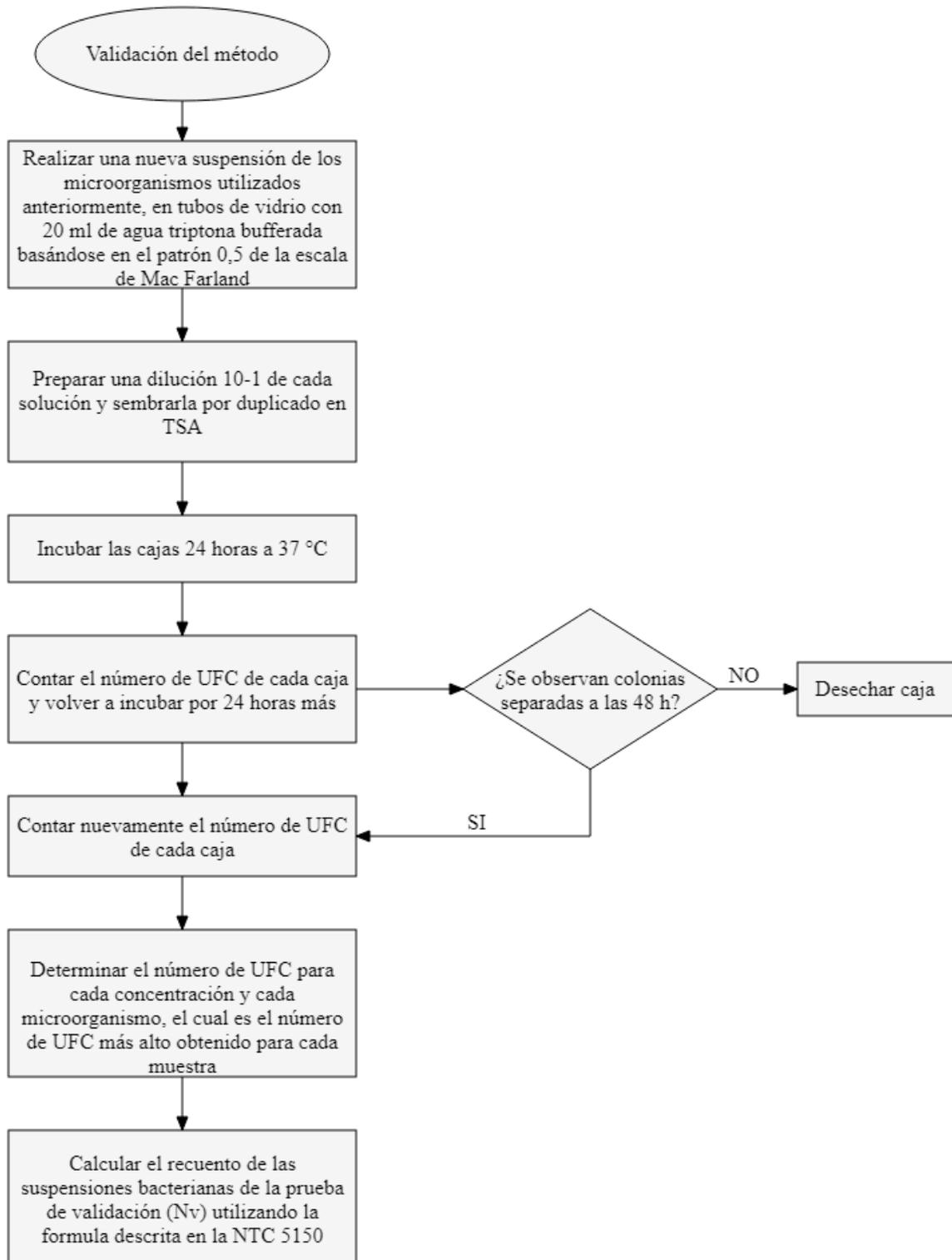


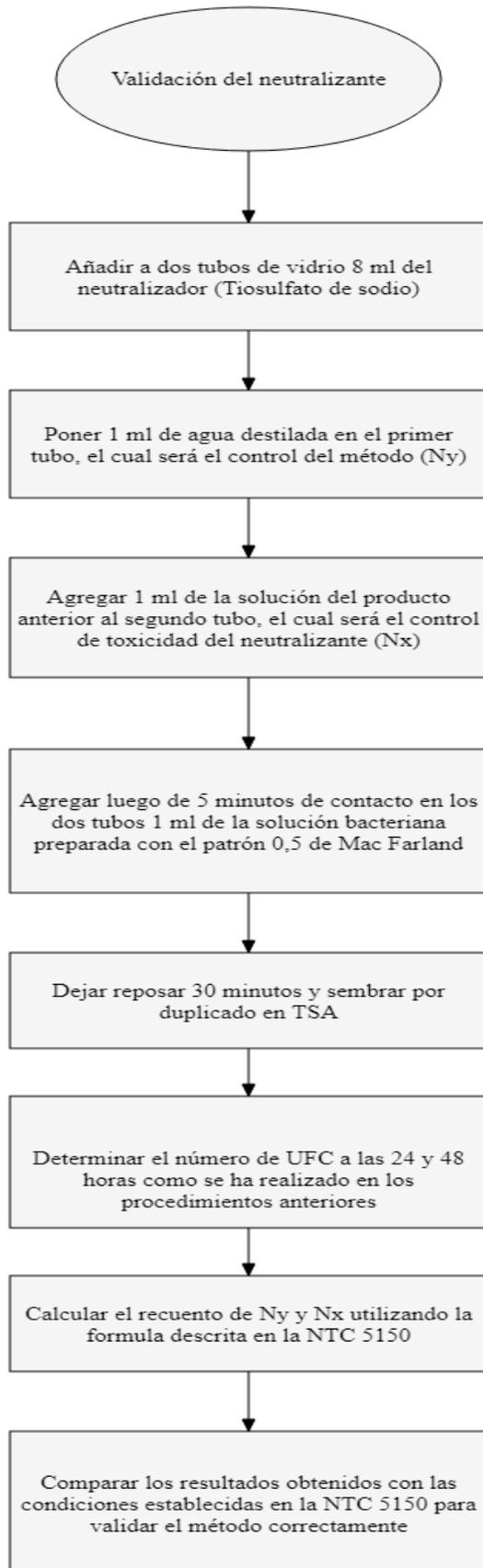


13.1.3 Método de dilución-neutralización

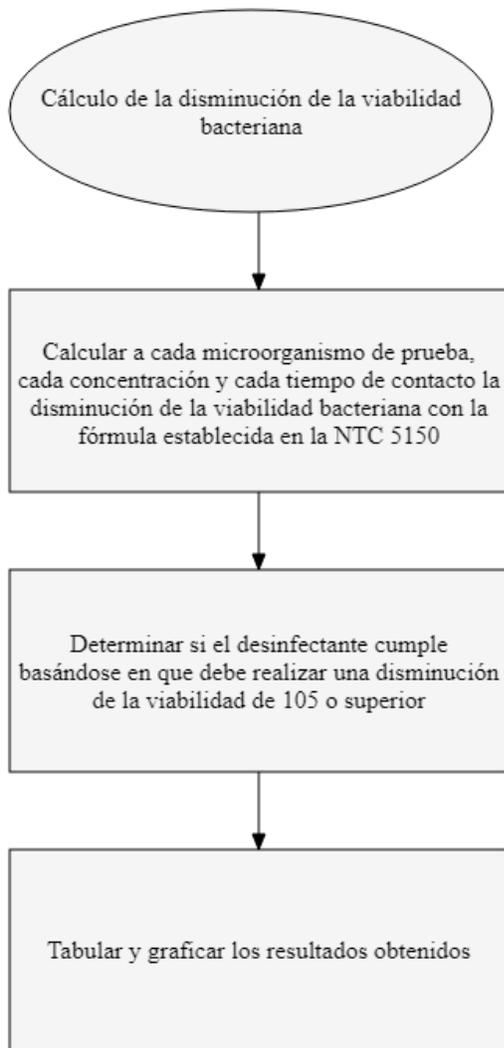


13.1.4 Validación del método





13.1.5 Cálculo de la disminución de la viabilidad bacteriana



13.2 Anexo 2. Carta de solicitud de permiso para toma de muestras



Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico

Bogotá, 19 de octubre de 2017

Señor

Gerente General

Asunto: permiso para toma de muestra de superficies de la planta de beneficio para evaluación del protocolo de desinfección como proyecto de grado

Con un atento saludo nos permitimos solicitar a usted como gerente general de la empresa I el permiso para que las estudiantes de VIII semestre del programa de Bacteriología y laboratorio clínico de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Katherinne Andrea Moreno Bermudez identificada con c.c 1'020.772.237 y Paula Fernanda Oliveros Betancurt identificada con c.c 1'032.489.265, ingresen a la planta para realizar la recolección de información y toma de muestras requeridas para el desarrollo de su trabajo de grado, titulado Evaluación de la efectividad del protocolo de desinfección utilizado en una planta de beneficio de aves ubicada en Bogotá.

Agradecemos su atención

Cordialmente,

Carmen Cecilia Almonacid U
Ph.D Carmen Cecilia Almonacid Urrego
Decana de la Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Lucía Constanza Corrales
Msc Lucía Constanza Corrales
Docente investigadora
Facultad Ciencias de la Salud

Recibido - RRHH.
20 - Octubre 2017

13.3 Anexo 3. Protocolo de rotación de desinfectantes