



**Universitat Autònoma de Barcelona**

Evaluación de metodologías de control higiénico de superficies alimentarias y  
adaptación de la PCR en tiempo real como método de control de patógenos

Dora Isela Salas Vázquez

**Tesis Doctoral**

Memoria presentada al *Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la  
Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona*

para optar al grado de doctora en

**Ciencias de los alimentos**

Noviembre, 2007  
Bellaterra (Barcelona)



JOSÉ JUAN RODRÍGUEZ JEREZ, profesor titular del área de nutrición y bromatología del *Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinaria de la Universitat Autònoma de Barcelona*,

Informa:

Que la memoria titulada **Evaluación de metodologías de control higiénico de superficies alimentarias y adaptación de la PCR en tiempo real como método de control de patógenos**, presentada por Dora Isela Salas Vázquez para optar al grado de doctora por la *Universitat Autònoma de Barcelona*, ha sido realizada bajo su dirección y considerándola finalizada, autoriza su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Bellaterra, a 12 de noviembre de 2007.

José Juan Rodríguez Jerez



## Dedicatoria

*“A la persona que no ha podido acompañarme físicamente en el logro de las metas trazadas, pero que llevo presente en todo momento porque ha sido la impulsora de mi vida y cada día continua fortaleciendo mi espíritu...mi madre”*



## Agradecimientos

Primeramente mencionar que la realización de este doctorado ha sido posible gracias a la beca que me otorgó *l'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) dentro del Programe de beques de formació d'investigadors predoctorals per a estudiants internacionals associades a programes de doctorat consolidat reconeguts per la Generalitat de Catalunya* (FI-IQUC).

En segundo lugar, expreso mi sincero agradecimiento al Dr. José Juan Rodríguez Jerez por dirigirme en esta etapa de mi actividad profesional, por la confianza depositada y particularmente por todo el apoyo brindado desde el primer momento.

En tercer lugar, a los coordinadores del programa de doctorado, a la Dra. Manuela Hernández y al Dr. Antonio Trujillo, por haber tenido la sutileza de conservar aquel primer *mail* que escribí desde México en el 2002, pues gracias a esto me otorgaron la oportunidad de optar a ésta beca y por consecuencia iniciar este doctorado.

A las personas que amablemente participaron con su experiencia y conocimientos en la revisión de este documento, gracias por las sugerencias y aportaciones realizadas...han sido para mi un apoyo, tanto profesional como moralmente.

A todos mis compañeros con quienes he tenido la fortuna de compartir el despacho, un breve espacio con tantos momentos de complicidad, que aunque pequeño, ha dado como frutos fuertes lazos de amistad...a los que estuvieron y a los que están, gracias por la compañía, la comprensión y el cariño.

A todos los compañeros del departamento con quienes, dentro y fuera de sus instalaciones, he convivido durante éstos cuatro años en agradable compañía, disfrutando las horas de trabajo en el laboratorio, además de tantas fechas, con o sin motivo de celebración, acompañadas de inolvidables pica-pica...gracias.

A todo el personal docente del *Departament de Ciència Animal i dels Aliments* que de manera, directa o indirecta, han contribuido en mi desarrollo profesional...mi sincero agradecimiento.

*Al Personal d'Administració i Serveis* por su disponibilidad y amabilidad en la realización de trámites o por la ayuda incondicional y tolerancia en momentos tan cruciales durante el trabajo de laboratorio.

A todo el personal de la industria alimentaria y el supermercado, porque parte de esta tesis ha sido posible a su trabajo diario...gracias por la paciencia y la colaboración que nos brindaron.

A las personas que he tenido la oportunidad de conocer en este continente, con quienes he compartido y experimentado momentos únicos e irrepetibles, envueltos de sentimientos tan diversos y especiales, y que han construido para mi un soporte con su amistad, cariño y amor...gracias por enriquecerme y formar parte de mi experiencia de vida.

A las personas importantes de mi vida, que desde que emprendí este viaje han estado tan lejos, y a la vez tan cerca de mi, contribuyendo con sus muestras de cariño y amor, facilitándome el avance en esta carrera por la vida, gracias por seguir mis pasos, por el arte de saber escuchar cuando lo he necesitado, por las dulces palabras de aliento, por mostrar siempre la mejor disposición para ayudarme en todos los aspectos, reciban toda mi gratitud, cariño y amor....familia y amistades entrañables, gracias por creer en mi.

## Índice de contenidos

Lista de abreviaturas y acrónimos .....	xi
Lista de Figuras .....	xiii
Lista de Tablas .....	xv
Resumen .....	xvii
Resum.....	xix
Abstract.....	xxi
<b>I. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>II. Objetivos.....</b>	<b>5</b>
<b>III. Revisión bibliográfica.....</b>	<b>9</b>
1. <b>Importancia e incidencia mundial de las enfermedades por patógenos de origen alimentario.....</b>	<b>11</b>
2. <b>Contaminación microbiana de los alimentos.....</b>	<b>12</b>
3. <b>Higienización en la industria alimentaria.....</b>	<b>15</b>
<b><i>3.1. Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control.....</i></b>	<b><i>16</i></b>
<b><i>3.2. Superficies de contacto con alimentos.....</i></b>	<b><i>16</i></b>
<b><i>3.3. Operaciones sanitarias en la industria alimentaria.....</i></b>	<b><i>17</i></b>
3.3.1. <i>Limpieza.....</i>	17
3.3.2. <i>Desinfección .....</i>	20
3.3.3. <i>El secado de las superficies posterior a la higienización .....</i>	22
<b><i>3.4. Valoración de la eficacia desinfectante.....</i></b>	<b><i>24</i></b>
3.4.1. <i>Respuestas de adaptación o resistencia a desinfectantes.....</i>	27
4. <b>Incidencia de cepas resistentes en la industria alimentaria.....</b>	<b>29</b>
5. <b>Biofilms en la industria alimentaria .....</b>	<b>31</b>
<b><i>5.1. Importancia de los biofilms.....</i></b>	<b><i>31</i></b>
5.1.1. <i>Adherencia bacteriana .....</i>	32
5.1.2. <i>Etapas en la formación del biofilm.....</i>	33
5.1.3. <i>Factores que afectan la estructura del biofilm.....</i>	34

5.1.4. <i>Resistencia biocida del biofilm</i> .....	37
6. Establecimiento de criterios de aceptación para la validación de la limpieza y desinfección.....	39
<b><i>6.1. Importancia del método de muestreo e identificación de puntos críticos de control</i></b> .....	<b>39</b>
7. Métodos de verificación para el control microbiológico e higiénico de superficies.....	39
<b><i>7.1. Aplicación de los métodos clásicos</i></b> .....	<b>40</b>
7.1.1. <i>Hisopado</i> .....	40
7.1.2. <i>Aplicación-impronta</i> .....	41
7.1.3. <i>Agua de enjuague</i> .....	42
<b><i>7.2. Aplicación de los métodos rápidos</i></b> .....	<b>42</b>
7.2.1. <i>Pruebas inmunológicas</i> .....	43
7.2.2. <i>Pruebas enzimáticas</i> .....	44
7.2.3. <i>Microscopía de epifluorescencia directa</i> .....	46
<b><i>7.3. Métodos basados en la amplificación molecular</i></b> .....	<b>51</b>
7.3.1. <i>PCR convencional</i> .....	52
7.3.2. <i>PCR en tiempo real</i> .....	54
IV. Evaluación de metodologías de control higiénico de superficies alimentarias.....	65
1. Material y métodos.....	67
<b><i>1.1. Plan de trabajo</i></b> .....	<b>67</b>
<b><i>1.2. Características de las instalaciones</i></b> .....	<b>68</b>
1.2.1. <i>Industria alimentaria</i> .....	68
1.2.2. <i>Supermercado</i> .....	68
<b><i>1.3. Plan de muestreo</i></b> .....	<b>69</b>
1.3.1. <i>Industria alimentaria</i> .....	70
1.3.2. <i>Supermercado</i> .....	71
<b><i>1.4. Descripción de las metodologías de control higiénico de las superficies</i></b> .....	<b>72</b>
1.4.1. <i>Recuento en placa de mesófilos aerobios por cultivo convencional (RP-convencional)</i> .....	72
1.4.2. <i>Recuento en placa de mesófilos aerobios por estriado directo (RP-estriado)</i> .....	72

1.4.3. Recuento en placa de mesófilos aerobios por siembra del disco (RP-disco).....	72
1.4.4. Recuento de mesófilas aerobios en placas de contacto Petrifilm (PPF).....	72
1.4.5. Detección de ATP por bioluminiscencia (ATP).....	73
1.4.6. Recuento por microscopía de epifluorescencia directa (R-DEM).....	73
<b>1.5. Análisis de algunos patógenos de interés alimentario y recuento total de enterobacterias.....</b>	<b>74</b>
1.5.1. Recuento de estafilococos coagulasa positiva .....	74
1.5.2. Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	74
1.5.3. Detección de <i>Salmonella spp.</i> .....	74
1.5.4. Recuento total de enterobacterias.....	75
<b>1.6. Identificación de la microbiota .....</b>	<b>75</b>
<b>1.7. Análisis estadístico .....</b>	<b>75</b>
<b>2. Resultados y discusión.....</b>	<b>76</b>
<b>2.1. Industria alimentaria.....</b>	<b>76</b>
2.1.1. Estudio preliminar con placas de contacto Petrifilm para el recuento de mesófilos aerobios.....	76
2.1.2. Estudio comparativo con distintas metodologías .....	77
<b>2.2. Supermercado.....</b>	<b>87</b>
2.2.1. Estudio preliminar con placa de contacto Petrifilm para el recuento de mesófilos aerobios.....	87
2.2.2. Estudio comparativo con distintas metodologías .....	89
2.2.3. Análisis de algunos patógenos de interés alimentario y recuento total de enterobacterias.....	101
<b>2.3. Discusión general .....</b>	<b>105</b>
<b>V. Adaptación de la PCR en tiempo real como método de control de patógenos en superficies .....</b>	<b>109</b>
<b>1. Puesta a punto de PCR en tiempo real en la detección de <i>Salmonella Typhimurium</i> y <i>Listeria monocytogenes</i>. Efecto del medio de pre-enriquecimiento adicionado de Tween 80.....</b>	<b>111</b>
<b>1.1. Material y métodos.....</b>	<b>111</b>
1.1.1. Plan de trabajo.....	111
1.1.2. Cepas bacterianas y preparación de subcultivos.....	112
1.1.3. Determinación de la sensibilidad y eficacia del análisis de RTi-PCR .....	112

1.1.4.	<i>Análisis de PCR en tiempo real</i> .....	112
1.1.5.	<i>Análisis estadístico</i> .....	115
<b>1.2.</b>	<b><i>Resultados y discusión</i></b> .....	<b>116</b>
1.2.1.	<i>Sensibilidad de iQCheck kits RTi-PCR</i> .....	116
1.2.2.	<i>Eficiencia de la PCR</i> .....	117
<b>2.</b>	<b>Comparación de la PCR en tiempo real y el método inmunoenzimático VIDAS en la detección de <i>Salmonella</i> Typhimurium y <i>Listeria monocytogenes</i> a partir de superficies no porosas de acero inoxidable</b> .....	<b>121</b>
<b>2.1.</b>	<b><i>Material y métodos</i></b> .....	<b>121</b>
2.1.1.	<i>Plan de trabajo</i> .....	121
2.1.2.	<i>Cepas bacterianas y preparación de subcultivos</i> .....	122
2.1.3.	<i>Inoculación de las superficies de trabajo</i> .....	122
2.1.4.	<i>Desarrollo de biofilms</i> .....	123
2.1.5.	<i>Condición de estrés aplicada al biofilm</i> .....	123
2.1.6.	<i>Procedimiento de pre-enriquecimiento</i> .....	123
2.1.7.	<i>Métodos de detección de microorganismos</i> .....	124
2.1.8.	<i>Análisis estadístico</i> .....	125
<b>2.2.</b>	<b><i>Resultados y discusión</i></b> .....	<b>126</b>
2.2.1.	<i>Desarrollo de biofilms</i> .....	126
2.2.2.	<i>Efecto de la condición de estrés aplicada al biofilm</i> .....	127
2.2.3.	<i>Efecto del medio de pre-enriquecimiento en la recuperación de células viables</i> .....	130
2.2.4.	<i>Comparación de RTi-PCR vs. el método inmunoenzimático VIDAS</i> .....	136
2.2.5.	<i>Degradación de ADN en superficies</i> .....	140
<b>3.</b>	<b>Comparación de la PCR en tiempo real y el método de cultivo convencional en la detección de <i>Salmonella</i> Typhimurium y <i>Listeria monocytogenes</i> a partir de superficies no porosas de acero inoxidable</b> .....	<b>141</b>
<b>3.1.</b>	<b><i>Material y métodos</i></b> .....	<b>141</b>
3.1.1.	<i>Plan de trabajo</i> .....	141
3.1.2.	<i>Cepas bacterianas y preparación de la suspensión bacteriana</i> .....	142
3.1.3.	<i>Inoculación de las superficies de trabajo</i> .....	142
3.1.4.	<i>Condición de estrés</i> .....	142
3.1.5.	<i>Procedimiento de pre-enriquecimiento</i> .....	143

3.1.6. <i>Recuperación de microorganismos</i> .....	143
3.1.7. <i>Métodos de detección de micoorganismos</i> .....	144
3.1.8. <i>Análisis estadístico</i> .....	144
<b>3.2. <i>Resultados y discusión</i>.....</b>	<b>146</b>
3.2.1. <i>Efecto de la condición de estrés</i> .....	146
3.2.2. <i>Efecto del medio de pre-enriquecimiento</i> .....	146
3.2.3. <i>Recuperación de microorganismos</i> .....	147
3.2.4. <i>Comparación de la RTi-PCR vs. el método de cultivo convencional (ISO)</i> .....	147
<b>4. <i>Discusión general</i>.....</b>	<b>154</b>
<b>VI. <i>Conclusiones</i>.....</b>	<b>157</b>
<b>VII. <i>Referencias bibliográficas</i>.....</b>	<b>161</b>



## Lista de abreviaturas y acrónimos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
APPCC	Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Trifosfato de adenosina
BAM	<i>Bacteriological Analytical Manual</i> (Manual de análisis bacteriológicos)
BDC	<i>Buoyant density centrifugation</i> (centrifugación con diferentes gradientes de densidad)
CCUG	<i>Culture Collection, University of Göteborg</i> (Colección de cultivos de la Universidad de Göteborg)
CEN	Comité Europeo de Normalización
CIP	<i>Clean in place</i> (Limpieza <i>in situ</i> )
CLSM	<i>Confocal laser scanning microscopy</i> (Microscopía laser confocal)
Ct	<i>Threshold cycle</i> (ciclo umbral)
CTC	5-ciano-2,3-ditolil tetrazolio
DABCYL	Ácido 4-[4-(dimetilamino) fenil]-azo] benzoico
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DE	Desviación estándar
DEFT	Técnica de microscopía de epifluorescencia directa por filtración
DEM	<i>Direct epifluorescence microscopic</i> (Microscopía de epifluorescencia directa)
DFraser-T80	Caldo Demi-Fraser adicionado con 1 g/l de Tween 80 (p/v)
dNTP 's	Desoxinucleótidos de trifosfatos
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ee	error estándar
ELFA	<i>Enzyme-Linked Fluorescent Assay</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EN	Norma europea
EPS	Sustancias poliméricas extracelulares
FAM	6-carboxifluoresceína
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administración de Drogas y Alimentos)

FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> (transferencia de energía de resonancia fluorescente)
FTI	<i>Flow-Through Immunocapture</i> (Inmunocaptura mediante flujo continuo)
GMP's	<i>Good Manufacturing Practices</i> (Buenas prácticas de fabricación)
ISO	<i>International Organization Standardization</i> (Organización Internacional de Normalización)
MB	<i>Molecular beacon</i> (baliza molecular)
MGB	<i>Minor Groove Binder</i>
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i> (concentración mínima inhibitoria)
NFQ	<i>Non fluorescent quencher</i> (Inhibidor no fluorescente)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampón salino fosfato)
PCA	<i>Plate count agar</i> (agar de recuento en placa)
PCC	Puntos críticos de control
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
PPF	Placa de contacto Petrifilm™
PVC	<i>Polyvinyl Chloride</i> (Cloruro de polivinilo)
quats	Compuestos de amonio-cuaternarios
RMA	Recuento de mesófilos aerobios
RTi-PCR	<i>Real time PCR</i> (PCR en tiempo real)
<i>Taq</i>	<i>Termus aquaticus</i>
T <sub>m</sub>	<i>Melting temperatura</i> (temperatura de fusión)
TSAYE	Caldo triptona soja con 6 g/l de extracto de levadura
TSAYE-T80	Caldo triptona soja con 6 g/l de extracto de levadura + 1 g/l de Tween 80
UFC	Unidades formadoras de colonias
URL	Unidades relativas de luz
VBNC	<i>Viable, but non-culturable</i> (viables, pero no cultivables)
VIDAS	Sistema de inmunodiagnóstico automatizado

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Desarrollo de la estructura de un biofilm.....	34
<b>Figura 2.</b> Principio de fluorescencia.....	47
<b>Figura 3.</b> Componentes principales de un microscopio de luz incidente o epifluorescencia. ....	48
<b>Figura 4.</b> Diseño de sondas molecular beacons.....	57
<b>Figura 5.</b> Esquema del plan de trabajo en la industria alimentaria y en el supermercado.....	67
<b>Figura 6.</b> Superficies de trabajo del supermercado. ....	69
<b>Figura 7.</b> Recuento de mesófilos aerobios ( $\log_{10}$ UFC/100cm <sup>2</sup> ) en las superficies de trabajo de la industria alimentaria utilizando placas de contacto Petrifilm en el estudio preeliminar.....	76
<b>Figura 8.</b> Nivel de contaminación global en las superficies de la industria alimentaria en función de la metodología utilizada para el recuento de mesófilos aerobios ( $\log_{10}$ UFC/100cm <sup>2</sup> ) y la detección de ATP por bioluminiscencia ( $\log_{10}$ URL/100cm <sup>2</sup> ).....	77
<b>Figura 9.</b> Recuento de mesófilos aerobios ( $\log_{10}$ UFC/100cm <sup>2</sup> ) en las superficies del supermercado utilizando placas de contacto Petrifilm en el estudio preeliminar.....	87
<b>Figura 10.</b> Distribución y clasificación de las superficies de trabajo del supermercado por secciones (de acuerdo al producto manipulado).....	88
<b>Figura 11.</b> Nivel de contaminación global en las superficies del supermercado en función de la metodología utilizada para el recuento de mesófilos aerobios ( $\log_{10}$ UFC/100cm <sup>2</sup> ) y la detección de ATP por bioluminiscencia ( $\log_{10}$ URL/100cm <sup>2</sup> ).....	89
<b>Figura 12.</b> Biofilms desarrollados naturalmente sobre los discos de acero inoxidable adheridos a las superficies del supermercado. ....	95
<b>Figura 13.</b> Nivel de contaminación de las superficies en el supermercado en función de la sección de trabajo por las metodologías utilizadas para el recuento de mesófilos aerobios ( $\log_{10}$ UFC/100cm <sup>2</sup> ) y la detección de ATP por bioluminiscencia ( $\log_{10}$ URL/100cm <sup>2</sup> ).....	97
<b>Figura 14.</b> Esquema del plan de trabajo del experimento 1 (sección V).....	111
<b>Figura 15.</b> Curvas de amplificación (número de ciclo vs. unidades relativas de fluorescencia) obtenidas en el equipo Chromo4™ Real Time System usando el software Opticon Monitor versión 3.1.....	115
<b>Figura 16.</b> Curvas estándar generada con los valores de Threshold cycle para las diluciones decimales de <i>S. Typhimurium</i> CCUG 29478 en TSBYE-T80 (10 <sup>2</sup> a 10 <sup>7</sup> ).....	116
<b>Figura 17.</b> Curvas estándar generada con los valores de Threshold cycle para las diluciones decimales de <i>L. monocytogenes</i> CCUG 15526 en DFraser-T80 (10 <sup>2</sup> a 10 <sup>6</sup> ). ....	117
<b>Figura 18.</b> Esquema del plan de trabajo del experimento 2 (sección V).....	121
<b>Figura 19.</b> Biofilms de <i>S. Typhimurium</i> CCUG 29478 y <i>L. monocytogenes</i> CCUG 15526 desarrollados con humedad relativa elevada durante 72 h sobre superficies no porosas de acero inoxidable.....	127

<b>Figura 20.</b> Biofilms de <i>S. Typhimurium</i> CCUG 29478 (izquierda) y <i>L. monocytogenes</i> CCUG 15526 (derecha) sobre superficies no porosas de acero inoxidable después diferentes tiempos de exposición a sequedad con flujo laminar a 28 – 30 °C.. .....	129
<b>Figura 21.</b> Comparación de la microscopía de epifluorescencia directa (DEM) y el recuento en placa (TSAYE) en la detección células viables de biofilms de <i>S. Typhimurium</i> CCUG 29478 y <i>L. monocytogenes</i> CCUG 15526 a partir de superficies no porosas de acero inoxidable después de la exposición a sequedad.....	130
<b>Figura 22.</b> Efecto del medio de pre-enriquecimiento en la recuperación de células viables (TSAYE) del biofilm de <i>S. Typhimurium</i> CCUG 29478 a partir de superficies no porosas de acero inoxidable después de la exposición a sequedad con diferentes tiempos de pre-enriquecimiento.....	134
<b>Figura 23.</b> Efecto del medio de pre-enriquecimiento en la recuperación de células viables (TSAYE) del biofilm de <i>L. monocytogenes</i> CCUG 15526 a partir de superficies no porosas de acero inoxidable después de la exposición a sequedad con diferentes tiempos de pre-enriquecimiento.. .....	135
<b>Figura 24.</b> Esquema del plan de trabajo del experimento 3 (sección V).....	141
<b>Figura 25.</b> Regresión lineal entre los recuentos de células viables en TSAYE y los valores de Ct obtenidos para <i>S. Typhimurium</i> CCUG 29478 detectada a partir de superficies no porosas de acero inoxidable.....	150

## Lista de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Brotes originados por bacterias patógenas asociados a un manejo inadecuado, principalmente por contaminación cruzada e higiene insuficiente, y a diversos factores ambientales.....	15
<b>Tabla 2.</b> Factores que contribuyen a una limpieza total en un programa de seguridad alimentaria. ....	19
<b>Tabla 3.</b> Los principales tipos de desinfectantes aprobados para su uso en la industria alimentaria, mecanismos de acción y limitaciones. ....	23
<b>Tabla 4.</b> Valoraciones y métodos para evaluar la viabilidad celular. ....	49
<b>Tabla 5.</b> Metodologías publicadas basadas en la PCR en tiempo real para las bacterias patógenas más representativas de las enfermedades transmitidas por los alimentos. ....	62
<b>Tabla 6.</b> Programa de higienización aplicado a las superficies de trabajo de la industria alimentaria. ....	69
<b>Tabla 7.</b> Programa de higienización aplicado a las superficies de trabajo del supermercado. ....	69
<b>Tabla 8.</b> Identificación de las 30 superficies de trabajo seleccionadas para el estudio comparativo en el supermercado. ....	71
<b>Tabla 9.</b> Conformidad de las superficies de la industria alimentaria para las distintas metodologías en función del valor medio de RP-convencional como límite satisfactorio. ....	79
<b>Tabla 10.</b> Límites críticos estandarizados para las metodologías evaluadas en las superficies de la industria alimentaria.....	83
<b>Tabla 11.</b> Nivel de contaminación en las superficies de la industria alimentaria en función del proceso de secado por las metodologías utilizadas para el recuento de mesófilos aerobios ( $\log_{10}$ UFC/100cm <sup>2</sup> ) y la detección de ATP por bioluminiscencia ( $\log_{10}$ URL/100cm <sup>2</sup> ).....	85
<b>Tabla 12.</b> Nivel de contaminación en las superficies de la industria alimentaria en función del ensayo por las metodologías utilizadas para el recuento de mesófilos aerobios ( $\log_{10}$ UFC/100cm <sup>2</sup> ) y la detección de ATP por bioluminiscencia ( $\log_{10}$ URL/100cm <sup>2</sup> ).....	86
<b>Tabla 13.</b> Conformidad de las superficies del supermercado para las distintas metodologías en función del valor medio de RP-convencional como límite satisfactorio. ....	91
<b>Tabla 14.</b> Límites críticos estandarizados para las metodologías evaluadas en las superficies del supermercado. ....	96
<b>Tabla 15.</b> Nivel de contaminación de las superficies en el supermercado en función de la temperatura de conservación del producto por las metodologías utilizadas para el recuento de mesófilos aerobios ( $\log_{10}$ UFC/100cm <sup>2</sup> ) y la detección de ATP por bioluminiscencia ( $\log_{10}$ URL/100cm <sup>2</sup> ).....	99
<b>Tabla 16.</b> Nivel de contaminación de las superficies en el supermercado en función del tipo de material por las metodologías utilizadas para el recuento de mesófilos aerobios	

(log <sub>10</sub> UFC/100cm <sup>2</sup> ) y la detección de ATP por bioluminiscencia (log <sub>10</sub> URL/100cm <sup>2</sup> ).....	100
<b>Tabla 17.</b> Nivel de contaminación en las superficies del supermercado en función de la replica por las metodologías utilizadas para el recuento de mesófilos aerobios (log <sub>10</sub> UFC/100cm <sup>2</sup> ) y la detección de ATP por bioluminiscencia (log <sub>10</sub> URL/100cm <sup>2</sup> ).....	101
<b>Tabla 18.</b> Microflora aislada e identificada a partir del medio VRBGA utilizado para el recuento total de enterobacterias.....	104
<b>Tabla 19.</b> Valores de Ct para los distintos medios de pre-enriquecimiento, con o sin Tween 80.....	117
<b>Tabla 20.</b> Efecto de la exposición a sequedad en el tamaño de las células de <i>S. Typhimurium</i> CCUG 29478 y <i>L. monocytogenes</i> CCUG 15526 provenientes del biofilm desarrollado con humedad relativa elevada durante 72 h sobre superficies no porosas de acero inoxidable.....	128
<b>Tabla 21.</b> Comparación del método inmunoenzimático VIDAS ICS/SLM y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RTi-PCR) en la detección de <i>S. Typhimurium</i> a partir un biofilm desarrollado en superficies no porosas de acero inoxidable después de diferentes tiempos de exposición a sequedad y a distintos tiempos de pre-enriquecimiento en TSBYE-T80.....	137
<b>Tabla 22.</b> Comparación del método inmunoenzimático VIDAS LMO2 y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RTi-PCR) en la detección de <i>L. monocytogenes</i> a partir un biofilm desarrollado en superficies no porosas de acero inoxidable después de diferentes tiempos de exposición a sequedad y a distintos tiempos de pre-enriquecimiento en DFraser-T80 y TSBYE-T80.....	139
<b>Tabla 23.</b> Comparación del método de cultivo convencional (ISO 6579) y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RTi-PCR) en la detección de <i>S. Typhimurium</i> a partir de superficies no porosas de acero inoxidable con diferentes niveles de contaminación a distintos tiempos de pre-enriquecimiento y por dos métodos de recuperación.....	149
<b>Tabla 24.</b> Comparación del método de cultivo convencional (ISO 11290-1) y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RTi-PCR) en la detección de <i>L. monocytogenes</i> a partir de superficies no porosas de acero inoxidable con diferentes niveles de contaminación a distintos tiempos de pre-enriquecimiento y por dos métodos de recuperación.....	152

## Resumen

Los programas de control de calidad microbiológica cada vez se aplican más a lo largo de la producción de la cadena alimentaria, siendo uno de ellos el programa de higienización. El propósito de los procedimientos de limpieza y desinfección es la destrucción de los microorganismos alterantes y de los patógenos de las superficies y del medio ambiente, para reducir el riesgo de la contaminación del alimento y evitando así la infección para los consumidores. Por lo tanto, para evaluar un programa de limpieza y desinfección es necesario muestrear las superficies y establecer los niveles residuales de contaminación. Existen diversos métodos para evaluar la contaminación microbiana de las superficies. Sin embargo, no hay un consenso para que un método estándar sea aceptado, debido a las ventajas y desventajas que presentan. Aún así, para la industria alimentaria, cada vez es más importante disponer de sistemas, rápidos y confiables para detectar la contaminación microbiana o incluso la presencia o ausencia de patógenos.

En este estudio se usaron diferentes metodologías de control higiénico para vigilar y verificar la contaminación microbiana de superficies alimentarias. Para ello, se eligieron dos instalaciones diferentes con la finalidad de comparar las diferencias en base a los protocolos de limpieza-desinfección. Se evaluaron superficies en una industria alimentos deshidratados con un programa de higienización completo y en un supermercado con un tipo de higienización similar al empleado en el ámbito doméstico.

En ambas instalaciones, los mayores recuentos se obtuvieron a partir de los discos, de acero inoxidable, adheridos a las superficies durante una semana y analizados con DEM. La DEM fue la metodología más restrictiva. En la industria de alimentos deshidratados, las metodologías que seguidamente detectaron mayores recuentos fueron: la siembra del disco y el análisis de bioluminiscencia para la detección de ATP; mientras que en el supermercado fueron: el método de hisopado convencional y el análisis de bioluminiscencia para la detección de ATP. Conjuntamente, en ambas instalaciones se establecieron límites críticos estandarizados para cada metodología evaluada. En el supermercado, la presencia de patógenos como

*Salmonella* spp., *L. monocytogenes* y *S. aureus* (coagulasa positiva) fue negativa y el recuento de enterobacterias obtenido fue muy bajo (<1 UFC/cm<sup>2</sup>).

Además, se adaptó la PCR en tiempo real como método de control de patógenos (*Salmonella* Typhimurium y *L. monocytogenes*) en superficies de acero inoxidable en condiciones experimentales. La sensibilidad y eficacia de los kits iQCheck *Salmonella* e iQCheck *Listeria monocytogenes* fue demostrada utilizando caldo de soja triptona con 6 g/l de extracto de levadura (TSBYE) y Demi-Fraser (DFraser), respectivamente. Ambos medios de pre-enriquecimiento adicionados con Tween 80 como dispersante bacteriano. La sensibilidad de la PCR en tiempo real fue comparada con el método VIDAS a partir de biofilms y con el cultivo convencional (ISO) a partir de inóculos pequeños. La sensibilidad de la PCR en tiempo real fue mayor en ambos casos. La metodología propuesta podría ser una alternativa válida al método de cultivo convencional (ISO).

## Resum

Els programes de control de la qualitat microbiològica s'apliquen cada cop més al llarg de la cadena de producció alimentaria, un d'aquests programes és el de higienització. Els procediments de neteja i desinfecció tenen com a objectiu la destrucció dels microorganismes que alteren els aliments i els patògens de les superfícies i el medi ambient, per així reduir el risc de contaminació dels aliments i evitar una eventual infecció dels consumidors. Per avaluar un programa de neteja i de desinfecció es necessari mostrejar les superfícies i determinar els nivells residuals de contaminació. Existeixen diferents mètodes per avaluar la contaminació microbiana de les superfícies. Encara no existeix un consens per a l'acceptació d'un mètode estàndard' els diferents mètodes proposats presenten diferents avantatges i desavantatges. Per a la indústria alimentaria, cada cop és més important de disposar de sistemes ràpids i fiables per a la detecció de la contaminació microbiana i per a la detecció de la presència o absència de microorganismes patògens.

En aquest estudi es van utilitzar diferents metodologies de control higiènic per vigilar i verificar la contaminació microbiana en superfícies alimentàries. Per aquest motiu, es van escollir dos instal·lacions diferents per comparar els protocols de neteja-desinfecció. Les superfícies avaluades corresponien a una indústria d'aliments deshidratats amb un tractament d'higienització complet i en un supermercat amb un sistema d'higienització similar al que s'utilitza a les llars.

En ambdues instal·lacions els majors recomptes es van obtenir mitjançant discos d'acer inoxidable adherits a les superfícies que es mantenien durant una setmana i que posteriorment s'analitzaven per DEM. La DEM va ser la metodologia més restrictiva. En la indústria d'aliments deshidratats, les metodologies que a continuació van detectar més recomptes van ser la sembra del disc i l'anàlisi de bioluminescència per a la detecció de l'ATP; mentre que en el supermercat van ser el mètode del hisopat convencional i l'anàlisi de bioluminescència per a la detecció de l'ATP. Es van establir límits crítics estandarditzats per a les metodologies avaluades en les dues instal·lacions. En el supermercat, la presència

de patògens com *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* y *S. aureus* (coagulasa positiva) fou negativa i el recompte d'enterobacteries va ser molt baix (<1 UFC/cm<sup>2</sup>).

També es va portar a cap l'adaptació del PCR en temps real com a mètode de control de patògens (*Salmonella* Typhimurium y *L. monocytogenes*) en superfícies d'acer inoxidable en condicions experimentals. Es va demostrat la sensibilitat i l'eficàcia dels kits iQCheck *Salmonella* i iQCheck *Listeria monocytogenes* utilitzant un caldo de soja triptona amb 6 g/l d'extracte de llevat (TSBYE) i de Demi-Fraser (DFraser), respectivament. Els dos medis de pre enriquiment amb Tween 80 com a dispersant bacterià. La sensibilitat del PCR en temps real es va comparar amb el mètode VIDAS a partir de biofilms i del cultiu convencional (ISO) a partir d'inòculs petits. La sensibilitat del PCR en temps real fou superior en els dos cassos. La metodologia proposada podria ser una alternativa vàlida al mètode de cultiu convencional (ISO).

## Abstract

Microbiological quality control programs are becoming more common throughout all the stages of food production; sanitation is included among these programs. The purpose of cleaning and disinfection procedures is the destruction of spoilage microbes and pathogens from surfaces and the environment, in order to minimize the risk of contamination of food and thus avoiding infection for consumers. In order to assess a program of cleaning and disinfection it is necessary to sample surfaces to detect residual levels of contamination. There are lots of methods to enumerate microbial surface contamination. Nevertheless, there is no consensus on a standard method, because all of them have advantages and disadvantages. Still, for the food industry, the availability of reliable and rapid test systems to determine microbial contamination and the presence or absence of food-borne pathogens is becoming increasingly important.

In this study, different hygienic control methodologies were used to assess microbiological contamination of food surfaces. Two different installations were selected to compare the differences based on the protocols of cleaning and disinfection. The evaluation of the surfaces of installations was performed in a dehydrated food manufacturing industry which had a complete sanitation programme and in a supermarket which only used basic sanitation, comparable to household cleaning.

For both installations, the highest cell counts were obtained from the stainless steel coupons adhered to the surfaces for one week and analyzed with DEM. This was the most restrictive methodology. Direct spread of stainless steel coupons and bioluminescence assay for ATP determination were the methodologies that then showed higher cell counts in the food industry tested. Whereas, the conventional swab method and bioluminescence assay for ATP determination were the ones detecting higher cell counts at the supermarket. In both locations, standardized critical limits were established for each methodology. In the supermarket, the presence of pathogens such as *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* and *S. aureus* (coagulase positive) was negative and Enterobacteriaceae counts was very low (<1 UFC/cm<sup>2</sup>).

Real-time PCR assay was adapted to control food-borne pathogens such as *Salmonella* Typhimurium and *L. monocytogenes* on stainless steel surfaces in laboratory conditions. The sensitivity and efficiency of iQCheck *Salmonella* and iQCheck *Listeria monocytogenes* kits was demonstrated using triptic soy broth supplemented with 6 g/l of yeast extract (TSBYE) and Demi-Fraser (DFraser), respectively. Both pre-enrichment broths contained Tween 80 as dispersing agent for bacteria. The sensitivity of real-time PCR was tested using biofilms with VIDAS and traditional cultivation method (ISO) with small inocula levels. The sensitivity of real-time PCR was higher in both cases. The tested methodology could be a valid alternative to the conventional cultivation method (ISO).

## I. Introducción



Las enfermedades alimentarias transmitidas por patógenos bacterianos son una cuestión importante de seguridad alimentaria a nivel mundial (Bhagwat, 2003).

Los *brotos* a causa de enfermedades transmitidas por los alimentos son asociados a un manejo inadecuado, por contaminación cruzada e higiene insuficiente, y a diversos factores ambientales (Reij y Den Aantrekker, 2004), originando consecuencias adversas a la salud humana y a la economía. Debido a esto, un control eficaz de la higiene es de vital importancia. En la medida posible, el diseño y la disposición interna de los establecimientos alimentarios deben permitir las buenas prácticas de la higiene alimentaria, incluyendo la protección contra la contaminación cruzada (Codex Alimentarius, 2003).

La *contaminación cruzada* ocurre debido a la introducción de microorganismos, o agentes causantes de enfermedad, desde el alimento crudo al alimento listo para el consumo, haciéndolo inseguro para el consumidor (WHO, 2006b). Los microorganismos patógenos pueden introducirse en el proceso de elaboración, siendo transferidos de un alimento a otro, y llegar a los productos finales a través de diferentes vías (Maukonen *et al.*, 2003). Las *superficies de contacto con el alimento* son una de las vías de contaminación más frecuentes, tanto en la industria alimentaria, en la restauración colectiva, así como en el hogar (Kusumaningrum *et al.*, 2003). Por lo tanto, pueden representar un peligro significativo, especialmente si ha habido formación de agregados microbianos adheridos a las superficies de trabajo, conocidos como *biofilms* (Maukonen *et al.*, 2003).

La formación de *biofilms* sobre las superficies de la industria alimentaria es una respuesta de adaptación para prevenir los efectos adversos de limpiadores y desinfectantes (Bower y Daeschel, 1999). El incremento en la resistencia de las bacterias adheridas (Holah *et al.*, 1990), puede dar lugar a una recontaminación (contaminación post-proceso), que especialmente con patógenos puede ser una causa importante y frecuente de los brotes de enfermedades alimentarias (Reij y Den Aantrekker, 2004).

Una planta procesadora de alimentos contempla la implementación de un sistema de higiene, cuyo propósito es eliminar cualquier microorganismo patógeno y de alteración sobre todas las superficies de contacto alimentarias (Carsberg, 2003). Asimismo, el uso adecuado de productos limpiadores y desinfectantes efectivos sobre los microorganismos adheridos a las superficies es necesaria (Wirtanen y Salo, 2003). Cada proceso es único y para que un programa de la validación de la limpieza y desinfección sea exitoso, el desarrollo de los criterios de aceptación o rechazo, deben estar basados en el análisis de datos microbiológicos reales (PDA, 1998). Para ello, las técnicas de muestreo de superficies son imprescindibles (Fung, 2002).

Tradicionalmente la valoración de una superficie se realiza mediante métodos microbiológicos como el hisopado (con hisopos o esponjas) seguido de un cultivo microbiano, la aplicación-impronta y aguas de enjuague (PDA, 1998; Maukonen *et al.*, 2003). Los métodos tradicionales, aunque fiables y eficientes, requieren al menos varios días a una semana antes de que los resultados sean obtenidos (Malorny *et al.*, 2003b).

Sin embargo, para certificar la seguridad integral del abastecimiento de alimentos, se requieren de métodos contemporáneos (Chen, 2003) que permitan el control del proceso de elaboración y la vigilancia de la eficacia de los sistemas de higienización, para así poder aplicar las medidas correctoras oportunas (Holah *et al.*, 1988; Boer y Beumer, 1999).

La introducción de la PCR por laboratorios de investigación como una alternativa valiosa, está desplazando a los métodos de detección tradicionales. Actualmente, el uso de la PCR en tiempo real para la detección de patógenos se ha incrementado, debido a que proporciona la posibilidad de diagnósticos más rápidos y precisos (Malorny *et al.*, 2003b; Mackay, 2004).

Consecuentemente, la disponibilidad de sistemas de prueba rápidos y confiables se ha vuelto cada vez más importante para la industria alimentaria y la elección de un sistema u otro, debe priorizar las características de cada formato disponible, y por consiguiente, las necesidades de la facilidad e implementación de los métodos más prácticos (Malorny *et al.*, 2003a; Malorny *et al.*, 2003b; Gracias y McKillip, 2004).

## II. Objetivos



Los objetivos generales del presente trabajo de investigación fueron:

- La evaluación de metodologías de control higiénico de superficies alimentarias.
- La adaptación de la PCR en tiempo real como método de control de patógenos en superficies.

Los objetivos específicos del primer objetivo general fueron:

- a) Realizar un muestreo preliminar de las superficies de trabajo mediante placas de contacto.
- b) Establecer un plan de muestreo para las superficies de trabajo en base a los resultados preliminares y a la valoración del riesgo microbiológico.
- c) Evaluar el nivel de contaminación de mesófilos aerobios y de ATP por: i) recuento en placa por cultivo convencional, ii) recuento en placa por estriado directo, iii) recuento en placa por siembra directa de disco, iii) placas de contacto Petrifilm, iv) detección de ATP por bioluminiscencia y v) microscopía de epifluorescencia directa.
- d) Investigar la correlación entre metodologías y establecer límites de críticos para cada una de ellas.
- e) Evaluar la higiene de las superficies en función de diversos factores.
- f) Analizar algunos patógenos de interés alimentario y recuento total de enterobacterias. Además, de aislar e identificar la microbiota a partir de estos medios selectivos.

Para alcanzar estos objetivos específicos, se estudiaron las superficies de:

1. Una industria alimentaria con tratamiento higiénico completo.
2. Un supermercado como modelo del sistema de higienización doméstico.

Para desarrollar el segundo objetivo general nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- a) Puesta a punto de la PCR en tiempo real evaluando los kits iQCheck™ *Salmonella* e iQCheck™ *Listeria monocytogenes*.
- b) Evaluar la sensibilidad y eficacia de los kits usando medios de pre-enriquecimiento adicionados con Tween 80 como dispersante bacteriano.
- c) Establecer una metodología para la recuperación y detección de ambos patógenos a partir de superficies de acero inoxidable.
- d) Evaluar la sensibilidad de la PCR en tiempo real a partir de biofilms desarrollados sobre superficies de acero inoxidable.
- e) Evaluar la sensibilidad de la PCR en tiempo real a partir de inóculos pequeños sobre superficies de acero inoxidable contaminadas artificialmente.
- f) Evaluar los límites de detección de la PCR en tiempo real a distintos tiempos de pre-enriquecimiento con dos protocolos de recuperación: i) sin concentración y ii) concentrando por centrifugación.

Para alcanzar estos objetivos específicos nos planteamos tres estudios experimentales:

1. Puesta a punto de PCR en tiempo real en la detección de *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes*. Efecto del medio de pre-enriquecimiento adicionado de Tween 80.
2. Comparación de la PCR en tiempo real y el método inmunoenzimático VIDAS en la detección de *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes* a partir de superficies no porosas de acero inoxidable.
3. Comparación de la PCR en tiempo real y el método de cultivo convencional en la detección de *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes* a partir de superficies no porosas de acero inoxidable.

### III. Revisión bibliográfica



## 1. Importancia e incidencia mundial de las enfermedades por patógenos de origen alimentario

La seguridad alimentaria es una cuestión cada vez más importante para la salud pública, debido a que tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, las toxiinfecciones alimentarias, y especialmente las enfermedades diarreicas, constituyen significativamente una causa de morbilidad y mortalidad (WHO, 2007).

Las toxiinfecciones alimentarias pueden ser definidas como enfermedades comúnmente transmitidas a través de los alimentos y comprenden un amplio grupo de enfermedades causadas por bacterias patógenas, parásitos, contaminantes químicos y biotoxinas; además de las reacciones del cuerpo humano al propio microorganismo (WHO, 2006a; NIAID, 2007). Las enfermedades alimentarias transmitidas por patógenos bacterianos son una cuestión importante de seguridad alimentaria a nivel mundial (Bhagwat, 2003). La incidencia global de las enfermedades transmitidas por los alimentos es difícil de estimar, pero solamente en el 2005 se produjeron 1,8 millones de defunciones por enfermedades de origen gastrointestinal. Una gran proporción de casos han sido atribuidos a la ingestión de agua y alimentos contaminados (WHO, 2007).

Dentro de la región europea, los sistemas de reporte nacional, los métodos de diagnóstico y las notificaciones oficiales varían considerablemente, dificultando la comparación entre los países participantes. Se calcula que únicamente entre el 1 – 10 % de los casos son registrados en las agencias oficiales (Tirado y Schmidt, 2001). En España entre 1993 – 1998 se registraron 5,517 enfermedades transmitidas por los alimentos y el 33,1% de los casos se atribuyeron a *Salmonella* Enteritidis (BgVV-FAO/WHO, 2000). En los Estados Unidos, se estima que cada año ocurren 76 millones de enfermedades transmitidas por los alimentos y 5000 defunciones son asociadas a esta cifra (CDC, 2001; WHO, 2007). Las enfermedades producidas por los alimentos son extremadamente costosas. Los expertos de la salud en los Estados Unidos estiman que el coste anual de todas las enfermedades producidas por los alimentos es de 5 a 6 mil millones dólares en costos médicos directos y productividad pérdida (NIAID, 2007).

Un estudio realizado en los Estados Unidos sobre la incidencia de infección con patógenos transmitidos comúnmente a través de los alimentos describe, que desde el periodo de 1996-1998 al año 2006, las infecciones causadas por *Campylobacter*, *Listeria*, *Shigella* y *Yersinia* han disminuido; sin embargo, la incidencia de infecciones causadas por *Escherichia coli* O157:H7 (productora de toxina Shiga) y *Salmonella* no han disminuido significativamente, mientras que las infecciones por *Vibrio* se han incrementado (CDC, 2007b).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en asociación con otros participantes como la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*, FAO), está desarrollando políticas que fomentarán la seguridad alimentaria. Estas políticas pretenden cubrir completamente la cadena alimentaria desde la producción primaria hasta el consumo final, cuya misión incluye: i) la consolidación de sistemas de seguridad alimentaria, ii) la promoción de buenas prácticas de fabricación (*Good Manufacturing Practices*, GMP's), y iii) la educación de minoristas y consumidores para un manejo apropiado del alimento (WHO, 2007).

Por lo anterior, los programas de control de calidad microbiológica son cada vez más aplicados a lo largo de la producción de la cadena alimentaria para reducir al mínimo el riesgo de infección al consumidor. Consecuentemente, la disponibilidad de sistemas de prueba aceptados, rápidos y confiables para detectar la presencia o ausencia, o incluso el grado de contaminación de patógenos, se ha vuelto cada vez más importante para la industria alimentaria (Malorny *et al.*, 2003a; Malorny *et al.*, 2003b).

## 2. Contaminación microbiana de los alimentos

Los brotes a causa de enfermedades transmitidas por los alimentos pueden dañar el comercio y el turismo, y conducir a la pérdida de ganancias, al desempleo y demandas legales. Por lo tanto, un control eficaz de la higiene es de vital importancia para evitar las consecuencias adversas a la salud humana y a la economía por las toxiinfecciones alimentarias (Codex Alimentarius, 2003). Un *brote* es definido como un incidente donde dos o más personas

experimentan una enfermedad similar después de la ingestión del mismo alimento o después de la ingestión de agua de la misma fuente, donde la evidencia epidemiológica implica al alimento o agua como la fuente de la enfermedad (BgVV-FAO/WHO, 2003).

En la medida posible, el diseño y la disposición interna de los establecimientos alimentarios deben permitir las buenas prácticas de la higiene alimentaria, incluyendo la protección contra la contaminación cruzada, entre y durante las operaciones alimentarias (Codex Alimentarius, 2003). La *contaminación cruzada* ocurre debido a la introducción de microorganismos, o agentes causantes de enfermedad, desde el alimento crudo al alimento listo para el consumo, haciéndolo inseguro para el consumidor (WHO, 2006b). Los microorganismos patógenos pueden introducirse en el proceso de elaboración, siendo transferidos de un alimento a otro, y llegar a los productos finales a través de: i) contacto directo, ii) el personal de fábrica (manipuladores), iii) las superficies de proceso, iv) el aire del área de elaboración, v) las materias primas, y vi) los limpiadores y desinfectantes químicos empleados (Maukonen *et al.*, 2003).

Algunas recomendaciones para evitar la contaminación cruzada son (Codex Alimentarius, 2003):

1. El alimento crudo, sin procesar, se debe separar con eficacia (físicamente) de los alimentos preparados, con una limpieza intermedia eficaz, y cuando sea posible, una desinfección apropiada.
2. El acceso a las áreas de procesado necesita ser restringido o controlado, porque es en ellas donde particularmente existen los riesgos elevados.
3. El personal utilice ropa protectora limpia, incluyendo el calzado, y lavado de manos antes de entrar.
4. Las superficies, los utensilios, el equipo, los accesorios y las instalaciones en general deben ser limpiadas a fondo y, cuando sea necesario, desinfectados después de que el alimento, particularmente carne cruda de aves, se ha manipulado o procesado.

Las superficies son una de las vías de contaminación de alimentos más frecuentes, tanto en la industria alimentaria, en la restauración colectiva, así como en el hogar (Kusumaningrum *et al.*, 2003). Los resultados preliminares y la tendencia a través de Europa, de 49 países participantes (850 millones de personas), presentados en el séptimo informe (1993-1998) del Programa de Vigilancia de la OMS para el Control de las enfermedades transmitidas por los alimentos en Europa, revelaron que de 17.157 brotes, donde se identificaron las causas, el 17% fue atribuido a i) un manejo inadecuado, debido principalmente a la contaminación cruzada, al procesamiento inadecuado, higiene insuficiente y reutilización de despojos, y a ii) varios factores ambientales, siendo los más frecuentes la contaminación de personal, contaminación de equipos y el uso inadecuado de salas. Por otro lado, el 15% de los brotes fue atribuido al uso inadecuado de materias primas contaminadas, tanto microbiológicamente como químicamente (Tirado y Schmidt, 2001).

La recontaminación (contaminación post-proceso) con patógenos puede ser una causa importante y frecuente de los brotes de enfermedades alimentarias. Principalmente son asociados a un manejo inadecuado, por contaminación cruzada e higiene insuficiente, y a diversos factores ambientales (**Tabla 1**). Aunque algunas enfermedades son bien conocidas, se consideran emergentes porque están ocurriendo con mayor frecuencia ocasionando brotes en diferentes países. Entre las bacterias patógenas, emergentes y re-emergentes, que significativamente van en aumento se encuentran: *Campylobacter* spp., *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *Y. enterocolitica* (WHO, 2002; Codex Alimentarius, 2003; FAO/WHO BfR, 2004).

Es comprensible que la mejora de la calidad microbiológica del alimento es insuficiente solamente por las tecnologías de transformación del alimento, pues no son siempre garantía de la ausencia de patógenos. Debido a que los alimentos pueden ser fácilmente recontaminados, es necesario adherirse estrictamente a las normas de higiene, buenas prácticas de higiene, buenas prácticas de fabricación y la aplicación estricta del sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) a lo largo de la cadena alimentaria (Panisello *et al.*, 2000).

**Tabla 1.** Brotes originados por bacterias patógenas asociados a un manejo inadecuado, principalmente por contaminación cruzada e higiene insuficiente, y a diversos factores ambientales (modificado de Reij y Den Aantrekker, 2004).

Bacteria patógena	Alimento implicado	Fuente o vía probable del brote	Referencia
<i>Salmonella</i> Tennessee	Crema de cacahuete	Contaminación ambiental	CDC (2007a)
<i>Salmonella</i> Typhimurium	Ensalada preparada con huevo (procesada comercialmente)	Causa desconocida	CDC (2004)
<i>Salmonella</i> Agona	Alimento infantil (leche en polvo)	Ambiente de procesado	Espié <i>et al.</i> (2005)
<i>S. Enteritidis</i>	Panecillos de postre (comida escolar)	Contaminación cruzada (panecillos con huevos contaminados)	Matsui <i>et al.</i> (2004)
<i>Salmonella</i> Livingstone	Productos de la pesca procesados	Ambiente de procesado	Guerin <i>et al.</i> (2004)
<i>E. coli</i> O157:H7	Hamburguesas de ternera	Ambiente de procesado (matadero)	French multi-agency outbreak investigation team (2005)
	Salami Genoa	Ambiente de procesado	Williams <i>et al.</i> (2000)
	Carne picada (hamburguesa)	Manejo inadecuado	Mead <i>et al.</i> (1997)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Mantequilla	Ambiente de procesado	Lyytikainen <i>et al.</i> (2000)
	Carne cocinada	Máquina de corte	Lundén, <i>et al.</i> (2002)
<i>Campylobacter jejuni</i>	Ensalada con tomate (procesada manualmente)	Contaminación cruzada en el área de preparación del alimento	Moore <i>et al.</i> (2000)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Leche pasteurizada	Contaminación ambiental post-proceso	Ackers <i>et al.</i> (2000)

### 3. Higienización en la industria alimentaria

La Comisión del Codex Alimentarius fue creada por la FAO/WHO (1963) para desarrollar las normas alimentarias, reglamentos y otros textos relacionados, tales como códigos de prácticas bajo el Programa Conjunto FAO/WHO de Normas Alimentarias (Codex Alimentarius, 2003). Dicho programa constituye un fundamento técnico de gran importancia para la calidad e inocuidad de los alimentos para el consumo nacional e internacional. El Codex de los Principios Generales de la Higiene Alimentaria, en su última

revisión, incluye las directrices para la aplicación del sistema de APPCC (Codex Alimentarius, 2003).

### **3.1. Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control**

El APPCC de las industrias agroalimentarias es una propuesta cuyo objetivo fundamental es gestionar, de la mejor manera posible, la seguridad de los alimentos a lo largo de la cadena de la transformación de los mismos hasta el consumidor (Champiat *et al.*, 2001). Uno de los mayores peligros en la producción alimentaria continuará siendo la contaminación microbiológica, y es aquí donde el APPCC está siendo adoptado internacionalmente para garantizar la seguridad alimentaria (Vanne *et al.*, 1996). Los criterios microbiológicos desempeñan un papel importante en la verificación global de como está funcionando un sistema de APPCC (Sharma y Anand, 2002). Un sistema efectivo de APPCC involucra la identificación, evaluación y control de los peligros significativos para la seguridad del alimento (Bacon y Sofos, 2003; Maukonen *et al.*, 2003). Uno de esos peligros puede ser la contaminación de las superficies en contacto con los alimentos, especialmente si ha habido formación de agregados microbianos adheridos a las superficies de trabajo, conocidos como *biofilms* (Maukonen *et al.*, 2003).

### **3.2. Superficies de contacto con alimentos**

Las *superficies de contacto con alimentos* son aquellas superficies que contactan con alimentos y aquellas desde las cuales existe un vertido sobre el alimento o sobre superficies que contactan el alimento, normalmente durante el curso de las operaciones. Entre estas superficies también se incluyen: utensilios y superficies de los equipos (Hui, 2003). Por lo tanto, la higiene de las superficies afecta la calidad y seguridad del producto alimenticio (Gibson *et al.*, 1999). Condicionalmente el equipo y el medio ambiente deben ser diseñados higiénicamente (evitando grietas o espacios muertos) para que un programa efectivo de limpieza y desinfección (*higienización*) sea el método de control fundamental de las vías de contaminación de esas superficies (Gibson *et al.*, 1999; Maukonen *et al.*, 2003).

### **3.3. Operaciones sanitarias en la industria alimentaria**

Las operaciones sanitarias en una planta procesadora de alimentos contemplan i) el mantenimiento general de las instalaciones, ii) las sustancias usadas en la limpieza y desinfección, y un almacén de materiales tóxicos, iii) las fumigaciones, iv) la higienización de las superficies de contacto con los alimentos, y v) el almacenaje y manejo de utensilios y equipos portátiles limpios (Hui, 2003). El propósito de la implementación de un sistema de higiene, es eliminar cualquier microorganismo patógeno y de alteración sobre todas las superficies de contacto con el alimento. Existen muchos factores involucrados y una variedad de técnicas que deben ser usadas para efectuar esta tarea, entre las cuales se encuentran: i) la naturaleza química del limpiador y desinfectante, ii) el equipo y procedimiento de higiene, iii) la tecnología y microbiología concernientes al alimento, iv) las superficies de contacto con el alimento, y v) el uso de metodologías rápidas para controlar la higiene (Carsberg, 2003).

#### **3.3.1. Limpieza**

La *limpieza* puede ser definida como el proceso que elimina la suciedad y previene la acumulación de residuos alimentarios, los cuales pueden ser descompuestos o potenciar el crecimiento de microorganismos causantes de enfermedades o productores de toxinas (Stanfield, 2003). Para implementar un proceso de limpieza, las normas de buenas prácticas de fabricación emitidas por la Administración de Drogas y Alimentos (*Food and Drug Administration*, FDA) de los Estados Unidos sirven como marco de referencia (Stanfield, 2003). Los principios básicos de la limpieza incluyen cuatro etapas (Stanfield, 2003):

1. Llevar el producto limpiador a un contacto profundo con la suciedad.
2. Desplazar la suciedad de la superficie a ser limpiada.
3. Dispersar la suciedad en el solvente, generalmente agua.
4. Prevenir la re-acumulación de la suciedad dispersada sobre la superficie limpia.

### 3.3.1.1. Propiedades deseables de un buen limpiador

La eficacia de los agentes limpiadores es valorada por su habilidad para remover los biofilms de las superficies del proceso junto con su habilidad para eliminar las bacterias presentes en el biofilm. Debido a que la eliminación de los biofilms no se alcanza satisfactoriamente sólo con el tratamiento desinfectante, en la industria alimentaria las propiedades deseables de un buen limpiador serían (Stanfield, 2003):

- Solubilidad rápida y total
- Acción humectante o penetrante
- Acción disolvente sobre residuos alimentarios
- Acción emulsionante sobre las grasas
- Acción floculante y dispersante
- Acción germicida
- No corrosivo
- Poder de ablandamiento del agua

### 3.3.1.2. Factores que afectan la eficacia de la limpieza

Los factores que afectan la eficacia de la limpieza son: i) las sustancias orgánicas interferentes, ii) la composición del limpiador, iii) la concentración del limpiador, iv) la temperatura, v) el tiempo de contacto, y vi) la velocidad o fuerza aplicada (Grönholm *et al.*, 1999; Stanfield, 2003). Además, en un programa de seguridad alimentaria existen otros factores que contribuyen a una limpieza total, los cuales son resumidos en la **Tabla 2** (Carsberg, 2003).

### 3.3.1.3. Principales tipos de limpiadores utilizados en la industria alimentaria

La mayoría de los agentes químicos limpiadores usados en la industria alimentaria son los compuestos alcalinos que actúan como detergentes sobre grasas y proteínas. Además, pueden ser usados en combinación con agentes secuestrantes (quelantes) y humectantes aniónicos (compatibles con limpiadores ácidos o alcalinos). El uso de ácido es requerido para

superficies con alto contenido de residuos alimentarios o depósitos minerales, por otro lado los agentes humectantes no iónicos son usados por sus propiedades emulsificantes y antiespumantes (Chmielewski y Frank, 2003). La limpieza alcalina con agentes quelantes, especialmente el EDTA, es más efectiva que la limpieza con ácido en la remoción de biofilms (Wirtanen *et al.*, 1996).

**Tabla 2.** Factores que contribuyen a una limpieza total en un programa de seguridad alimentaria (adaptado de Carsberg, 2003).

Factor	Intervención
Tipo de superficies de contacto con el alimento	El tipo de material usado que compone la superficie de contacto con el alimento es de gran importancia. Estas superficies están comprendidas de muchos materiales, incluyendo: acero inoxidable, goma plástica (cintas transportadoras), plásticos, fibra de vidrio, concreto, metales ligeros (aluminio), etc. Un ejemplo sería el uso de cloruro de polivinilo (PVC) en mangueras, tubos y filtros incrementa el riesgo de contaminación debido a que este material es fácilmente contaminado con respecto al acero inoxidable.
Residuos orgánicos y biofilms	Los residuos más comunes de suciedad son: proteínas, grasas, aceites, carbohidratos, azúcares y depósitos minerales (carbonato de calcio) y material carbonoso proveniente de la combustión del aceite caliente.
El papel del agua en los sistemas de limpieza	Debido a que es el principal solvente de los sistemas de limpieza y un componente importante en la eliminación de la suciedad y bacterias de las superficies de contacto de los alimentos. También puede ser un prejuicio, sino es utilizada correctamente, es decir, contaminada, por lo que se recomienda un análisis microbiológico trimestral.
Métodos de agitación	Entre los métodos existentes para la remoción de la suciedad orgánica se encuentran: i) a mano cuidadosamente, ii) alta presión, iii) agitación química, y iv) limpieza con vapor.
Secuencias de enjuague	Existen dos enjuagues en el ciclo de limpieza. El primero es el pre-enjuague, cuyo propósito es remover la mayoría de cualquier componente orgánico. Este paso reduce la cantidad de limpiador químico a usar. El segundo es el post-enjuague, que remueve cualquier y toda clase de suciedad orgánica que ha sido removida cuidadosamente a mano y/o por agitación química. Es importante destacar que ambos, pre y post enjuagues, pueden remover hasta un 20% de bacterias residuales. El post enjuague es el más crítico porque prepara las superficies para el paso más importante de todas las etapas, la aplicación del desinfectante.
Tiempo y frecuencia	Se necesita desarrollar cuidadosamente un horario de mano de obra, tiempos de limpieza y desinfección, procedimientos escritos para cada pieza de cada equipo y ambiente con instrucciones de como se debe limpiar y desinfectar, y una distribución realista de los tiempos y recursos laborales.

El proceso de limpieza puede remover hasta un 90% o más de los microorganismos asociados a una superficie, pero no puede por si sólo eliminarlos (Gibson *et al.*, 1999). Sin embargo, un

procedimiento de limpieza efectivo debe fragmentar o disolver la matriz exopolisacárida del biofilm, de tal manera que los desinfectantes accedan a las células viables (Chmielewski y Frank, 2003).

### 3.3.2. *Desinfección*

Un *desinfectante* es un biocida que destruye o inhibe el crecimiento de los microorganismos sobre superficies u objetos inanimados (McDonnell y Russell, 1999). El término biocida es cada vez más usado para describir compuestos con actividad antiséptica, desinfectante o, algunas veces, conservante (Russell, 2002b). La *desinfección* como etapa final de un programa de higienización está diseñada para remover residuos de productos y cuerpos extraños, además de reducir el nivel de microorganismos patógenos y de alteración para asegurar, tanto la calidad como la seguridad del alimento (Taylor *et al.*, 1999).

#### 3.3.2.1. **Propiedades deseables de un buen desinfectante**

A pesar de que existe una amplia variedad de productos químicos (biocidas), muchos de ellos no son adecuados para el uso de superficies de contacto con los alimentos. Los desinfectantes deben ser efectivos, seguros, fáciles de usar y enjuagar de las superficies, sin dejar residuos tóxicos o residuos que afecten el valor sensorial del producto alimenticio (Wirtanen y Salo, 2003). Consecuentemente hay que considerar los siguientes criterios al seleccionar un desinfectante:

1. Biocida de amplio espectro
2. Bajo coste
3. No corrosivo (no alterar los materiales de las superficies a tratar)
4. Baja toxicidad a la dosis de empleo
5. Amplia acción a las condiciones de uso (temperatura, tiempo de contacto, pH, grado de contaminación)
6. Disponibilidad
7. Solubilidad en agua
8. Estabilidad conveniente

9. No genere resistencia
10. Sin olor desagradable

### 3.3.2.2. Factores que afectan la eficacia de la desinfección

Para que un desinfectante reaccione con los microorganismos, es necesario conseguir un contacto profundo. Sin embargo, la actividad antimicrobiana de la mayoría de los desinfectantes puede ser alterada debido a varios factores (McDonnell y Russell, 1999; Stanfield, 2003):

1. La concentración del desinfectante. En general, el incremento de la concentración está usualmente relacionado al incremento exponencial de la efectividad, hasta cierto punto, cuando ha consumado al menos una efectividad notable.
2. La temperatura de la solución. Comúnmente la mayoría de los desinfectantes incrementan su actividad a mayor temperatura.
3. El pH de la solución. Influye notablemente sobre la efectividad de los desinfectantes, por ejemplo: los yodóforos y el cloro disminuyen su efectividad con el aumento de pH.
4. El tiempo de exposición. Además de los factores mencionados anteriormente, el tiempo requerido para llevar a cabo la destrucción de microorganismos dependerá también de i) las poblaciones de los microorganismos presentes, ii) la susceptibilidad diversa al desinfectante, iii) la adhesión celular, iv) la formación de esporas, etc.
5. La carga orgánica. Presencia de microorganismos o residuos alimentarios.

Es de esperar que los productos de limpieza y desinfección deben estar libres de microorganismos indeseables y deben ser seguros y apropiados para el alcance de los objetivos deseados (Stanfield, 2003). Sin embargo, aunque los desinfectantes han sido desarrollados para destruir microorganismos, estos han sido encontrados en soluciones debido a su habilidad para formar cepas resistentes y al aumento protector de los biofilms (McDonnell y Russell, 1999; Wirtanen y Salo, 2003). Algunos estudios han descrito la presencia de *Pseudomonas* sp. en soluciones concentradas de yodo; *Alcaligenes faecalis*,

*Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *Flavobacterium meningosepticum* y *Pantoea agglomerans* en soluciones de amonio cuaternarios y aldehídos (Wirtanen y Salo, 2003). Es importante mencionar, que incluso una cuidadosa limpieza y desinfección no dan lugar a una planta de procesamiento “estéril” (Bagge-Ravn *et al.*, 2003a). Sin embargo, el uso adecuado de productos limpiadores y desinfectantes efectivos sobre los microorganismos adheridos a las superficies minimizan la contaminación del producto, aumentan su vida útil y reducen los riesgos de enfermedades alimentarias (Wirtanen y Salo, 2003).

### 3.3.2.3. Principales tipos de desinfectantes en la industria alimentaria

Los principales tipos de desinfectantes aprobados para su uso en la industria alimentaria, así como sus mecanismos de acción y algunas limitaciones, son mostrados en la **Tabla 3** (Maillard, 2002; Stanfield, 2003; Wirtanen y Salo, 2003). El entendimiento de los mecanismos de acción de los biocidas, junto con los factores que influyen su actividad, se ha vuelto una característica clave para el mejor uso de las formulaciones biocidas y el control de la aparición de microorganismos resistentes (Maillard, 2002).

### 3.3.3. *El secado de las superficies posterior a la higienización*

Después de la limpieza y desinfección, es recomendable una buena ventilación en las instalaciones de la industria que permita el secado del equipo y líneas de procesamiento, para prevenir la proliferación de algún microorganismo viable remanente sobre las superficies (Wirtanen y Salo, 2003). La retención de bacterias sobre superficies de contacto alimentarias incrementa el riesgo de contaminación cruzada de éstos microorganismos al alimento. Sin embargo, el riesgo disminuye cuando las superficies están secas, debido a que en cierto modo la supervivencia y el crecimiento bacteriano, en consecuencia, deben ser menores. No obstante, algunas bacterias formadoras de esporas tienen la habilidad de permanecer en condiciones de sequedad por un periodo de tiempo extendido (Kusumaningrum *et al.*, 2003).

**Tabla 3.** Los principales tipos de desinfectantes aprobados para su uso en la industria alimentaria, mecanismos de acción y limitaciones (adaptado de Denyer y Stewart, 1998; McDonnell y Russell, 1999; Maillard, 2002; Stanfield, 2003; Wirtanen y Salo, 2003).

Tipo de desinfectante	Desinfectante	Mecanismo de acción	Limitaciones
Alcoholes	Etanol	Daño a la membrana y rápida desnaturalización de las proteínas, con subsiguiente interferencia con el metabolismo y lisis celular.	Etanol: bacteriostático, ineficiente contra esporas.
	Isopropanol		Isopropanol: menos activo que el etanol contra virus hidrofílicos.
Aldehídos	Glutaraldehído	Ligamiento cruzado de proteínas de la pared celular y de la membrana externa.	Baja penetración en biofilms, se degrada a ácido fórmico.
Peroxígenos	Peróxido de hidrogeno (PH)	Actividad debida a la formación de radicales libres hidroxilo (-OH), los cuales oxidan los grupos tioles (-SH) de enzimas y proteínas. APA: afectación de grupos tioles de enzimas y proteínas. PH: Ruptura de la hebra de ADN.	PH: corrosivo e inestable
	Ácido peracético (APA)		APA: corrosivo, son necesarias altas concentraciones.
	Ozono		Ozono: corrosivo, fácilmente inactivado, reacciona con compuestos orgánicos (→ epóxidos).
Productos liberadores de halógenos	Compuestos clorados (cloro, hipoclorito, dióxido de cloro) Yodóforos	Inhibición de la síntesis de ADN. Oxidación de grupos tioles a disulfuros, sulfóxidos o disulfóxidos.	Cloro: Subproductos tóxicos, desarrollo de resistencia, residuos, corrosivo, reacciona con exopolisacáridos, decolora, gas explosivo. Hipoclorito: inestable, tóxico, oxidativo, corrosivo, no previene la adhesión, decolora. Dióxido de cloro: subproductos tóxicos, gas explosivo. Yodóforos: < efectividad que el hipoclorito contra esporas bacterianas.
Compuestos amonio cuaternarios	Cloruro de benzalconio Cetrimide	Daño generalizado en membrana involucrando la bicapa fosfolipídica. Incremento de la permeabilidad de la membrana externa (Gram negativas). Inhibición de la actividad enzimática.	Inactivado a bajo pH y por sales ( $Ca^{2+}$ y $Mg^{2+}$ ), desarrollo de resistencia, inefectivo contra bacterias Gram negativas.
Derivados de metales pesados	Compuestos de plata (iones plata)	Enzimas vitales de membrana (interacción con grupos tioles). Los iones plata interactúan con los ácidos nucleicos. Ruptura de ADN.	Son dependientes del valor del pH.

Existen factores que influyen significativamente sobre la estabilidad de los microorganismos a la sequedad, tales como: la actividad del agua ( $a_w$ ) y la temperatura. La pérdida de viabilidad bacteriana debido a la sequedad está relacionada principalmente al daño de la pared celular y la membrana citoplasmática. Sin embargo, las diferencias estructurales de la pared celular de los microorganismos, Gram positivos y Gram negativos, pueden ser responsables de su mayor o menor estabilidad (Janning *et al.*, 1994).

Fuster-Valls *et al.* (2007) estudiaron el efecto de distintas condiciones ambientales sobre la supervivencia de *E. cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* en superficies de acero inoxidable y observaron que cuando fueron sometidas a un secado lento con aire, *E. cloacae* mostró una mayor susceptibilidad. Sin embargo, Wilks *et al.* (2005) en un estudio de supervivencia sobre un amplio rango de superficies metálicas, observaron que a partir de un inóculo inicial de  $1 \times 10^7$  UFC/ml de *E. coli* O157, esta fue capaz de sobrevivir en estado de desecación durante más de 28 días sobre superficies de acero inoxidable, tanto a temperatura ambiente como de refrigeración. Aunque dentro de los dos primeros días observaron una reducción de 5 unidades logarítmicas de células viables, posteriormente la población se mantuvo constante (alrededor de  $1 \times 10^4$  UFC/ml). Por lo tanto, la disminución de la carga bacteriana sobre las superficies expuestas a un secado posterior a la higienización dependerá de las características del microorganismo y del medio ambiente que le rodea.

### **3.4. Valoración de la eficacia desinfectante**

La determinación de la eficacia desinfectante es con frecuencia realizada en ensayos en suspensión. Este tipo de ensayo determina las concentraciones del desinfectante a las cuales muestra una reducción logarítmica definida en el número de microorganismos a un tiempo dado. En la práctica, entretanto, los microorganismos que están sujetos a la desinfección sobre las superficies de la producción alimentaria son aquellos que permanecen después de la limpieza y se encuentran comúnmente adheridos a la superficie (Gibson *et al.*, 1995). Aunque es reconocido que los microorganismos pueden ser más resistentes a los desinfectantes una vez que se encuentran adheridos a una superficie, las pruebas en

suspensión son aún utilizadas como métodos estándares para evaluar los desinfectantes en la higiene alimentaria (Gibson *et al.*, 1999; Bagge-Ravn *et al.*, 2003b).

El Comité Europeo de Normalización (CEN) ha emitido varias normas. Los microorganismos utilizados en las pruebas son organismos estándares, tales como: i) bacterias de alteración, ii) bacterias patógenas, y iii) esporas de interés en higiene alimentaria. Las pruebas de eficacia basadas sobre suspensiones dan respuesta a si el desinfectante es efectivo sobre el microorganismo probado. Conforme a las pruebas estándares disponibles, se requiere una reducción  $\geq 5$  unidades logarítmicas para que un producto sea efectivo contra células vegetativas y  $\geq 1$  unidad logarítmica para esporas bacterianas (Wirtanen y Salo, 2003).

En 1989 la formación del comité técnico CEN/TC 216, “Antisépticos y desinfectantes químicos”, fue establecido para armonizar los métodos de ensayo de desinfectantes a través de varios grupos de trabajo (médico, veterinario y alimentario, y campos institucionales). El comité decidió que los ensayos deberían comprender tres fases (Gibson *et al.*, 1995; Payne *et al.*, 1999):

1. Fase 1: Ensayos en suspensión para definir los estándares mínimos de actividad bactericida, fúngica y esporocida (en ausencia de cualquier carga orgánica).
2. Fase 2: Ensayos en suspensión (etapa 1) y en superficie (etapa 2) con condiciones que simulen el uso práctico (en presencia de carga orgánica).
3. Fase 3: Prueba de campo, tipo validación.

Actualmente en la Norma Europea (EN) existen diversos ensayos en suspensión para definir la actividad bactericida y fungicida de los antisépticos y desinfectantes químicos que se utilizan en productos alimenticios, en la industria, en el hogar y en colectividad. Entre ellos se encuentran: i) aquellos que forman una preparación estable y homogénea en agua, (Anónimo, 1997a; Anónimo, 1997b) y ii) aquellos que forman una preparación homogénea y físicamente estable en agua dura, cuya norma simula las condiciones prácticas de aplicación (Anónimo, 1998a; Anónimo, 1998b). Sin embargo los resultados de las pruebas de suspensión deberían usarse solamente para investigar el desinfectante y no únicamente para

determinar las concentraciones de uso recomendadas (Holah *et al.*, 1990). Aunque, la relevancia de los ensayos en suspensión ha sido cuestionada, estos han sido útiles para la evaluación del efecto general de los parámetros ambientales (temperatura, residuos interferentes y tiempo de contacto) y por otro lado, los resultados han demostrado suficiente repetibilidad y reproducibilidad (Gibson *et al.*, 1995).

Es obvio que los ensayos en superficies son aún más difíciles de realizar que los ensayos en suspensión, debido al material del soporte utilizado y a la viabilidad de las células secas sobre dicha superficie. Consecuentemente, para los ensayos de desinfectantes sobre superficies, se han considerado las fuentes de variaciones en el procedimiento, además de la menor susceptibilidad al desinfectante de parte de los microorganismos, en crecimiento o secos, en un biofilm sobre la superficie (Wirtanen y Salo, 2003).

Para resolver ésta problemática otra Norma Europea, EN 13697, fue desarrollada por el comité técnico CEN/TC 216 (Anónimo, 2002), la cual solamente es aplicable a aquellos antisépticos y desinfectantes que cumplen la Norma EN 1040 para la actividad bactericida (Anónimo, 1997a) o la Norma EN 1275 para la actividad fungicida (Anónimo, 1997b). Esta norma describe un método de ensayo en superficie (fase 2/etapa 2) para determinar si un producto propuesto como desinfectante, en los ámbitos descritos anteriormente, tiene o no actividad bactericida o fungicida sobre las superficies no porosas. Aplicando esta norma es posible determinar la actividad del producto sin diluir, y la de la preparación homogénea y físicamente estable en agua dura (Anónimo, 2002).

Las condiciones seleccionadas (tiempo de contacto, temperatura, organismos de prueba, etc.) reflejan los parámetros encontrados en situaciones prácticas, incluyendo las condiciones que pueden influir en la acción de los desinfectantes. Para ser considerado un desinfectante eficaz, el producto deberá demostrar una reducción de 4 y 3 unidades logarítmicas en los recuentos bacterianos y fúngicos viables, respectivamente (Anónimo, 2002).

### 3.4.1. *Respuestas de adaptación o resistencia a desinfectantes*

Para los consumidores de desinfectantes en la industria alimentaria y en otras aplicaciones, es más importante definir la “resistencia” como “supervivencia” en término práctico. Sin embargo, aún así la eficacia de los desinfectantes está estrechamente relacionada al método de ensayo utilizado, por lo tanto, dentro de un contexto científico la resistencia debe ser usada como un término relativo. Si un microorganismo (o especie) sobrevive o crece en una concentración más alta de desinfectante que otro microorganismo (o especie), se dice que tiene mayor resistencia. Dentro de una especie, las cepas que sobreviven (o no son inhibidas) a una concentración de desinfectante que elimina (o inhibe) la mayoría de las cepas de estas especies, serán llamadas “resistentes”. Las cepas con resistencia intermedia serán llamadas “tolerantes”. Es importante distinguir entre una respuesta al estrés, la cual suele ser reversible, y en una adaptación que origina una resistencia muy estable (Langsrud *et al.*, 2003). Por otro lado, la respuesta a antisépticos y desinfectantes varía de acuerdo al tipo de microorganismo, según su estructura celular, composición de membrana y fisiología. La susceptibilidad microbiana a antisépticos y desinfectantes ha sido clasificada basada en esas diferencias, siendo mayor para bacterias Gram negativas que Gram positivas (McDonnell y Russell, 1999; Beumer *et al.*, 2000).

En los últimos años, se ha conseguido un progreso considerable en el entendimiento de las respuestas de los diferentes tipos de bacterias a los productos antibacterianos. Si una población de microorganismos es expuesta a un compuesto antimicrobiano a altas concentraciones, las células más susceptibles serán rápidamente eliminadas. Sin embargo, habrá células que poseen un grado de resistencia para sobrevivir y proliferar (Bower y Daeschel, 1999). Consecuentemente, la resistencia puede ser tanto intrínseca (una propiedad natural del organismo o modo de crecimiento) o adquirida, por mutación o adquisición de plásmidos o trasposones (McDonnell y Russell, 1999).

#### 3.4.1.1. **Resistencia microbiana intrínseca**

Los biofilms son el ejemplo más importante de como la adaptación fisiológica (fenotípica) juega un papel en conferir resistencia intrínseca (McDonnell y Russell, 1999). Se ha

observado que las células adheridas a una superficie o formando parte de un biofilm, son más resistentes a la acción desinfectante que sus células planctónicas, es decir en su forma libre, suspendidas (Bower y Daeschel, 1999). Holah *et al.* (1990) describieron un método de prueba desinfectante en superficie (acero inoxidable) para biofilms de tres bacterias (*P. aeruginosa*, *S. aureus* y *Proteus mirabilis*), con este método se evaluaron doce desinfectantes, obtenidos comercialmente y con un rango biocida comúnmente usado en la industria alimentaria, por ambos métodos: i) Prueba de Suspensión Europea modificada, y ii) Prueba Desinfectante en Superficie. Los resultados indicaron que las bacterias adheridas a la superficie (biofilms desarrollados) fueron hasta 10 veces más resistentes a todos los desinfectantes evaluados y entre 10 – 100 veces más resistentes para siete de los biocidas que en las pruebas de suspensión. Wirtanen y Salo (2003) probaron el efecto bactericida de cuatro desinfectantes comerciales (peróxido de hidrógeno, alcohol, hipoclorito y persulfato) sobre biofilms de seis diferentes bacterias (*L. innocua*, *L. monocytogenes*, *E. coli.*, *S. Infantis*, *S. Choleraesuis* y *B. cereus*) crecidos en superficies de acero inoxidable. Estos autores observaron claramente la protección de los biofilms contra los desinfectantes.

#### 3.4.1.2. Resistencia microbiana adquirida

Con respecto a la resistencia adquirida, es menos frecuente en la industria alimentaria. Existe conocimiento de pocos casos donde los niveles de contaminación microbiológica se hayan incrementado a niveles inaceptables debido a una sospecha de que los microorganismos se hayan vuelto inalterables al biocida aplicado y a la concentración de uso normal (Holah *et al.*, 2002). Los pocos casos se encuentran asociados a la industria del enlatado, particularmente a la salida de las latas del cocedor, debido a que las latas salen húmedas y calientes, son más sensibles a la contaminación; lo que obliga a una desinfección, sino continua, al menos si frecuente. Sin embargo, para evitar la corrosión de la cinta transportadora de la descarga, se tiende a utilizar desinfectantes como los compuestos amonio-cuaternarios (quats). La aplicación continua de un desinfectante no es típica en la industria y puede ser que las cepas, usualmente *Pseudomonas* spp., se adapten a los quats. Otra explicación podría ser, que debido al uso continuo del desinfectante, este se utilice en concentraciones menores a las recomendadas por el fabricante, quizá para minimizar costos.

Aún así, los responsables de la higiene en la industria del enlatado están fomentado ocasionalmente, alternar los quats con biocidas oxidantes (hipoclorito) para prevenir la adaptación (Holah *et al.*, 2002).

#### 4. Incidencia de cepas resistentes en la industria alimentaria

En los últimos años ha sido recomendada la rotación de desinfectantes en la industria alimentaria y farmacéutica para prevenir el desarrollo de cepas resistentes; además de realizar los controles microbiológicos periódicos que son indispensables para detectar la aparición de las mismas (Russell, 2002c; Langsrud *et al.*, 2003). Por otra parte, ha habido un incremento de la tendencia para no enjuagar tras la aplicación de los desinfectantes antes de reiniciar la producción. No obstante, este tipo de práctica puede no ser aceptable para superficies de equipos relacionados con el proceso de la leche y el huevo, siendo permitido en el resto de las superficies de producción alimentaria, garantizando que no son tóxicos, ni contaminantes (Anónimo, 1989; Holah *et al.*, 2002).

Mokgatla *et al.* (1998) estudiaron la resistencia al cloro de *Salmonella* aislada en varias etapas de la producción avícola y observaron que algunas cepas fueron más resistentes al ácido hipocloroso a concentraciones superiores de la concentración mínima inhibitoria (MIC) 72 µg/ml. Heir *et al.* (1995) encontraron que el 13% de estafilococos, aislados de un medio ambiente de procesado, presentaron una MIC para el cloruro de benzalconio entre 4 – 11 mg/l comparado con el 70% remanente menor a 2 mg/l. Generalmente, la resistencia presentada fue a un nivel menor. Sin embargo, las pruebas de suspensión mostraron que las concentraciones de uso recomendadas alcanzaron 5 reducciones logarítmicas en los recuentos viables (Beumer *et al.*, 2000). En otro estudio, Langsrud y Sundheim (1997) aislaron *Pseudomonas* spp. de mataderos de aves y el 30% mostró un crecimiento común a 200 µl/ml de cloruro de benzalconio, siendo *Pseudomonas fluorescens* menos susceptible que el resto de las cepas aisladas; dos cepas mostraron una elevada resistencia para cloruro de benzalconio (mayor a 200 µl/ml), pero sólo una de ellas demostró su resistencia con la prueba de suspensión. Por otro lado, Moretro *et al.* (2003) determinaron la prevalencia de

aislados de *Salmonella* de una fábrica de pienso para pescado y otros orígenes, con nueve desinfectantes probados al 80% de la concentración de uso recomendada por el fabricante, usando la prueba de suspensión EN-1276. A pesar de que sólo dos desinfectantes lograron reducciones mayores a 5 unidades logarítmicas en los recuentos viables, no observaron diferencias significativas entre la resistencia de los aislados de la fábrica de pienso para pescado y los de otros orígenes. Sin embargo, la concentración de uso recomendada basada en las pruebas de suspensión para *E. Coli* DSM 682, pareció ser demasiada baja para la desinfección de *Salmonella*. Medrala *et al.* (2003) realizaron un estudio durante un año de la persistencia de *L. monocytogenes* en una planta procesadora de pescado, encontrando una contaminación de 4,3 – 15,4% en materia prima y hasta un 77,8% en producto procesado, principalmente salmón ahumado y envasado al vacío. Concluyeron que la recontaminación del pescado se originaba por la elevada persistencia de cepas residentes, pues encontraron una cepa que fue aislada constantemente durante 9 meses, a pesar de los procedimientos enérgicos de limpieza y desinfección.

La aparición de microorganismos con una resistencia combinada a desinfectantes y a uno o más productos antimicrobianos es un desafío para las industrias alimentarias (Langsrud *et al.*, 2003). Así que el uso apropiado de desinfectantes puede ser un beneficio considerable en la erradicación de los gérmenes no deseados (Russell, 2002a). Por lo tanto, para superar el desarrollo viable de resistencia adquirida se recomiendan métodos sencillos como el uso efectivo de programas de higienización para el control ambiental o de proceso, que eviten el uso de concentraciones subletales de desinfectantes, así como el uso combinado de desinfectantes con diferentes mecanismos de acción (Davidson y Harrison, 2002). Cabe mencionar que la supervivencia de los microorganismos en condiciones prácticas no sólo es resultado de su resistencia, sino además de su habilidad para adherirse a las superficies, condiciones de crecimiento y factores de estrés (Langsrud *et al.*, 2003).

En resumen, se pueden mencionar a los factores intrínsecos de resistencia bacteriana como los más significativos, siendo los más importantes la habilidad de esporular y el efecto protector de los biofilms, por lo cual quizá en estos casos no sea correcto denominarlos

“resistencia”, sino “tolerancia”, que se define como el desarrollo de los efectos protectores que permiten al microorganismo sobrevivir en presencia de un agente activo (McDonnell y Russell, 1999).

## 5. Biofilms en la industria alimentaria

Las respuestas de resistencia de las bacterias en los ambientes alimentarios son atribuidas a diversos factores; uno de suma importancia es la formación de biofilms sobre las superficies de la industria alimentaria como una respuesta de adaptación para prevenir los efectos adversos de limpiadores y desinfectantes (Bower y Daeschel, 1999).

Un *biofilm* es una población de células creciendo adheridas a una superficie o, entre ellas, en agregados y embebidas en una matriz exopolisacárida (Lewis, 2001; Ravishankar y Juneja, 2003). El biofilm puede estar constituido de monocultivos, de diversas especies, o de una mezcla de fenotipos de una especie dada (McDonnell y Russell, 1999). Los biofilms se encuentran anclados a una superficie e incrustados en *sustancias poliméricas extracelulares* (EPS) producidas por ellos mismos (Kumar y Anand, 1998). Las EPS pueden contener polisacáridos, proteínas, fosfolípidos, ácidos teicoicos y nucleicos, y otras sustancias poliméricas hidratadas hasta con un 97% de agua (Sutherland, 2001; Chmielewski y Frank, 2003).

### 5.1. Importancia de los biofilms

Las comunidades bacterianas desarrollan una función importante en la producción y degradación de materia orgánica, tales como: contaminantes ambientales, en el ciclo del nitrógeno, del azufre y de metales iónicos. La mayoría de estos procesos naturales son complejos y requieren un esfuerzo en conjunto de bacterias con diferentes capacidades metabólicas, como aquellas que residen dentro de un biofilm. Por lo cual, las capacidades metabólicas de los biofilms han sido estudiadas y aplicadas en bioreactores, pues se ha demostrado su implicación en el tratamiento de aguas residuales, en aguas subterráneas contaminadas con productos de petróleo y en la nitrificación (Davey y O'toole, 2000). Los biofilms son importantes por varias razones, debido a su notable corrosión, porque disminuyen la calidad del agua, y porque actúan como focos de contaminación (McDonnell

y Russell, 1999). La presencia de bacterias productoras de ácido y reductoras de sulfatos en un biofilm puede causar corrosión. Las redes de distribución de agua son propensas al desarrollo de biofilms, debido a las trazas de nutrientes en el agua y a pesar del mantenimiento de elevados niveles de cloro residual.

Asimismo, la industria alimentaria tampoco está inmune al fenómeno de adhesión y al subsiguiente desarrollo de biofilms (Carpentier y Cerf, 1993). En la industria alimentaria y láctea un problema serio es el “*biofouling*”, es decir, la formación de depósitos (capa de células vivas y sus productos de descomposición) sobre una superficie en contacto con un medio líquido. Las complicaciones más importantes que causan son: el impedimento al flujo de calor a través de la superficie y el incremento de la resistencia friccional del fluido, que conduce a pérdidas de energía y de producto (Kumar y Anand, 1998; Trachoo, 2003). En la práctica, un biofilm sobre superficies inadecuadamente higienizadas es una barrera entre microorganismos y desinfectantes, antibióticos o biocidas (Bredholt *et al.*, 1999; Maukonen *et al.*, 2003).

#### 5.1.1. *Adherencia bacteriana*

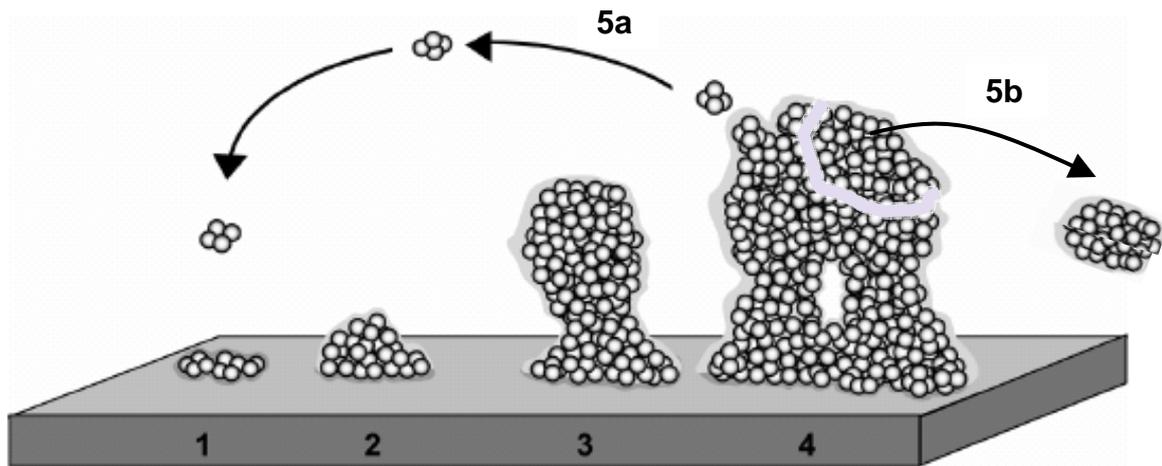
Uno de los elementos claves de las bacterias para su adaptabilidad, es su habilidad a formar nichos donde pueden proliferar. Entre los mecanismos de fijación bacteriana el más común es la movilidad flagelar, además de distintos métodos de translocación superficial. Sin embargo, en respuesta al medio ambiente, las bacterias utilizan otros mecanismos, como la síntesis de celulosa, además de la formación de *pili (fimbriae)*. Otros mecanismos importantes de fijación son la agregación y la adhesión. El primero incrementa la interacción célula-célula y la tasa de sedimentación celular. A través de la adhesión, la bacteria no solamente se fija a la superficie, sino que puede formar comunidades y obtener beneficios de la versatilidad fenotípica de las células próximas (Davey y O'toole, 2000). En la industria alimentaria la adhesión bacteriana y la formación de biofilms sobre las superficies de contacto con el alimento son fuentes potenciales de contaminación pre y post-procesamiento de productos, con bacterias patógenas y de alteración, por lo que se debe

evitar la formación o erradicar el biofilm una vez formado (Ravishankar y Juneja, 2003; Bagge-Ravn *et al.*, 2003a; Maillard, 2005). La presencia de un biofilm adherido a la superficie de contacto del alimento afecta a menudo la seguridad del mismo, especialmente si se trata de alimentos crudos o poco procesados (Trachoo, 2003). La eliminación de los biofilms es una tarea muy difícil, debido a que la adhesión de los microorganismos a una superficie se ve influenciada por varios factores, tales como: las características estructurales y fisiológicas de las células, las propiedades de la materia de contacto (geometría, porosidad, aspereza, composición e hidrofobicidad), la temperatura y el tiempo de adhesión (Foschino *et al.*, 2003).

#### 5.1.2. *Etapas en la formación del biofilm*

En 1971 Marshall y colaboradores describieron la formación de un biofilm en dos etapas de adhesión, reversible e irreversible. En la primera, las células bacterianas no entran en contacto real con el sustrato o superficie, sino que se mantienen en estrecha proximidad por fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. En la segunda, las células se adhieren a la superficie por la producción de un complejo de polisacáridos, en donde intervienen enlaces covalentes, ión-ión, dipolo-dipolo e hidrofóbicas, además de puentes de hidrógeno (Ravishankar y Juneja, 2003). Otra teoría propuesta por Kumar y Anand (1998) plantea una etapa inicial, de un total de cinco, que involucra el transporte de material inorgánico y orgánico a la superficie a colonizar, como previo acondicionamiento de la misma. Aunque existen diversas teorías de las etapas que involucran la formación de un biofilm, todos esos modelos explican un fenómeno similar, pero de diferentes maneras (Ravishankar y Juneja, 2003).

Básicamente la formación de un biofilm (**Figura 1**) consiste en una adhesión inicial de células planctónicas a una superficie, posteriormente a una colonización, es decir al crecimiento de esas células para producir microcolonias y EPS, seguida de una maduración del biofilm por el continuo crecimiento de las microcolonias (Chmielewski y Frank, 2003; Lasa, 2006).



**Figura 1.** Desarrollo de la estructura de un biofilm. 1) Adhesión inicial a la superficie, 2) Colonización y producción de EPS, 3) Estructura temprana del biofilm, 4) Estructura madura del biofilm y 5) Liberación y dispersión de células. (a) liberación de células planctónicas móviles (b) liberación de un fragmento del biofilm (adaptado de Kumar y Anand, 1998; Costerton *et al.*, 1999; Lasa, 2006).

Finalmente, después de la maduración del biofilm, ocurre un desprendimiento y dispersión de células planctónicas para colonizar nuevas áreas. Se proponen dos mecanismos de desprendimiento y dispersión que realizan una serie de acontecimientos, como: a) la implicación de la acción de ciertas enzimas que ejecutan una hidrólisis de matriz exopolisacárida y la subsiguiente conversión de una subpoblación de células en células planctónicas móviles que salen del biofilm, y b) la emisión de señales químicas que pueden interrumpir el flujo liberando un fragmento del biofilm (Kumar y Anand, 1998; Costerton *et al.*, 1999). La presencia de altos niveles de nutrientes, depósitos microscópicos y macroscópicos de residuos alimentarios, así como el estrés originado por los limpiadores, desinfectantes o los tratamientos de procesamiento influirán en la estructura del biofilm. Sin embargo, estos factores no son considerados en la teoría actual de formación del biofilm (Chmielewski y Frank, 2003).

### 5.1.3. Factores que afectan la estructura del biofilm

La constitución de un biofilm depende de los factores ambientales bajo los cuales se forma. Existen numerosas condiciones que pueden afectar la estructura de un biofilm, tales como: 1) las propiedades de la superficie y de la interfaz, 2) la disponibilidad de nutrientes, 3) las

condiciones hidrodinámicas, y 4) la composición de la comunidad microbiana (Davey y O'toole, 2000).

1) Los biofilms pueden existir en todas las superficies de las plantas de alimentos, desde el plástico, vidrio, metal, madera a productos alimenticios (Trachoo, 2003). El acero inoxidable es ampliamente usado en la industria alimentaria debido a su alta resistencia a la corrosión, además que se ha demostrado que es altamente higiénico. Sin embargo, el grado (composición relativa de hierro, cromo y níquel) y acabado (2B, 2R, pulido o electropulido) del acero inoxidable afectan la adhesión bacteriana debido a sus propiedades topográficas y físico-químicas (Jullien *et al.*, 2002). Beresford *et al.* (2001) realizaron un amplio estudio de la adhesión de *L. monocytogenes* sobre diversos materiales (acero inoxidable, caucho y polímeros) encontrados comúnmente en las instalaciones de la industria alimentaria. Estos autores estudiaron dos periodos de adhesión, uno instantáneo y otro de dos horas, y observaron que la capacidad de adhesión se incrementó significativamente con el tiempo para todos los materiales, excepto para el polipropileno.

Además, existen materiales usados en el ambiente alimentario que poseen un efecto bacteriostático sobre algunos patógenos, por ejemplo el caucho sobre *L. monocytogenes* (Trachoo, 2003). Joseph *et al.* (2001) estudiaron la eficiencia de la formación de biofilms de *Salmonella* y la posterior resistencia a los desinfectantes. Estos autores observaron que ambas fueron dependientes del tipo de superficie, siendo más sensibles las células del biofilm sobre acero inoxidable que aquellas sobre el plástico. Un estudio de Robine *et al.* (2000) donde evaluaron la supervivencia de aerosoles de *P. fluorescens* y *Enterococcus faecalis* sobre superficies inertes, observaron que al eliminar la humedad relativa y evaluar la supervivencia de ambos microorganismos sobre las distintas superficies, el tipo de material presentó un efecto significativo sobre la supervivencia de ambas bacterias, en el siguiente orden decreciente: PVC > vidrio > acero inoxidable. El efecto letal del PVC es debido a su elevada reactividad por sus sitios oxidantes que liberan ácido clorhídrico y a la presencia de aditivos.

2) Todos los materiales son porosos, incluso los metales de apariencia lisa (como el acero inoxidable) poseen fisuras irregulares. Por lo tanto, los residuos orgánicos favorecen la adherencia a esas áreas y proveen una buena fuente para las bacterias, contribuyendo a la formación de un biofilm (Carsberg, 2003). Los biofilm que son formados por agregados celulares, no monocapas, son esparcidos por la matriz exopolisacárida, cuya densidad variable crea áreas abiertas donde se forman canales de agua. Los huecos intersticiales o canales son una parte integral de la estructura del biofilm. Los canales son en esencia el cordón umbilical del sistema, desde donde proporcionan una circulación de nutrientes y permiten el intercambio de un volumen importante de metabolitos con la fase acuosa. Además, incrementan la disponibilidad de nutrientes, así como la eliminación de metabolitos tóxicos hacia el exterior. Presuntamente los canales son una parte vital de la estructura del biofilm y su función, donde probablemente se encuentran los mecanismos de formación y de mantenimiento de esas estructuras (Davey y O'toole, 2000).

3) El estudio de los biofilms bajo diversas condiciones hidrodinámicas ha demostrado que el flujo laminar produce agregados celulares redondeados e irregulares que se encuentran separados por espacios intersticiales (libres de células), mientras que un flujo turbulento produce agregados irregulares, pero alargados en forma de serpentina (Davey y O'toole, 2000). Las células al encontrarse en suspensión en el aire pierden rápidamente el agua que contienen (< 1 segundo), y en este estado es como se fijan a las superficies, por lo tanto al ser colocadas en un ambiente con humedad relativa elevada, se rehidratan rápidamente porque actúan como cuerpos higroscópicos y se conduce a un cambio conformacional de su estructura celular, que resulta en una reducción considerable de su actividad, y dependiendo del tipo de microorganismo, el choque osmótico puede ser letal (Robine *et al.*, 2000). Existen estudios como el Robine *et al.* (2000) donde han demostrado que la supervivencia bacteriana se ve reducida en ambientes húmedos. Además, los mismos autores demostraron que a una elevada humedad relativa se incrementó el efecto bactericida de las superficies de acero

enriquecidas con cobre AISI 211+3Cu y cobre (Cu). Los autores propusieron que la hidratación de la superficie bacteriana, a una elevada HR, ocasiona un transporte del cobre a la pared celular facilitando su absorción induciendo un daño irreversible en el sistema enzimático, esto debido a la liberación de iones de cobre al contacto con el agua, que es cuatro veces mayor después de 24 h. Sin embargo, en un ambiente seco, la acción biocida del cobre es explicada por la oxidación de la superficie al contacto con el aire (Robine *et al.*, 2002).

4) La composición de la comunidad microbiana que coloniza las superficies es importante, porque una vez que se adhieren pueden adquirir nuevas propiedades. Leriche y Carpentier (2000) estudiaron la limitación del crecimiento y adhesión de *L. monocytogenes* sobre acero inoxidable por biofilms de *Staphylococcus sciuri* y observaron que un biofilm de 24 h de *S. sciuri* impidió significativamente la adhesión de *L. monocytogenes*. Una cantidad enorme de interacciones negativas pueden existir entre microorganismos, tales como: la producción de sustancias inhibidoras (bacteriocinas, enzimas bacteriolíticas, etc.) y, dentro de los biofilms, una competición por las fuentes nutricionales y por los sitios de adhesión (Leriche y Carpentier, 2000).

#### 5.1.4. Resistencia biocida del biofilm

La falta de protocolos antimicrobianos convencionales se debe principalmente a la supervivencia de las bacterias del biofilm, con respecto a sus contrapartes planctónicas, durante los tratamientos antimicrobianos. El incremento en la resistencia de las bacterias adheridas está probablemente relacionado al ambiente que las rodea y a la naturaleza de la superficie (Holah *et al.*, 1990). Se cree que esa resistencia de las bacterias en el biofilm se debe a: i) la escasa penetración de los compuestos antimicrobianos, debida a la presencia y volumen del limo exopolimérico, ii) la obligada limitación de nutrientes extrema en el interior del biofilm y a la expresión simultánea de la inactivación metabólica (estado durmiente) o fenotipos reincidentes, iii) la expresión de fenotipos específicos de adhesión que son radicalmente diferentes e intrínsecamente menos susceptibles, que los no adheridos (Gilbert *et al.*, 2003). El limo, actuando como barrera, involucra una inactivación o

remoción del agente antimicrobiano, provocando una limitada difusión-reacción (Gilbert *et al.*, 2003).

Wirtanen *et al.* (2001a) diseñaron un estudio usando como matriz un hidrogel para estudiar la resistencia de difusión-reacción de los biofilms ( $10^3 - 5$  UFC) de diferentes bacterias patógenas y de alteración, utilizando desinfectantes a base de peróxido de hidrógeno, hipoclorito, alcohol y tensoactivos. La susceptibilidad microbiana fue valorada sobre el hidrogel después de un tiempo de contacto de 5 min a 25 °C y las bacterias Gram negativas, detectaron niveles de supervivencia significativos. Estos resultados contrastaron con las pruebas de suspensión, las cuales dieron 5 reducciones logarítmicas en todos los casos, difícilmente recuperándose células viables. La formulación a base de peróxido fue más efectiva contra las bacterias Gram negativas y menos efectiva contra *L. innocua* y *L. monocytogenes*. Sin, embargo, la actividad se incrementó a una mayor exposición al agente. Los desinfectantes a base de alcohol mostraron mejor efectividad contra las células vegetativas de *B. subtilis*. En cambio, los agentes tensoactivos demostraron ser los menos eficaces.

Otro estudio que muestra el efecto protector de las células en un biofilm fue el realizado por Stewart *et al.* (2001) donde compararon la penetración efectiva del hipoclorito y clorosulfamato sobre dos especies de biofilms: *P. aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*. Estos autores observaron que el transporte hacia el interior del biofilm del clorosulfamato fue mayor que el hipoclorito y lo atribuyeron a una menor capacidad de reacción con los componentes del biofilm. A pesar de la penetración superior del clorosulfamato, la escasa eliminación del biofilm, por ambos desinfectantes, demostró que las bacterias en el interior del biofilm están protegidas por algún otro mecanismo que por la simple barrera física de la matriz del biofilm.

## **6. Establecimiento de criterios de aceptación para la validación de la limpieza y desinfección**

Eventualmente el componente más crítico del desarrollo de un programa exitoso de la validación de la limpieza y desinfección es el establecimiento de criterios bien definidos y significativos de aceptación. Claramente, cada proceso es único, de acuerdo a la composición del producto, los agentes de limpieza y desinfección, el equipo y los procedimientos utilizados (PDA, 1998). Para evaluar un programa de limpieza y desinfección es necesario muestrear las superficies de equipos en contacto con los alimentos y establecer los niveles residuales de contaminación presentes.

### **6.1. Importancia del método de muestreo e identificación de puntos críticos de control**

Por lo tanto, en cualquier proceso que se pretenda establecer un sistema de APPCC únicamente en base a los puntos críticos de control (PCC) teóricos más que en los reales, es muy probable que sea ineficaz. Cuando se realiza una valoración subjetiva errónea de los efectos microbiológicos conlleva a la identificación equívoca de los PCC (Gill *et al.*, 2003). Por lo tanto, los puntos dominantes a considerar en el desarrollo de los criterios predefinidos de aceptación o rechazo, deben estar basados en el análisis de datos microbiológicos reales. La elección de un método de muestreo y control dependerá de la naturaleza de los residuos y del equipo de fabricación (PDA, 1998). Además, la sensibilidad y exactitud del método de muestreo seleccionado influyen en los resultados obtenidos, debido a la imposibilidad de analizar toda la población y por consecuencia afectan la toma de decisiones posteriores (Pecorelli *et al.*, 1993).

## **7. Métodos de verificación para el control microbiológico e higiénico de superficies**

La inspección visual tras la limpieza y desinfección nos puede indicar si quedan restos de materia orgánica macroscópicos, pero en la mayoría de las operaciones no es suficiente y por ello se debe recurrir a pruebas más sensibles (Moore y Griffith, 2002a). A pesar de la aplicación de métodos de control microbiológicos, muchos microorganismos permanecerán en las superficies. Sin embargo, las técnicas de muestreo de superficies son imprescindibles,

especialmente si se relacionan los resultados obtenidos con parámetros como: la limpieza de la superficie o la calidad del producto alimenticio (Fung, 2002).

### **7.1. Aplicación de los métodos clásicos**

Tradicionalmente la valoración de una superficie se realiza mediante métodos microbiológicos como el hisopado (con hisopos o esponjas) seguido de un cultivo microbiano, la aplicación-impronta y aguas de enjuague (PDA, 1998; Maukonen *et al.*, 2003). No obstante, los análisis tradicionales y estandarizados para la presencia de microorganismos patógenos confían en el enriquecimiento y el aislamiento de colonias sospechosas sobre un medio sólido usando medios de diagnóstico. Esto usualmente seguido de identificación bioquímica o serológica. Los métodos tradicionales, aunque fiables y eficientes, requieren al menos varios días a una semana antes de que los resultados sean obtenidos (Malorny *et al.*, 2003b). En general los métodos microbiológicos convencionales requieren periodos de incubación que los hace inapropiados como herramienta de vigilancia rápida para el APPCC (Maukonen *et al.*, 2003).

#### **7.1.1. Hisopado**

El hisopado consiste en arrastrar un hisopo de algodón estéril (habitualmente sumergido en un diluyente estéril) por encima de la superficie que se desea analizar. El principal problema de esta técnica radica en que hay variaciones individuales en la forma de aplicarla. Debido a ello, los recuentos no suelen ser reproducibles y se detecta una gran variabilidad en los resultados. Otro inconveniente que posee la técnica es que los microorganismos adheridos (*biofilms*) no son arrastrados por el algodón, o bien, pueden quedar retenidos en el mismo, y en consecuencia, los resultados obtenidos son más bajos de lo esperado (Holah *et al.*, 1988). Por otro lado, las ventajas principales, por las cuales se sigue utilizando esta técnica, se relacionan con un bajo coste, amplia disponibilidad, adaptable a una gran variedad de superficies y a que permite el muestreo de un área definida (PDA, 1998).

### 7.1.2. *Aplicación-impronta*

Los métodos de aplicación-impronta utilizan placas de contacto como las placas Rodac o tipo *slides* (laminocultivos). La desventaja de esta técnica es que sólo es eficaz en superficies planas, lisas y con recuentos microbianos bajos, ya que no es posible hacer diluciones. El método de contacto es fácil de usar, sin embargo presenta factores limitantes como es el desprendimiento bacteriano de las superficies. Existen células y esporas que adheridas a una superficie no pueden ser desprendidas con facilidad, ya que tienen habilidad para adherirse a las superficies de acero inoxidable después de un periodo de contacto corto (Mafu *et al.*, 1990). En el caso de biofilms previamente se debe romper su estructura antes de aplicar la técnica (Pontrefract, 1991; Boer y Beumer, 1999).

Kusumaningrum *et al.* (2003) realizaron un estudio donde compararon la recuperación de cuatro microorganismos (*Bacillus cereus*, *S. aureus*, *S. enteritidis* y *C. jejuni*) inoculados sobre superficies de acero inoxidable a tres diferentes concentraciones ( $10^3$ ,  $10^5$  y  $10^7$  UFC/100 cm<sup>2</sup>) y observaron que un 18-20% fue recuperado al usar hisopado, mientras que al usar solamente una placa de contacto Rodac los niveles de recuperación fueron dependientes del microorganismo de prueba. *B. cereus* mostró un 18%, *Salmonella* un 23%, mientras que para *Campylobacter* fue sólo de 7%, explicando la posibilidad que este último microorganismo fue más susceptible a las condiciones de sequedad a las que fueron sometidos.

Las placas 3 M™ Petrifilm™ han sido utilizadas como placas de contacto sobre superficies de equipos y utensilios. Las placas Petrifilm contienen una película seca y rehidratable, comprimida con un medio listo para usarse, un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de pH y un colorante que incrementa la visualización del crecimiento. Su desarrollo ha permitido abreviar algunos inconvenientes del cultivo microbiano convencional, principalmente en términos de preparación (Russell, 2000; Silbernagel y Lindberg, 2002; Ingham *et al.*, 2003). El uso de las placas Petrifilm rehidratadas (como placas de contacto) ha permitido evaluar el estatus higiénico sobre las superficies secas de equipos de plantas productoras de leche a pequeña escala. Gran *et al.* (2002a; 2002b) clasificaron las

superficies en tres grupos (Grado A, B y C) de acuerdo a los niveles de contaminación obtenidos al realizar conjuntamente tres determinaciones, tales como: recuento de mesófilos aerobios (RMA), coliformes y *E. coli*. Estos autores denominaron un grado “A”, “B” y “C” a superficies con un RMA menor a 100 UFC/20 cm<sup>2</sup>, entre 100 – 300 UFC/20 cm<sup>2</sup> y mayor a 300 UFC/20 cm<sup>2</sup>, respectivamente.

### 7.1.3. Aguas de enjuague

Las muestras de agua de enjuague pueden ser evaluadas a intervalos de tiempo durante la limpieza y hasta completar el proceso de higienización. Al realizar el muestreo se debe considerar el momento adecuado, la localización, y el volumen. Entre las ventajas se encuentran que es adaptable para un control en línea, no es molesto, es menos dependiente de la técnica que el hisopado, además permite el muestreo de superficies de áreas mayores y únicas. Sin embargo, sus desventajas principales pueden ser que la sensibilidad de la prueba sea menor, debido a que la distribución de los contaminantes o residuos no sea homogénea. Por lo tanto, el volumen del agua de enjuague es crítico para asegurar la interpretación correcta de los resultados (PDA, 1998). En sistemas cerrados que son higienizados por procedimientos *clean in place* (CIP), usualmente es determinada la carga microbiana analizando el agua de enjuague (Griffiths, 1997).

## 7.2. Aplicación de los métodos rápidos

Para certificar la seguridad integral del abastecimiento de alimentos, se requieren de métodos contemporáneos para una supervisión rápida, eficaz y precisa de la higiene ambiental, la identificación de peligros biológicos y la valoración de la calidad del producto (Chen, 2003). Por lo tanto, es evidente la necesidad de desarrollar nuevos métodos de control de superficies, especialmente si son rápidos y fiables, para proporcionar información sobre la presencia de microorganismos en materias primas y productos finales. Dichos métodos permiten el control del proceso de elaboración y la vigilancia de la eficacia de los sistemas de higienización, para así poder aplicar las medidas correctoras oportunas en el mismo momento que se efectúan determinaciones (Holah *et al.*, 1988; Boer y Beumer,

1999). Se requiere que estos métodos posean una sensibilidad similar, o mayor que los métodos convencionales. Los métodos deberían ser robustos y confiables, con una especificidad que minimice los resultados falsos-positivos (Keith, 1997).

### 7.2.1. *Pruebas inmunológicas*

Una de las principales pruebas inmunológicas es el *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) que usa anticuerpos monoclonales o policlonales para detectar microorganismos patógenos. Para producir anticuerpos específicos se utilizan como antígenos las estructuras superficiales, metabolitos tóxicos o células completas de los propios microorganismos. En el ELISA, esos anticuerpos identifican sus correspondientes antígenos, cuya presencia indica la contaminación de la muestra analizada. Sin embargo, cuando la molécula del antígeno es muy pequeña o se encuentra muy diluida, la reacción no es detectada. Por lo tanto, para la generación de una señal detectable se utiliza un anticuerpo secundario (actúa contra el anticuerpo primario) conjugado con una enzima (Chen, 2003). Un formato muy común es el ELISA “sandwich”, en donde un antígeno debe tener más de un sitio de enlace. Un anticuerpo es enlazado a una fase sólida para capturar el antígeno, y el anticuerpo secundario marcado con la enzima (anticuerpos conjugados), proporciona una señal detectable al catalizar el substrato adecuado en un producto fluorescente (Gasánov *et al.*, 2005).

Entre los kits inmunodiagnósticos comerciales que utilizan este formato está el *Vitek Immuno Diagnostic Assay System* (VIDAS) de BioMérieux Inc. (Chen, 2003; Sewell *et al.*, 2003). El VIDAS es un sistema automatizado que utiliza la técnica *Enzyme-Linked Fluorescent Assay* (ELFA), que acopla la automatización con la tecnología ELISA (Gasánov *et al.*, 2005). Este ensayo proporciona resultados en tres días cuando las muestras son negativas, siendo una ventaja, ya que evita dos días de pruebas; sin embargo, cuando se realiza una inmunocentración, los resultados se obtienen en sólo un día (Keith, 1997).

Keith (1997) realizó un estudio donde comparó el ensayo VIDAS con el método de cultivo convencional para la detección de *Salmonella* en muestras de leche, suero y productos con

maltodextrinas inoculadas artificialmente y la detección global obtenida fue de 96% y 97% para VIDAS y método de cultivo convencional, respectivamente. El umbral de detección con VIDAS fue de  $10^4$  CFU/ml, además un 4,3% de resultados falsos negativos debido a la concentración de *Salmonella* que no alcanzó el umbral de detección requerido. También observó que la presencia de microflora competitiva (*Citrobacter freundii*) disminuyó la sensibilidad de ambos métodos en una unidad porcentual. No obstante, *C. freundii* no generó resultados falsos positivos, lo que indicó una alta especificidad de los antígenos de *Salmonella*.

### 7.2.2. Pruebas enzimáticas.

La detección del trifosfato de adenosina (ATP) por bioluminiscencia es una de las principales pruebas enzimáticas utilizada como método de análisis microbiológico rápido, debido a que proporciona en tiempo real una valoración estimada de la higiene de la superficie total (Davidson *et al.*, 1999).

#### 7.2.2.1. Principio de bioluminiscencia

El ATP es un nucleótido que consiste en una unidad de adenina, ribosa y trifosfato. La bioluminiscencia es luz emitida por organismos vivos que tienen la habilidad de producir las enzimas luciferasas (Chen, 2003). La detección del ATP por bioluminiscencia se basa en la detección de la energía celular de los organismos vivos. La enzima luciferasa, proveniente de la luciérnaga (*Photinus pyralis*), es añadida a la muestra conteniendo ATP junto con la luciferina. La luciferasa cataliza una reacción de oxidación de la luciferina en un producto inestable que se descompone y emite fotones de luz, a una longitud de onda que oscila entre 560 – 630 nm, que pueden ser medidos en un luminómetro (Champiat *et al.*, 2001; Chen, 2003). La cantidad de luz generada es proporcional a la cantidad de ATP presente en la muestra (Fung, 2002) y refleja el nivel de células activas metabólicamente en un sistema (Chen, 2003).

### 7.2.2.2. Ventajas y limitaciones

Los ensayos de bioluminiscencia tienen la ventaja que pueden ser suficientes cuando en una planta predomina el interés por el seguimiento general de la higienización, sin necesidad del aislamiento, recuperación, e identificación de una bacteria específica (Gracias y McKillip, 2004). El ensayo presenta algunas limitaciones que pueden influir en la reacción, como: pH, temperatura, presencia de inhibidores de la enzima (detergentes), y otros (Boer y Beumer, 1999). Algunos limpiadores y desinfectantes pueden incrementar o extinguir la señal de bioluminiscencia ocasionando resultados falsos (Velázquez y Feirtag, 1997). En cambio, si se requiere que el ensayo detecte únicamente microorganismos se debe segregar, tanto el ATP microbiano como el ATP somático, ya sea por filtración o destrucción del ATP somático, los cuales extienden el tiempo de ensayo y disminuyen la sensibilidad (Maukonen *et al.*, 2003). Algunos autores han descrito límites de detección con el uso del ATP para estimar el recuento total de células viables de  $10^4$  o  $10^5$  UFC (Vanne *et al.*, 1996; Corbitt *et al.*, 2000) y otros de  $10^3 - 10^4$  UFC/ml (Chen, 2003).

### 7.2.2.3. Aplicaciones de la bioluminiscencia en la industria alimentaria

Actualmente, la bioluminiscencia es usada ampliamente para una valoración rápida de las condiciones de procesamiento y de la carga microbiana en los alimentos. Además, es una herramienta del APPCC para la vigilancia de los PCC. En contraste con la técnica del hisopado, la medida de ATP, no evalúa únicamente la contaminación microbiana, sino además la limpieza de los equipos y superficies del procesamiento de alimentos (Chen, 2003). Sin embargo, no es de esperarse una excelente correlación entre la técnica de hisopado con el ATP, debido a la presencia de residuos alimentarios y a la aparición de esporas sin replicar o microorganismos lesionados (Griffiths, 1996). Costa *et al.* (2006) hicieron un estudio para valorar los procedimientos de limpieza y desinfección en superficies de contacto (acero inoxidable) en una industria láctea y no encontraron correlación entre las unidades relativas de luz (URL) y los RMA para clasificar las superficies. Sin embargo, antes y después de la higienización, el 100% de las medidas de ATP fueron mayores a la sugerida por el fabricante como una condición higiénica aceptable. Por otro lado, después de la higienización, encontraron diferencias significativas del RMA entre superficies del equipo. Los autores

sugirieron que el ATP por bioluminiscencia proporciona una herramienta apropiada y complementaria para controlar los procedimientos de higienización. Murphy *et al.* (1998) al evaluar superficies de contacto con la leche post-pasteurización, después de la limpieza y antes de la desinfección del sistema, encontraron que la microbiología convencional fue más sensible que la bioluminiscencia cuando los niveles de ATP fueron bajos (< 100 URL). Además, la metodología detectó ATP no-microbiano de las películas residuales de leche que se encontraron libres de microorganismos no detectables.

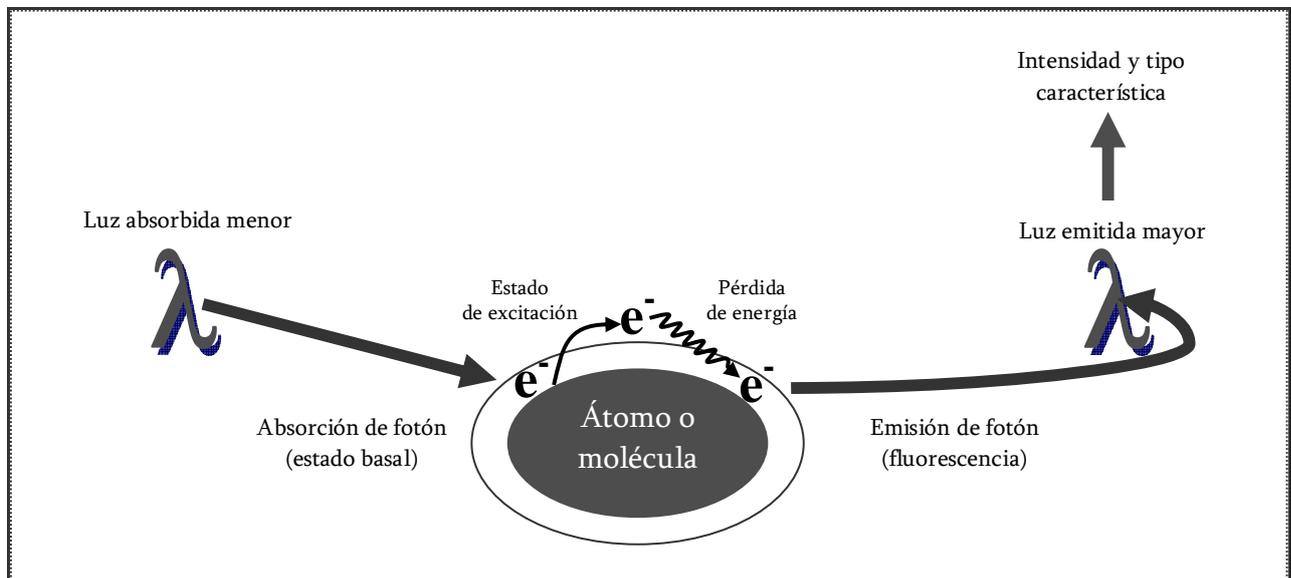
### 7.2.3. *Microscopía de epifluorescencia directa*

Los primeros investigadores que adoptaron la microscopía de epifluorescencia directa (DEM) como sistema de control de la higiene de superficies fueron Holah *et al.* en 1988. Estos autores describieron la DEM por filtración como una técnica que permite cuantificar y demostrar la viabilidad de los microorganismos que permanecen en las superficies de contacto con alimentos en menos de treinta minutos (Holah *et al.*, 1988; Pontrefract, 1991). Las técnicas de microscopía han sido con frecuencia utilizadas como un método de referencia para el cultivo basado en hisopado. Los recuentos celulares por microscopía directa consistentemente dan un resultado, al menos en una unidad logarítmica, mayor que el método de cultivo (Holah *et al.*, 1988). Esto puede deberse a que la bacteria no crece bajo condiciones tales como en la placa del método de cultivo convencional o que un número mayor de bacterias permanecen sobre la superficie después del hisopado (Wirtanen y Salo, 2003). Para la cuantificación de viabilidad celular se utilizan sistemas de análisis de imagen, que son programas informáticos que permiten realizar los recuentos automáticos y analizar las imágenes obtenidas. Además, se puede obtener una valiosa cantidad de información (área, diámetro, perímetro, etc.) en poco tiempo mediante la ordenación de una serie de parámetros (Maukonen *et al.*, 2003).

#### 7.2.3.1. Principio de fluorescencia

La fluorescencia es una propiedad de algunos átomos y moléculas para emitir luz a una longitud de onda después de absorber luz de una longitud de onda específica y más corta (Li *et al.*, 2004). La luz emitida (fotones) es de una longitud de onda mayor y de una intensidad

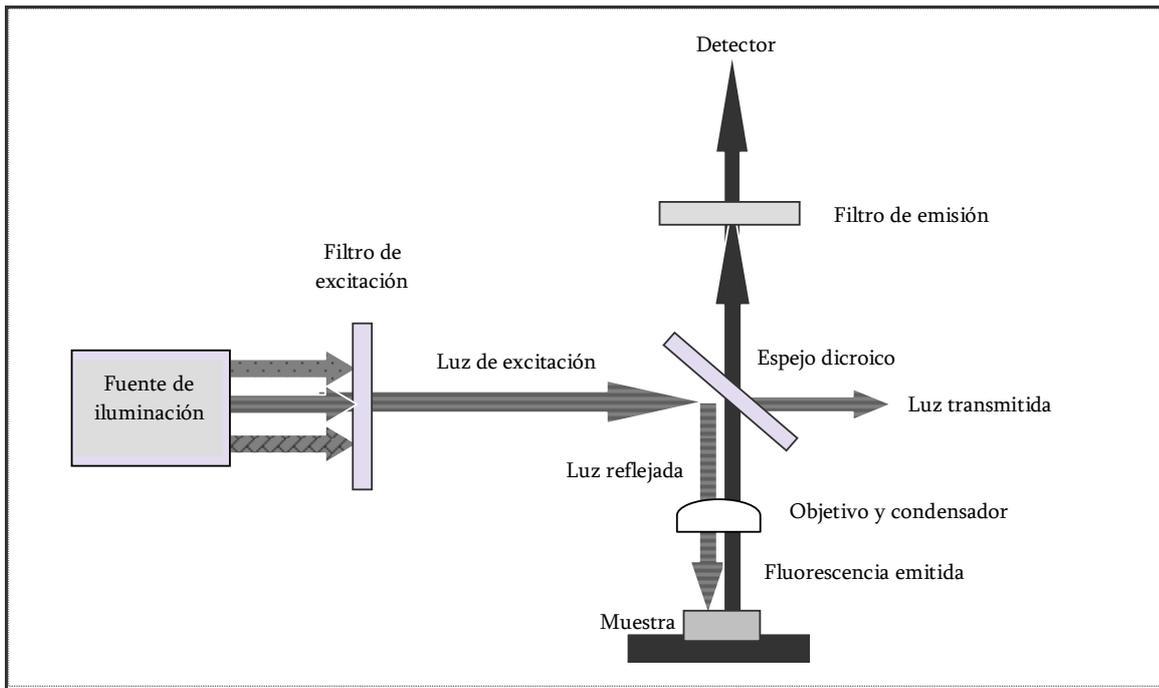
mas baja que la luz absorbida debido a la pérdida de energía vibracional al medio ambiente (Figura 2).



**Figura 2.** Principio de fluorescencia. Cambios de estado de un electrón ( $e^-$ ) en un átomo o molécula después de absorber un fotón. El electrón puede ser excitado a diferentes estados de excitación, pero sólo es mostrado el primero. La fluorescencia aparece cuando el electrón emite un fotón a una longitud de onda mayor y retorna al estado basal.

### 7.2.3.2. Principio de la microscopía fluorescencia

Los microscopios de fluorescencia son agrupados en dos categorías de acuerdo a sus vías ópticas: i) microscopios de fluorescencia de luz transmitida, y ii) microscopios de fluorescencia de luz incidente o epi-iluminación. Los microscopios de luz transmitida requieren una cuidadosa alineación del condensador y los objetivos para evitar la interferencia de la luz de excitación con la fluorescencia emitida. En cambio, en el microscopio de epifluorescencia el condensador es también el objetivo, por lo tanto, sólo existe una vía óptica al detector y el alineamiento no es necesario. Otra ventaja del microscopio de epifluorescencia es el uso efectivo de un segundo filtro, llamado espejo dicróico, que está diseñado para reflejar la luz de longitud de onda más corta mientras transmite la luz de onda más larga (Figura 3); siendo éste una de las mayores ventajas del microscopio de epifluorescencia sobre el microscopio de fluorescencia de luz transmitida (Herman 1998 citado por Li *et al.*, 2004).



**Figura 3.** Componentes principales de un microscopio de luz incidente o epifluorescencia.

### 7.2.3.3. Métodos para valorar la viabilidad celular

Las células viables se definen como aquellas células capaces de realizar todas las funciones necesarias para la supervivencia bajo ciertas condiciones dadas. Generalmente, para valorar la viabilidad celular se toma como punto de referencia la habilidad de la célula para reproducirse y comúnmente es determinada por el método de recuento en placa. Sin embargo, cuando las células están muertas, dañadas subletalmente, viables pero no cultivables (VBNC), durmientes o inactivas no son visibles en placa. Por lo tanto, los elementos clave para que una célula sobreviva son: i) la membrana citoplasmática intacta, ii) la transcripción de ADN (ácido desoxirribonucleico) y la traducción de ARN (ácido ribonucleico), iii) la generación de energía para el mantenimiento metabólico (biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos), y iv) el crecimiento y multiplicación (Breeuwer y Abee, 2000). Existen numerosos métodos para evaluar la viabilidad celular basados en los elementos claves de supervivencia (**Tabla 4**).

### 7.2.3.4. Clasificación de colorantes vitales

Existen diversos colorantes vitales que pueden ser clasificados de acuerdo a sus características funcionales:

1. Colorantes fluorescentes: fluorescen según el componente diana de enlace celular (por ejemplo: ácidos nucleicos o proteínas).
2. Colorantes no-fluorescentes: fluorescen como resultado de un proceso metabólico celular.

**Tabla 4.** Valoraciones y métodos para evaluar la viabilidad celular (adaptado de Breeuwer y Abee, 2000).

Valoración	Método	Tiempo de análisis	Comentario
Reproducción	Método de recuento en placa	2 – 5 días	Sensibilidad elevada
Morfología celular	Inhibición de la división celular por el ácido nalidíxico u otros antibióticos	6 h	Solamente para la sensibilidad antibiótica bacteriana, análisis microscópico de células alargadas
Integridad de membrana	Métodos de exclusión del colorante, marcaje con azul de metileno, sondas de ADN	30 min	Células viables con membrana citoplasmática intacta no son teñidas
Actividad respiratoria	Reducción de los colorantes tetrazolio en las células con la cadena de transferencia electrónica activa	1 – 4 h	Acumulación de productos de formazán insolubles. No se aplica para microorganismos fermentadores
Actividad enzimática	Método de diacetato de fluoresceína (actividad esterasa)	30 min	La fluorescencia es acumulada en las células intactas
Potencial de membrana	Distribución de rodamina 123, carboxicianina y oxonoles	1 h	El potencial es dependiente de el consumo o exclusión del colorante
Gradiente de pH	Medida del pH intracelular usando derivados de fluoresceína	1 h	Las células viables mantienen el gradiente de pH

En el primer grupo se encuentran colorantes desarrollados para diferenciar células vivas, activas metabólicamente o muertas. Entre los fluorocromos que tiñen ácidos nucleicos se encuentran: naranja de acridina, yoduro de propidio, 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y la amplia gama de SYTO-X. Todos ellos son principalmente utilizados en la enumeración bacteriana. En cuanto a fluorocromos que tiñen proteínas está el isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Li *et al.*, 2004). En el segundo grupo se encuentra el cloruro 5-ciano-2,3-ditolil tetrazolio (CTC), utilizado para evaluar la actividad respiratoria de las células. El CTC penetra en células viables a nivel respiratorio, vía cadena transportadora de electrones, donde es reducido formando productos insolubles (formazán) rojo fluorescentes (Rodríguez

*et al.*, 1992). Otro sería el diacetato de fluoresceína (FDA) que forma la fluoresceína por la acción enzimática intracelular de células con membrana y actividad esterasa intactas (Breeuwer y Abee, 2000).

#### 7.2.3.5. Tinciones fluorescentes para valorar la integridad de membrana

Entre los colorantes fluorescentes utilizados para valorar la viabilidad celular, específicamente la integridad de membrana, se encuentran: el azul de metileno y rojo Congo; además de las sondas de ADN como: yoduro de propidio, bromuro de etidio, PO-PRO-3 y SYTOX Green (Breeuwer y Abee, 2000). The LIVE/DEAD® *BacLight*™ Bacterial Viability, es uno de los kits comerciales utilizados y permite realizar un recuento microscópico. El kit consiste en una mezcla de 2 colorantes fluorescentes que tiñen ácidos nucleicos: SYTO® 9 y yoduro de propidio. Ambos colorantes difieren de sus características espectrales y tienen la habilidad de penetrar las células bacterianas. Los rangos de excitación y emisión son 510/540 nm y 620/650 nm para SYTO 9 y yoduro de propidio, respectivamente. Con una mezcla apropiada de los colorantes, SYTO 9 penetra la membrana (intacta y dañada) de todas las células, tiñéndolas de verde. Sin embargo, el yoduro de propidio penetra solamente en las células con membrana celular dañada (reduce el SYTO 9) tiñéndolas de rojo (Molecular Probes, 2004).

#### 7.2.3.6. Ventajas y limitaciones de la microscopía de epifluorescencia

Los principales atributos de la microscopía de fluorescencia son: la especificidad, la sensibilidad, la espectroscopía, la resolución temporal y espacial (Maukonen *et al.*, 2000). Además, el hecho de ser un proceso parcialmente automatizado, permite visualizar un mayor número de campos y ello se traduce a una reducción del límite de detección hasta de 100 UFC/ml o cm<sup>2</sup> (Maukonen *et al.*, 2003). No obstante, la microscopía de epifluorescencia como una herramienta para estudiar la interacción de bacterias con el alimento y la función de la microestructura del alimento, en cuestión de calidad y seguridad, presenta la desventaja de sólo permitir la visualización en un plano; en cambio, usando la microscopía láser confocal (CLSM) las estructuras son observadas en tres dimensiones, sin dividir físicamente el espécimen e *in situ* (Takeuchi y Frank, 2001).

### 7.2.3.7. Aplicaciones de la microscopía de epifluorescencia

La microscopía de epifluorescencia se ha utilizado como herramienta de investigación en la industria alimentaria para una amplia variedad de aplicaciones, entre ellas: i) tratamientos de inactivación, ii) valoración de la calidad de cultivos iniciadores para la producción de vino, cerveza, yogurt, y iii) viabilidad de los microorganismos durante las diferentes etapas de la formación de biofilms bacterianos de origen alimentario (Wirtanen y Mattila-Sandholm, 1993; Morris *et al.*, 1997; Breeuwer y Abee, 2000). Además, para la enumeración directa de bacterias totales y viables en agua potable (Boulos *et al.*, 1999) y en la determinación del recuento bacteriano total en leche cruda aplicando la técnica semi-automática de filtración combinada con microscopía de epifluorescencia directa (DEFT) (Hermidia *et al.*, 2000).

### 7.3. Métodos basados en la amplificación molecular

A finales de los años 80's la hibridación del ADN ha sido favorecida para desarrollar métodos de enumeración cuantitativos y muy específicos, además con un tiempo de análisis corto. Su implementación es significativa en los métodos de pruebas de diagnóstico molecular, especialmente los que incorporan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Cockerill y Reischl, 2002). La PCR es una técnica usada para la amplificación del ADN *in vitro*. El ensayo se lleva a cabo en un termociclador de ADN que proporciona ciclos repetidos de cambios de temperatura. Durante esos ciclos y en un periodo de tiempo corto, pueden ser amplificados niveles muy bajos de ADN diana a millones de copias (Chen, 2003). Las tecnologías rápidas de amplificación y detección de los ácidos nucleicos están desplazando a los análisis tradicionales. Por lo tanto, la PCR se ha convertido en la técnica de amplificación de los ácidos nucleicos de uso general (Mackay, 2004). La introducción de la PCR en los diagnósticos microbiológicos ha sido establecida por los laboratorios de investigación como una alternativa valiosa a los métodos de detección tradicionales (Malorny *et al.*, 2003b).

### 7.3.1. *PCR convencional*

Se denomina PCR convencional a las combinaciones existentes de PCR y de los análisis para la detección del fragmento de ADN amplificado, denominado “amplicon” (Mackay, 2004). La PCR convencional puede ser dividida en tres fases, y algunas veces en 4 fases (Uhl *et al.*, 2002; Mackay, 2004):

- i) En la primera fase, el ácido nucleico diana es extraído de la muestra, generalmente el ácido nucleico diana es exclusivo de un organismo, por lo tanto aquel organismo puede ser identificado o cuantificado.
- ii) En la segunda fase, la PCR es llevada a cabo. En cada ciclo térmico, la temperatura asciende a 90 °C para desnaturalizar la doble hebra de ADN (etapa de desnaturalización), bajando a 50-60 °C para permitir la hibridación de los cebadores o *primers* iniciadores de la PCR a la hebra simple de ADN (etapa de hibridación). La secuencia de los nucleótidos iniciadores es complementaria a los extremos 5' y 3' de la plantilla de ADN (Chen, 2003). La temperatura a la cual generalmente hibrida el iniciador se conoce como temperatura de fusión ( $T_m$ ), es donde el 50% de los oligonucleótidos diana se han formado. Finalmente, se asciende a 70 – 78 °C, temperatura óptima a la cual la enzima termoestable, *Thermus aquaticus* (*Taq*) ADN polimerasa (Holland *et al.*, 1991), puede funcionar y producir una hebra complementaria de ADN (etapa de elongación). Además de la plantilla de ADN y la enzima, se requieren otros componentes para la reacción: desoxinucleótidos de trifosfatos (dNTPs) y sales ( $MgCl_2$ ). Las sales proporcionan condiciones óptimas de reacción y los dNTPs sirven de sustrato a la *Taq* polimerasa (Chen, 2003).
- iii) En la tercera fase de la PCR convencional, el ADN amplificado o *amplicon*, es medido por electroforesis a través de un gel de agarosa y teñido con bromuro de etidio. Las distancias de migración a través del gel, tanto para el amplicon como para los estándares de peso molecular conocido, son comparadas. Basado en ésta comparación, es asignado el peso molecular al amplicon medido.
- iv) La cuarta fase se emplea para confirmar que el producto amplificado fue correcto y específico para el ácido nucleico diana esperado. Muchos de los nuevos formatos

eliminan la tercera etapa y sólo realizan la cuarta etapa confirmatoria, utilizando formatos como: Southern blot y más recientemente ensayos de captura de hibridación enzimática.

En resumen, las pruebas de PCR convencional requieren por lo menos de 2 a 3 días de laboratorio para completarlas (Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2003).

#### 7.3.1.1. Limitaciones de la PCR convencional

El inconveniente principal de la PCR convencional es que la cuantificación del ADN se basa en su determinación en el punto final, es decir, cuando la amplificación ha alcanzado su rendimiento máximo (fase meseta). Por lo tanto, la falta de información cuantitativa durante la fase exponencial limita la correlación de la cantidad de producto amplificado con el número inicial de moléculas diana. Esto debido a que: i) en los ciclos finales los reactivos se han agotado, ii) la actividad de la enzima polimerasa se ha termodegradado y iii) la eficiencia de la amplificación es variable de una reacción a otra, incluso en ciclos sucesivos de la misma reacción (Weighardt, 2003). Además, los formatos para evaluar el amplicon requiere de un manejo laborioso post-PCR (Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2003).

A pesar de que la amplificación *in vitro* del ADN por PCR es una herramienta poderosa en el diagnóstico microbiológico, el método produce resultados inconsistentes entre laboratorios expertos y usuario final, esto debido a que existe una carencia de validación internacional y de protocolos estándares, además de la calidad variable de los reactivos y equipos. Debido a lo anterior, en 1990 la Comisión Europea autorizó un proyecto de investigación denominado “FOOD-PCR” enfocado a solucionar esta problemática. El proyecto fue validar y estandarizar el uso de la PCR convencional para la detección de los cinco patógenos más importantes en alimentos: *Campylobacter* spp. termófilo, *E. coli* O157, *Y. enterocolítica*, *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. (Malorny *et al.*, 2003a; Malorny *et al.*, 2003c). Algunos métodos estándares sugeridos por el proyecto FOOD-PCR han sido adaptados para el uso la PCR en tiempo real, por ejemplo; el sistema de PCR convencional

validado internacionalmente para la detección y cuantificación de *Salmonella* spp. (gen *invA*) usando sonda TaqMan® (Hein y cols., 2006).

### 7.3.2. PCR en tiempo real

La técnica de PCR en tiempo real (RTi-PCR) se ha desarrollado con la finalidad de superar el problema mencionado anteriormente y propone establecer una relación entre la concentración de ADN diana y la cantidad de producto de la PCR generado por la amplificación (Weighardt, 2003). La RTi-PCR es un sistema que monitoriza la reacción a medida que tiene lugar (Weighardt, 2003). El término “PCR en tiempo real” implica que los amplicones pueden ser detectados en tiempo real, es decir, después de cada ciclo de PCR (Cockerill y Reischl, 2002). Existen diversas pruebas comerciales que combinan la amplificación del ácido nucleico diana y la detección paralela de los productos de PCR en el mismo recipiente de reacción cerrado. Esto permite una valoración rápida y dinámica de los productos de la PCR, y el sistema cerrado disminuye significativamente el riesgo de transportar o contaminar con ácido nucleico extraño o con amplicones no estériles (Cockerill y Reischl, 2002; Uhl *et al.*, 2002).

La PCR se acopla a la emisión de una señal fluorescente. Esta señal se intensifica proporcionalmente a la cantidad de producto de PCR generado en cada ciclo de reacción sucesivo. Por lo tanto, registrando la emisión fluorescente de cada ciclo, es posible examinar la PCR durante su fase exponencial (Klein, 2002; Weighardt, 2003). Definir la fase exponencial es un pre-requisito para el cálculo preciso del número de copias inicial al principio de la reacción (Klein, 2002). El primer incremento significativo de la fluorescencia, conocido como *Threshold cycle* (Ct) o ciclo umbral, se correlaciona con la cantidad inicial de la plantilla diana (Weighardt, 2003). La eficiencia de la reacción de PCR, cuyo valor óptimo es 1, siendo -3,32 la pendiente en la curva de regresión, indica que la realización de la PCR en tiempo real es excelente (Higuchi *et al.*, 1993). El registro de la acumulación del amplicon en tiempo real ha sido posible por el marcaje de cebadores, sondas de oligonucleótidos (*oligoprobes*) o amplicones con moléculas capaces de emitir fluorescencia (Mackay, 2004).

### 7.3.2.1. Tecnologías usadas comúnmente para la detección del amplicón

La especificidad del método de PCR en tiempo real es dependiente de las sustancias utilizadas para generar y detectar la amplificación, además del instrumento utilizado para registrar la señal (Weighardt, 2003). Los formatos de la PCR en tiempo real han sido acoplados con un termociclador rápido y un detector de fluorescencia en un sistema simple (Cockerill y Reischl, 2002). Las tecnologías de detección usadas y adaptadas para la detección del amplicon en los equipos de PCR en tiempo real, suelen ser comúnmente de estrategia inespecífica y específica.

1. Las tecnologías de detección inespecífica son aquellas que generan la señal de fluorescencia independiente de la secuencia diana, es decir que todos los productos de PCR son detectados. Entre ellos se encuentran los colorantes de intercalación (“intercalating dyes”), tales como el bromuro de etidio y SYBR Green I, que se intercalan y enlazan a la doble hebra de ADN (Klein, 2002; Weighardt, 2003).
2. Las tecnologías de detección específica se refiere a aquellas sondas de oligonucleótidos con marcadores fluorescentes diseñados para una secuencia específica de ADN. Estas sondas al incluir un fluoróforo como marcador son llamadas “fluorogénicas” (Klein, 2002; Mackay, 2004). A su vez, las sondas son clasificadas en: i) sondas de hidrólisis y ii) sondas de hibridación, según la forma en que se produce la liberación de fluorescencia; en las primeras, después de la partición de la sonda y en las segundas durante la hibridación de uno o dos oligonucleótidos al amplicon (Klein, 2002). Entre las sondas de hidrólisis se encuentran: TaqMan® (Holland *et al.*, 1991) y TaqMan® Minor Groove Binder [MGB], también conocidas como *Eclipse oligoprobes* (Afonina *et al.*, 2002). Entre las sondas de hibridación están: las sondas de hibridación de transferencia de energía de resonancia fluorescente (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*, [FRET]) (Sekar y Periasamy, 2003), balizas moleculares (*molecular beacons*, [MB]) (Tyagi y Kramer, 1996), *Scorpions primers* (Thelwell *et al.*, 2000).

### 7.3.2.2. Funcionamiento de las sondas de oligonucleótidos fluorogénicas

El funcionamiento de la mayoría de las sondas fluorogénicas se basa en la FRET. La FRET ocurre entre los marcadores fluorogénicos, es decir, un fluoróforo donador y un fluoróforo aceptor. Al ser excitado el donador, con una luz de cierta longitud de onda, transfiere la energía al aceptor, que después puede emitir luz a una longitud de onda mayor (Mackay, 2004). La FRET tiene lugar bajo tres condiciones: i) cuando existe una proximidad entre los fluoróforos de 10 – 100 amstrongs, ii) cuando el espectro de emisión de fluorescencia del donador solapa el espectro absorción del aceptor, y iii) cuando entre los fluoróforos existe un acoplamiento intermolecular dipolo-dipolo (Weighardt, 2003; Sekar y Periasamy, 2003). Sin embargo, cuando el fluoróforo aceptor es un inhibidor (*non fluorescent quencher*, [NFQ]) disipa la energía más en forma de calor que en fluorescencia (Mackay, 2004). El uso del NFQ es la base de las sondas MB y de sus variantes, como las sondas *molecular beacons* tripartito y *Scorpions primers* (Broude, 2005). A continuación, se mencionan las características de las sondas MB debido a su importancia y utilización en este estudio.

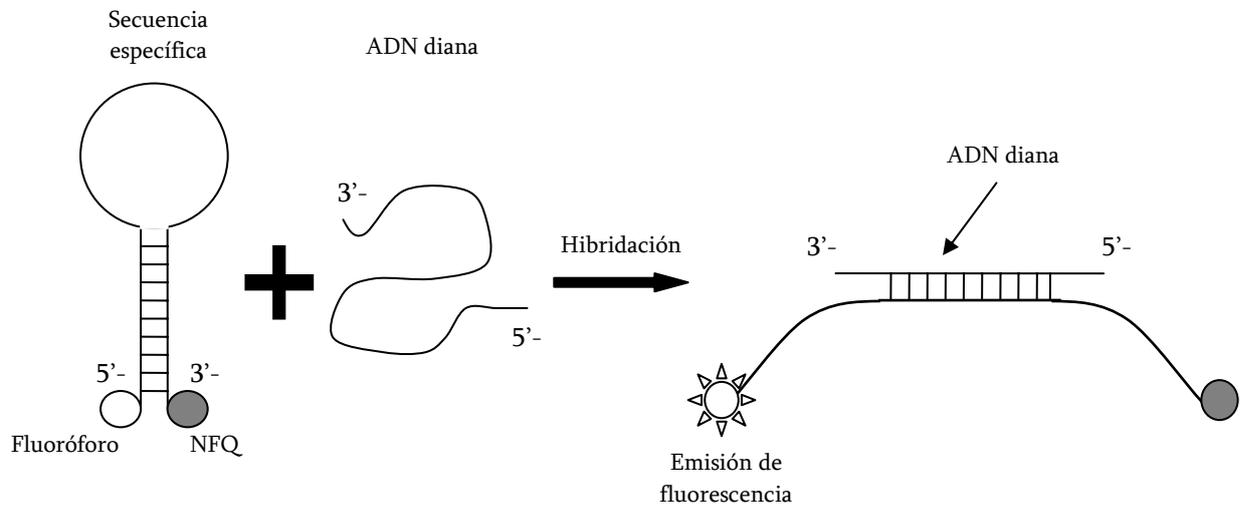
### 7.3.2.3. Molecular beacons

Las sondas fluorogénicas MB han sido incorporadas en muchas técnicas que usan la amplificación del ADN con el objetivo de controlar el proceso de PCR en tiempo real.

#### - *Diseño*

Las sondas MB son oligonucleótidos en forma de piruleta (*hairpin*) que poseen un fluoróforo y un inhibidor (NFQ) al final de los extremos 3'- y 5'-, respectivamente (**Figura 4**). En ausencia del ADN diana, esas moléculas forman una estructura de piruleta cerrada, donde el fluoróforo y el inhibidor están muy próximos y origina la inhibición de la fluorescencia por FRET. La curva de la piruleta es una secuencia complementaria a la diana específica y la parte estrecha que forma el tallo son secuencias complementarias mutuas. En presencia del ADN o ARN diana, las sondas MB adquieren una forma híbrida más larga y fuerte que la forma híbrida en la parte estrecha de su tallo. Por lo tanto, surge un cambio conformacional que causa que el fluoróforo y el inhibidor se separen espacialmente uno del otro,

permitiendo la fluorescencia, por parte del fluoróforo, cuando es iluminado con luz ultravioleta (Tyagi y Kramer, 1996).



**Figura 4.** Diseño de sondas molecular beacons. Debido a la hibridación de la hebra de ADN diana con la secuencia específica (curva de la piruleta), se origina la apertura de la piruleta y el fluoróforo es separado de la influencia del NFQ permitiendo la emisión de la fluorescencia.

En la etapa de hibridación en la PCR en tiempo real, tanto las sondas MB como los cebadores, son hibridizados con la plantilla de ADN diana; por lo tanto, la fluorescencia es registrada en cada etapa de hibridación. Sin embargo, cuando se incrementa la temperatura en la etapa de elongación, las sondas MB se disocian de la plantilla sin interferir con la polimerización de la enzima (Chen *et al.*, 2000).

#### - **Ventajas**

Algunas de las ventajas que ofrecen son: i) alta especificidad, ii) bajo ruido de fondo, iii) el exceso no requiere purificación del producto de PCR, iv) formato simple y homogéneo que se realiza en un tubo sellado. Estas características han convertido a las sondas MB en una herramienta de elección en numerosas aplicaciones (Broude, 2005). Chen *et al.* (2000) aplicaron sondas MB en PCR en tiempo real para la identificación de patógenos de interés alimentario, como *Salmonella*, y demostraron la elevada habilidad de las MB para detectar *Salmonella* y para discriminar entre secuencias muy similares. Uno de los aspectos más

potentes de las sondas MB es la capacidad de distinguir resultados falsos positivos de la amplificación de la PCR.

- ***Limitaciones***

Entre las limitaciones actuales de esta tecnología de detección son el elevado costo de la síntesis de las MB y su inestabilidad en presencia de ADN polimerasas con actividades exonucleasas (Broude, 2005).

En general, la introducción de una sonda incrementa la especificidad del producto cuantificado de la PCR, además permite el desarrollo de reacciones múltiples, *multiplexing*, es decir, análisis que permiten detectar dianas múltiples que pueden ser valoradas en la misma muestra y en el mismo recipiente (Cockerill y Reischl, 2002; Uhl *et al.*, 2002; Klein, 2002).

**7.3.2.4. Introducción del control interno de amplificación**

El uso de un control interno de amplificación (IAC) es utilizado como control de calidad y es adicionado antes de la amplificación. El IAC es una secuencia ADN no-diana presente en el mismo recipiente de la reacción y que es co-amplificada con la secuencia de ADN diana. Una PCR con IAC, proporciona una señal control, aunque la secuencia ADN diana no esté presente. Además, revela posibles fallas de una PCR, tales como la inhibición de la PCR debida a: i) mal funcionamiento del termociclador, ii) mezcla incorrecta de PCR, iii) escasa actividad de la ADN polimerasa o iv) presencia de sustancias inhibitorias de la matriz (Hoorfar *et al.*, 2004; Mackay, 2004). Por lo tanto, la detección de la inhibición durante la PCR previene los resultados falsos negativos (Uyttendaele *et al.*, 2003).

**7.3.2.5. Ventajas y limitaciones de la PCR en tiempo real**

Las principales ventajas de la PCR en tiempo real son (Klein, 2002; Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2003):

1. Alta sensibilidad (< 5 copias)
2. Alta precisión (<2% desviación estándar de los valores de Ct)
3. Eficiencia excelente

4. Amplicon de tamaño reducido
5. Inexistencia de pasos post-PCR
6. Riesgos mínimos de contaminación cruzada
7. Amplio rango de cuantificación (7-8 unidades logarítmicas)
8. Alto rendimiento (tecnología automatizada)
9. Posibilidad de reacciones múltiples

Entre las limitaciones de la PCR en tiempo real podemos mencionar: i) el incremento de la variación conforme aumenta el número de ciclos y después de la transformación a valores lineales, ii) el número máximo de reacciones en un mismo recipiente, iii) además del solapamiento de los espectros de emisión de los fluoróforos en dichas reacciones múltiples, y iv) el incremento del riesgo en resultados falsos negativos (Klein, 2002).

Hay estudios que muestran que el ADN detectable por PCR puede persistir por meses después de la muerte de las células diana (Allmann *et al.*, 1995). No obstante, existen estudios recientes con la RTi-PCR para evaluar el riesgo de resultados falsos positivos en alimentos debido a la presencia de ADN proveniente de células muertas. Nogva *et al.* (2000) utilizaron la RTi-PCR cuantitativa para valorar la cinética de degradación del ADN de cultivos puros de *C. jejuni* y su ADN, y demostraron que la degradación de ADN fue muy rápida en algunos casos. Uno de ellos después de la aplicación de un tratamiento a 100 °C, donde la degradación fue de 4,5 unidades logarítmicas en sólo 6 h. Wolffs *et al.* (2005) evaluaron por RTi-PCR el efecto de matrices alimentarias complejas sobre la degradación del ADN (cromosomal y plásmido) utilizando *Y. enterocolitica* como modelo. Los autores observaron una rápida degradación del ADN en homogeneizado de pollo (1 unidad logarítmica en 0,5 h), siendo mayor que en carne de cerdo, y concluyeron que el riesgo de resultados falsos positivos fue mayor en ésta última matriz.

#### 7.3.2.6. Aplicaciones de la PCR en tiempo real para la detección de microorganismos patógenos de interés alimentario

La PCR en tiempo real tiene muchas aplicaciones, incluyendo la detección de microorganismos patógenos (bacterias, virus y hongos) en microbiología clínica, microbiología de los alimentos y microbiología veterinaria. El incremento del uso de la PCR en tiempo real cuantitativa para la detección de patógenos, y en otras aplicaciones, proporciona la posibilidad de diagnósticos más rápidos y precisos (Mackay, 2004). La principal perspectiva de los diagnósticos microbiológicos moleculares es el uso de la PCR en tiempo real como el método más competente para el análisis cuantitativo de los microorganismos patógenos en las enfermedades transmitidas por los alimentos. La **Tabla 5** presenta un resumen de las metodologías de PCR en tiempo real que han sido aplicadas en el diagnóstico de los microorganismos patógenos de interés alimentario.

#### 7.3.2.7. Otras aplicaciones de la PCR en tiempo real

A pesar de que la aplicación de la PCR en tiempo real es numerosa para muestras alimentarias y ambientales, a nivel de superficies existen escasos trabajos. Entre ellos, podemos mencionar los estudios donde aplicaron RTi-PCR para detectar y cuantificar aerosoles de endosporas de *Bacillus subtilis* subsp. *niger* como biocontaminante (Buttner *et al.*, 2001) y en la detección de una bacteria simulante (*Erwinia herbicola*) de agentes biológicos relacionados al bioterrorismo, como *Yersinia pestis* y *Francisella tularensis* (Buttner *et al.*, 2007). Estos autores evaluaron varios métodos de muestreo de superficies y demostraron la habilidad de la RTi PCR cuantitativa para incrementar la detección y enumeración de biocontaminantes sobre superficies de diversos materiales.

Los estudios más recientes de la RTi-PCR incluyen la combinación de varios métodos de preparación de la muestra, cuya finalidad es separar y concentrar los microorganismos diana, separar las partículas de la matriz alimentaria, eliminar del alimento las sustancias inhibitoras de la reacción que pueden ocasionar resultados falsos negativos (Notzon *et al.*, 2006; Fukushima *et al.*, 2007). Los métodos son aplicadas previamente a la RTi-PCR, tales como i) la separación inmunomagnética (Notzon *et al.*, 2006), ii) la inmunocaptura mediante

flujo continuo [FTI] (Yuk *et al.*, 2006; Warren *et al.*, 2007) y iii) la centrifugación con soluciones de distintos gradientes de densidad [BDC] (Fukushima *et al.*, 2007).

En resumen, existen varios factores que deben ser considerados antes de la adaptación de un nuevo método alternativo o rápido, tales como su: precisión, validación, rapidez, automatización, matriz de la muestra, coste, simplicidad, requerimientos de espacio y entrenamiento (Boer y Beumer, 1999). Para la elección de un sistema u otro, el usuario debe priorizar las características de cada formato disponible, y por consiguiente, las necesidades de la facilidad e implementación de los métodos más prácticos (Gracias y McKillip, 2004).

**Tabla 5.** Metodologías publicadas basadas en la PCR en tiempo real para las bacterias patógenas más representativas de las enfermedades transmitidas por los alimentos.

Microorganismo	Matriz	Límite de detección	Referencia
<i>C. jejuni</i>	Carne cruda de pavo, cerdo, cordero, pollo y despojos, mariscos crudos (contaminación natural) y leche cruda (contaminación artificial) (25 ml de enjuague de 100 g/50 ml MRD <sup>§</sup> )	12 UFC/reacción PCR ‡	(Sails <i>et al.</i> , 2003)
	Carne de pechuga de pollo (5 ml de enjuague de 1 g/5 ml agua de peptona al 0,1%)	1,2 x 10 <sup>4</sup> UFC/ml † 1,2 x 10 <sup>3</sup> UFC/ml – 4 h enriquecimiento 1,2 UFC/ml – 12 h enriquecimiento	(Cheng y Griffiths, 2003)
	Carne de pollo (piezas), leche cruda (50 ml) y agua ambiental (2 L).	6-15 UFC/ reacción PCR †	(Yang <i>et al.</i> , 2003)
	Muestra fecal (12 mg) y cecal (25 mg) de pollo	2,5 – 25 UFC/ reacción de PCR † 2,0 – 20 UFC/ reacción de PCR †	(Rudi <i>et al.</i> , 2004)
	Heces humanas (200 mg)	≈1 x 10 <sup>3</sup> UFC/ g heces†	(LaGier <i>et al.</i> , 2004)
<i>Campylobacter</i> spp.	Heces de pollo ( hisopados/3 ml agua estéril)	50 – 100 UFC/ml de suspensión fecal †	(Lund <i>et al.</i> , 2004)
	Pollo (entero) y cerdo (hisopado de 1400 cm <sup>2</sup> de piel) (pollo: 25 ml de enjuague de la pieza/500 ml de solución salina fisiológica; cerdo: 100 ml de enjuague de la esponja/100 ml de solución salina fisiológica)	10 UFC/ml ‡	(Perelle <i>et al.</i> , 2004b)
	Piel de pollo (pechuga) (10g) (1 ml de enjuague de 10 g/40 ml de caldo Bolton)	1 – 10 UFC/10 g ‡	(Oliveira <i>et al.</i> , 2005b)
	Piel de pollo (pechuga y muslo), cerdo y leche (25 g o ml) (contaminación artificial)	50 UFC/25 g – 12 h de enriquecimiento 1 UFC/25 g – 24 h de enriquecimiento	(Oliveira <i>et al.</i> , 2005a)
<i>Salmonella</i> spp.	Producto fresco (25 g): alfalfa, cilantro, melones (cantalupo) y ensalada mixta preempacada †	4 UFC /25 g	(Liming y Bhagwat, 2004)
	Leche cruda, pescado y carne picada de ternera (25 g) (contaminación artificial y natural)	< 5 UFC/25 g	(Perelle <i>et al.</i> , 2004a)
	Alimentos listos para consumo, cocinados o crudos (carne de cerdo y pollo, mariscos, postres, vegetales, lácteos, sushi, sandwich) (25g)	15 UFC/25 g ‡	(Cheung <i>et al.</i> , 2004)

	Leche cruda, carne de pollo, carne picada (ternera, cerdo y mixta) y salmón (25 g o ml )	2,5 UFC/25 g carne picada y salmón 5 UFC/25 g carne de pollo o 25 ml leche cruda	(Hein <i>et al.</i> , 2006)
<i>S. Abaetatuba</i>	Productos de carne de ternera cruda y listos para el consumo (25 g)	1 UFC/ml ‡	(Ellingson <i>et al.</i> , 2004)
<i>S. Typhimurium</i>	Ensalada mixta preempaquetada ¥ (25 g lavada con agua artificialmente contaminada)	1 – 10 UFC/ml (Instagel matrix) ‡ 100 UFC/ml (BAX lysis buffer) ‡	(Bhagwat, 2004)
<i>S. enteritidis</i>	Carne de cerdo y ternera (25 g), piel de aves (10 g) e hisopados de piel de cerdo (4 x 150 cm <sup>2</sup> ).	5 UFC/25 g ‡	(Uyttendaele <i>et al.</i> , 2003)
	Huevos crudos (10 g)	10 <sup>3</sup> UFC/ml †	(Seo <i>et al.</i> , 2004)
	Helado sabor vainilla y chocolate (5 g)	10 <sup>3</sup> UFC/ml (vainilla) y ND (chocolate) †	(Seo <i>et al.</i> , 2006)
<i>L. monocytogenes</i>	Leche cruda de tanque de almacenamiento (1 – 10 ml)	Identificación de aislados	(Van Kessel <i>et al.</i> , 2004)
	Carne de cerdo cruda, salchichas Frankfurter, salchichas fermentadas y rebanadas de jamón cocido(25 g)	< 100 UFC/g †	(Rodríguez-Lázaro <i>et al.</i> , 2004)
	Melones enteros (cantalupo) y ensaladas mixta preempacada ¥ (25 g)	4 UFC/25 g	(Liming <i>et al.</i> , 2004)
	Hot dogs (ternera)	1,2 – 6.0 UFC/g – 30 h enriquecimiento	(Nguyen <i>et al.</i> , 2004)
	Lechuga (100 g) (contaminación artificial) Ensaladas de restaurantes (contaminación natural)	10 UFC/ml	(Berrada <i>et al.</i> , 2006)
	Salmón, paté queso verde moteado (15 g) y leche cruda (25 g o ml) (contaminación natural y artificial)	9,1 UFC/15 g salmón, 1,0 UFC/15 g paté y queso 7,5 UFC/25 ml leche cruda ‡	(Rossmann <i>et al.</i> , 2006)
<i>E. coli</i> O157:H7	Pan, carne de ternera picada, ensalada verde y aderezo de ensalada (10 g)	5,3 x 10 <sup>3</sup> UFC/g †	(Heller <i>et al.</i> , 2003)
	Suelo, abono, heces y agua residual de lechería (10 g o ml)	6,0 x 10 <sup>5</sup> UFC/g o ml (heces, abono y agua residual) † 6,3 x 10 <sup>3</sup> UFC/g o ml (efluentes) †	(Ibekwe y Grieve, 2003)
	Carne de ternera picada	1,2 – 2,2 UFC/g – 4 h enriquecimiento	(Nguyen <i>et al.</i> , 2004)
	Heceas bovinas (1 g)	512 UFC/g † 1 UFC/g – 6 h enriquecimiento	(Bono <i>et al.</i> , 2004)

### III. Revisión bibliográfica

	Carne de ternera picada	1,3 x 10 <sup>4</sup> UFC/g †	(Fu <i>et al.</i> , 2005)
<i>E. coli</i> O103	Cultivos puros de <i>E. coli</i> productora de toxina Shiga	Detección específica del serogrupo O103 ‡	(Perelle <i>et al.</i> , 2005)
<i>E. coli</i> O26 y <i>E. coli</i> O11	Carne de ternera picada (25 g)	Detección cualitativa ‡	(O'Hanlon <i>et al.</i> , 2005)
<i>Y. enterocolitica</i>	Exudado de carne (2 ml, obtenidos por ciclos de congelamiento y descongelamiento)	1,4 x 10 <sup>3</sup> UFC/ml †	(Wolffs <i>et al.</i> , 2004)
	Cultivos puros de <i>Y. enterocolitica</i> O:9 (YE O:9)	1 – 10 copias genómicas de ADN YE O:9	(Jacobsen <i>et al.</i> , 2005)
	Carne de cerdo y pollo (25 g) (25 ml de enjuague de la pieza/500 ml de solución salina fisiológica) Deposición diarreica (0.5 g)	10 <sup>-3</sup> – 10 <sup>-4</sup> g/ml ADN de YE 1 x 10 <sup>3</sup> UFC/ml ‡	(Wolffs <i>et al.</i> , 2005) (HaoXuan <i>et al.</i> , 2006)
<i>S. aureus</i>	Leche cruda bovina (1 ml) (Inoculada artificialmente y sometida a dos tratamientos térmicos: i) 63 °C 30 min, y ii) 72 °C 15 segundos)	600 UFC/ml † (en ambos tratamientos térmicos)	(Goto <i>et al.</i> , 2007)
<i>S. Enteritidis</i> y <i>L. monocytogenes</i> £	Salchicha de cerdo cruda (10 g, previa inmersión de 30 min en la suspensión bacteriana mixta)	3 UFC/g <i>L. monocytogenes</i> ‡ 4 UFC/g <i>S. Enteritidis</i> ‡	(Wang <i>et al.</i> , 2004)
<i>E. coli</i> O157:H7, <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. Typhimurium</i> £	Col verde, brócoli, coliflor, cilantro y ensalada mixta preempacada ¥ (25g, previo lavado con agua contaminada artificialmente)	1 UFC/ml ( <i>E. coli</i> O157: H7 y <i>S. Typhimurium</i> ) 10 – 100 UFC/ml ( <i>L. monocytogenes</i> ) ‡	(Bhagwat, 2003)
<i>C. jejuni</i> * <i>E. coli</i> O157:H7* <i>Salmonella</i> spp.* <i>Y. enterocolitica</i> *	Deposición estomacal (1g) (200 µl de solución de 1 g/ 9 ml agua destilada)	> 10 <sup>2</sup> UFC/g ‡ <i>C. jejuni</i> > 10 <sup>2</sup> UFC/g ‡ <i>E. coli</i> > 10 <sup>1.3</sup> UFC/g ‡ <i>Salmonella</i> spp. > 10 <sup>2.9</sup> UFC/g ‡ <i>Y. enterocolitica</i>	(Fukushima <i>et al.</i> , 2003)

† Sin enriquecimiento

‡ Con enriquecimiento

£ Detección simultánea

¥ Composición: 80% lechuga, 10% col roja, 10% zanahoria

§ MRD: Maximun recovery diluent

\* Duplex LightCycler-PCR: utilización de 20 pares de primers para distintos patógenos.

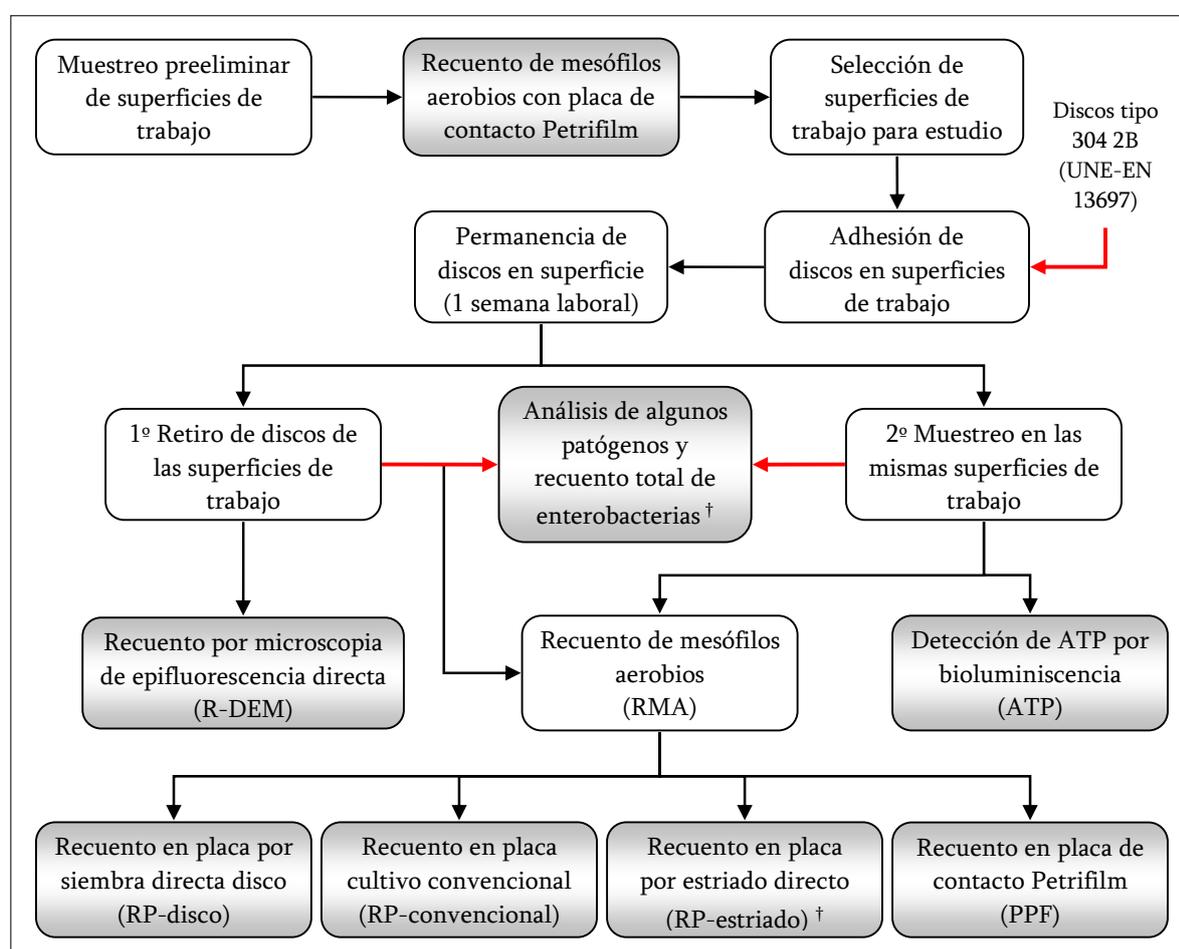
#### IV. Evaluación de metodologías de control higiénico de superficies alimentarias



## 1. Material y métodos

### 1.1. Plan de trabajo

La **Figura 5** muestra el esquema del plan de trabajo para comparar diferentes metodologías de control higiénico en las superficies de la industria alimentaria y del supermercado. El muestreo de las superficies se realizó después de la aplicación del programa de higienización. Primeramente, se realizó un estudio preeliminar y posteriormente el estudio comparativo. Los análisis se realizaron por duplicado y el muestreo se repitió tres veces.



**Figura 5.** Esquema del plan de trabajo en la industria alimentaria y en el supermercado.

† Análisis adicionales realizados solamente en el supermercado.

## 1.2. Características de las instalaciones

Se han estudiado dos tipos de instalaciones diferentes. El objetivo de su selección fue el de comparar las diferencias en base a los protocolos de limpieza-desinfección empleados. Por ello, se seleccionó una empresa alimentaria que utiliza habitualmente sistemas de limpieza en húmedo, mediante el uso de satélites de higienización y una secuencia adecuada en el empleo de productos de limpieza. Es decir, mojado, limpieza, enjuagado, desinfección, enjuagado y secado. El otro tipo de instalación fue bien diferente, ya que se buscaba un tipo de higienización similar al empleado en el ámbito doméstico. Por ello, se analizó el entorno de una gran superficie, como es el supermercado.

### 1.2.1. *Industria alimentaria*

La industria de alimentos elabora productos deshidratados a base de harina vegetal. La industria posee un área de elaboración y envasado, que se divide principalmente en tres zonas de trabajo (A, B y C), en cada una de las cuales la materia prima procesada es diferente. En el proceso se trabaja a temperatura ambiente; sin embargo, existe una fase de secado del producto (140 – 150 °C), por lo que las superficies de trabajo se clasificaron como: antes del secado, durante el secado y después del secado. El acero inoxidable (AISI 304) fue el material predominante en la mayoría de las superficies trabajo, a excepción de dos superficies (hormigón).

### 1.2.2. *Supermercado*

El supermercado, situado en el área metropolitana de Barcelona, distribuye productos de alimentación, tanto envasados como frescos (carne, charcutería, frutas y verduras, pescado y panadería), así como productos de droguería, perfumería y bazar. Las superficies de trabajo se clasificaron por secciones, de acuerdo al producto manipulado (**Figura 6**). Además, también se clasificaron de acuerdo a la temperatura de conservación del producto en: i) refrigeración (2 – 8 °C) y ii) ambiente (20 – 25 °C). Las superficies de trabajo estaban constituidas de diversos tipos de materiales (acero inoxidable, chapa de acero con pintura epoxi, PVC y madera con pintura).



**Figura 6.** Superficies de trabajo del supermercado. a) arcón congelador, b) vitrina expositora, c) exhibidora refrigerada, d) estantería (góndola) y e) mostrador de pescado.

### 1.3. Plan de muestreo

En ambas instalaciones, el muestreo para el estudio preliminar y comparativo, se realizó después de la aplicación del programa de higienización y justo antes del inicio de la jornada laboral. El programa de higienización realizado semanalmente en la industria alimentaria y diariamente en el supermercado, son mostrados en la **Tabla 6** y **Tabla 7**, respectivamente. El estudio preliminar se realizó sobre la totalidad de las superficies de trabajo. En cada superficie de trabajo se fijaron al azar dos puntos de muestreo y se realizó el muestreo por duplicado en cada uno utilizando placas de contacto Petrifilm™ (3M, Minnesota, EUA).

**Tabla 6.** Programa de higienización aplicado a las superficies de trabajo de la industria alimentaria.

Limpieza			Desinfección		
Detergente (concentración)	Aplicación	Enjuague	Desinfectante (concentración)	Aplicación	Enjuague
Detergente líquido alcalino-clorado (4 – 5 %)	Espumado	Si	A base de aldehídos y amonio-cuaternario (3 – 4 %)	Espumado	Si

**Tabla 7.** Programa de higienización aplicado a las superficies de trabajo del supermercado.

Limpieza		Desinfección	
Detergente	Aplicación	Desinfectante (concentración)	Aplicación
Uso doméstico	Bayeta	hipoclorito de sodio (3,5 g/l cloro activo)	Bayeta

Para el estudio comparativo se seleccionó una muestra representativa de superficies de trabajo, conforme a los resultados preliminares y a la valoración del riesgo microbiológico implicado. Para cada metodología comparada, también los análisis fueron realizados por

duplicado en cada punto de muestreo. Las técnicas de muestreo utilizadas fueron: i) hisopado, ii) placas de contacto y iii) discos. Los discos utilizados como soporte para evaluar la contaminación de superficies fueron de acero inoxidable con acabado tipo 304 grado 2B, de 2 cm de diámetro y 1 mm de espesor, ligeramente *convexos*.

Los discos, antes de su uso, fueron limpiados con un detergente (Dipol®, Dino, S.L., España) y desengrasados con 70% isopropanol (Panreac Química S.A., Montcada i Reixach, España), de acuerdo con el procedimiento descrito en la UNE-EN 13697 (Anónimo, 2002). En la parte cóncava se colocó un adhesivo y posteriormente fueron esterilizados a 121 °C durante 15 min. Los discos fueron colocados en las superficies y permanecieron durante 7 días consecutivos correspondientes a una semana laboral. Después de la aplicación del programa de higienización fueron retirados y colocados en placas Petri estériles para la realización posterior de los análisis. Seguidamente, sobre las mismas superficies, se procedió a la toma de muestras con las distintas metodologías a evaluar.

### **1.3.1. *Industria alimentaria***

El muestreo se realizó a intervalos de 15 días durante un periodo de tres meses y el horario de la toma de muestras fue entre 0 a.m. – 7 a.m. Para el estudio preeliminar, se consideró un total de 98 superficies de trabajo distribuidas en las tres zonas. El estudio comparativo de metodologías se realizó con una muestra representativa de 29 superficies de trabajo. Para el estudio comparativo fueron evaluadas las siguientes metodologías: recuento en placa de mesófilos aerobios por cultivo convencional (**RP-convencional**), recuento de mesófilos aerobios con placas de contacto Petrifilm™ (**PPF**) y detección de ATP por bioluminiscencia (**ATP**). Además, el recuento en placa de mesófilos aerobios por siembra directa de los discos (**RP-disco**) y el recuento por microscopia de epifluorescencia directa (**R-DEM**); estos últimos dos análisis realizados a partir de los discos previamente adheridos sobre las mismas superficies. De ésta manera, se obtuvieron 58 muestras por metodología, un total de 290 por ensayo y 870 en los tres ensayos.

### 1.3.2. Supermercado

El muestreo se realizó a intervalos de 15 días durante el periodo de 4 meses y el horario de la toma de muestras fue entre 5 a.m. – 9 a.m. Para el estudio preliminar, se consideró un total de 200 superficies de trabajo distribuidas en las secciones. El estudio comparativo de metodologías se realizó con una muestra representativa de 30 superficies de trabajo constituidas de diversos materiales (**Tabla 8**).

**Tabla 8.** Identificación de las 30 superficies de trabajo seleccionadas para el estudio comparativo en el supermercado.

Puntos de muestreo	Sección	Temperatura de conservación	Material de superficie
7	Carne	Refrigeración	PVC (separadores y paragolpes de exhibidoras refrigeradas)
5	Charcutería y quesos	Refrigeración	Acero inoxidable (AISI 304)
4	Pasillos	Ambiente	Chapa de acero con pintura epoxi
5	Pescado fresco	Refrigeración	Acero inoxidable(AISI 304)
4	Yogurt y postres	Refrigeración	Chapa de acero con pintura epoxi
5	Frutas y verduras frescas	Ambiente	Madera con pintura

Las metodologías evaluadas fueron las mismas que en la industria alimentaria (**sección IV 1.3.1.**), y adicionalmente se efectuó el recuento en placa de mesófilos aerobios por estriado directo del hisopo (**RP-estriado**). Por lo tanto, se obtuvieron 60 muestras por cada metodología, un total de 360 por ensayo y 1080 en los tres ensayos.

Al mismo tiempo, sobre las mismas superficies se tomaron muestras para los análisis de algunos patógenos de interés alimentario y el recuento total de enterobacterias; 30 para el análisis de *L. monocytogenes* y 30 para análisis en común de: recuento total de enterobacterias, *Salmonella* spp., y estafilococos coagulasa positiva. Estos últimos análisis fueron repetidos a partir de discos adheridos, los cuales fueron agrupados por secciones para ser analizados, dando por resultado 12 muestras adicionales. Además, se procedió a realizar el aislamiento y la identificación microbiana de las colonias típicas sobre los medios selectivos. Se obtuvieron un total de 72 muestras por ensayo y 216 durante los tres ensayos.

#### **1.4. Descripción de las metodologías de control higiénico de las superficies**

##### **1.4.1. *Recuento en placa de mesófilos aerobios por cultivo convencional (RP-convencional)***

Se utilizó un hisopo de algodón estéril (IASA, Barcelona, España) contenido en un tubo de ensayo con 8 ml de agua peptonada 1 g/l proteosa-peptona 3 (Difco™, Michigan, EUA) y 8,5 g/l cloruro de sodio (Panreac Química). El hisopado se realizó en un área de 100 cm<sup>2</sup> de la superficie de estudio, de nuevo el hisopo fue transferido al tubo y se agitó durante 1 minuto, posteriormente se tomó una alícuota de 1 ml y se realizaron las diluciones decimales necesarias que permitieran el recuento entre 30 – 300 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por placa. La siembra en masa se realizó por duplicado en el medio de cultivo Plate Count Agar (PCA, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Francia) y las placas se incubaron a 30 °C durante 72 h (Vanderzant y Splittstoesser, 1992).

##### **1.4.2. *Recuento en placa de mesófilos aerobios por estriado directo (RP-estriado)***

Se procedió de la misma manera que en el apartado anterior. Para realizar el muestreo se utilizó el hisopo humedecido y en vez de transferirse al diluyente de nuevo, se realizó la siembra por el estriado directo del hisopo sobre la superficie de la placa de PCA (Becton Dickinson). La totalidad de la superficie se estrió en dos direcciones, en ángulo de 90°, una con respecto a otra. Las placas se incubaron a 30 °C durante 72 h.

##### **1.4.3. *Recuento en placa de mesófilos aerobios por siembra del disco (RP-disco)***

Los discos expuestos se colocaron en placas Petri estériles y después se realizó la siembra en masa en medio PCA (Becton Dickinson). Las placas se incubaron a una temperatura de 30 °C durante 72 h.

##### **1.4.4. *Recuento de mesófilas aerobios en placas de contacto Petrifilm (PPF)***

Las placas Petrifilm™ (3M) para recuento de aerobios fueron hidratadas con agua de peptona, 1 g/l proteosa-peptona 3 (Difco™) y 8,5 g/l cloruro de sodio (Panreac Química), siguiendo las indicaciones del fabricante (3M). El muestreo se realizó levantando la película

superior de la placa (medio de cultivo gelificado) y presionándola alrededor de 10 s sobre la superficie de estudio. Las placas se incubaron a 30 °C durante 72 h. El recuento microbiano se realizó como UFC en el área total de la placa (20 cm<sup>2</sup>).

#### **1.4.5. Detección de ATP por bioluminiscencia (ATP)**

La toma de muestras se realizó con los hisopos CLEAN-TRACE Rapid Cleanliness Test UXL100 (Biotrace, Bridgend, Reino Unido). El hisopo humedecido con un agente catiónico, cuya función es liberar el ATP de los restos orgánicos o células microbianas, se encuentra dentro de un dispositivo que, además, contiene aisladamente un compartimiento para la enzima luciferin-luciferasa, que entra en contacto con el hisopo al activar el dispositivo. El muestreo se realizó en un área de 100 cm<sup>2</sup> de la superficie de estudio, rotando el hisopo constantemente. Una vez activado el dispositivo, se agitó durante 5 s antes de realizar la medición. El equipo luminómetro UNI-LITE Xcel XCE V3.0A (Biotrace) se utilizó para realizar la lectura, que es expresada en Unidades Relativas de Luz (URL).

#### **1.4.6. Recuento por microscopía de epifluorescencia directa (R-DEM)**

Para la realización del recuento microscópico se aplicó la tinción vital, utilizando el Kit The LIVE/DEAD® BacLight™ (L-13152, Molecular Probes, Inc., Oregon, EUA). El kit contiene 2 colorantes fluorescentes que tiñen ácidos nucleicos: SYTO® 9 y yoduro de propidio. Con una mezcla apropiada, el SYTO® 9 penetra en las células con la membrana celular intacta y dañada tiñéndolas de verde. El yoduro de propidio penetra únicamente en las células con membrana celular dañada, y reduce el SYTO® 9, tiñéndolas de rojo. La tinción se realizó agregando 50 µl de la mezcla de colorantes sobre la superficie del disco a evaluar, se mezcló utilizando la misma punta e inmediatamente después se colocó un cubreobjetos sobre la preparación. Se incubó en la oscuridad y a temperatura ambiente durante 15 min máximo. Con el microscopio de epifluorescencia directa Olympus BX51/BX52 (Olympus, Japón) se realizó la observación y se fotografiaron 10 campos al azar utilizando objetivos de 40X. Finalmente se llevo a cabo el análisis de imagen para obtener el recuento microscópico utilizando el software analySIS Auto 3.2, (Soft Imaging System GMBH, Münster, Alemania).

### **1.5. Análisis de algunos patógenos de interés alimentario y recuento total de enterobacterias**

En el supermercado, los análisis se realizaron de dos maneras, a partir de:

1. El hisopado de la superficie de estudio (100 cm<sup>2</sup>) con un hisopo humedecido, transferido a un tubo con 9 ml de agua de peptona tamponada (bioMérieux<sup>®</sup>, Marcy l'Etoile, Francia) o 9 ml de caldo Demi-Fraser (bioMérieux<sup>®</sup>). El tubo se agitó durante 1 minuto y se tomaron las alícuotas para los análisis correspondientes.
2. Discos adheridos y agrupados por sección de trabajo fueron colocados en un bote plástico (Nalgene Nunc International, EUA) de capacidad de 250 ml. De acuerdo al área total de los discos se añadió agua de peptona tamponada (bioMérieux<sup>®</sup>) o caldo Demi-Fraser (bioMérieux<sup>®</sup>) en dilución 1:5.

#### **1.5.1. Recuento de estafilococos coagulasa positiva**

Una alícuota de 0,5 ml de muestra se sembró en superficie utilizando el agar Baird Parker (bioMérieux<sup>®</sup>) suplementado con fibrinógeno bovino y plasma de conejo (BP-RPF). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h.

#### **1.5.2. Detección de *Listeria monocytogenes***

Para el análisis de *L. monocytogenes* se realizó el pre-enriquecimiento de los tubos y frascos con caldo Demi-Fraser (bioMérieux<sup>®</sup>) (**sección IV 1.5.**) a 30 °C durante 18 - 24 h. Después se tomó una alícuota de 0,1 ml, se inoculó en 10 ml de caldo Fraser (bioMérieux<sup>®</sup>) y se incubó a 30 °C durante 48 h. A partir de éste caldo de enriquecimiento selectivo se estrió una placa de medio cromogénico ALOA (AES laboratories, Ker Lann, Francia) y se incubó a 30 °C durante 24 h (Anónimo, 1997c; Anónimo, 2005).

#### **1.5.3. Detección de *Salmonella spp.***

Se realizó el pre-enriquecimiento de los tubos y frascos con agua peptona tamponada (bioMérieux<sup>®</sup>) (**sección IV 1.5.**) a 37 °C durante 18-24 h; posteriormente se tomó una alícuota de 1 ml y se inoculó un tubo de 10 ml de caldo de enriquecimiento selectivo de

Müller Kauffmann con tetracionato y novobiocina (MKTTn, bioMérieux®) y se incubó a 37 °C durante 18 – 24 h (Anónimo, 2003). Finalmente, se estirió el caldo MKTTn en placas de medio selectivo y cromogénico SM® ID 2 (bioMérieux®) y la incubación se realizó a 37 °C durante 24 h.

#### **1.5.4. Recuento total de enterobacterias**

Se realizó tomando alícuotas de 1 ml y 0,1 ml y se sembró en profundidad con “Red Violet Bile Glucose Agar” (VRBGA, Becton Dickinson). La placa se recubrió con una segunda capa de agar utilizando el mismo medio. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h.

#### **1.6. Identificación de la microbiota**

Se realizaron aislamientos del crecimiento microbiano que presentaron las placas de VRBGA y de las colonias típicas en los medios selectivos BP-RPF, SM® ID 2 y ALOA, para realizar su identificación mediante sistemas bioquímicos API (bioMérieux®).

#### **1.7. Análisis estadístico**

En total se realizaron tres muestreos en diferentes días. Los análisis se efectuaron por duplicado en cada muestreo. Los resultados obtenidos por las distintas metodologías se expresaron en unidades logarítmicas (base 10) en un área de 100cm<sup>2</sup>.

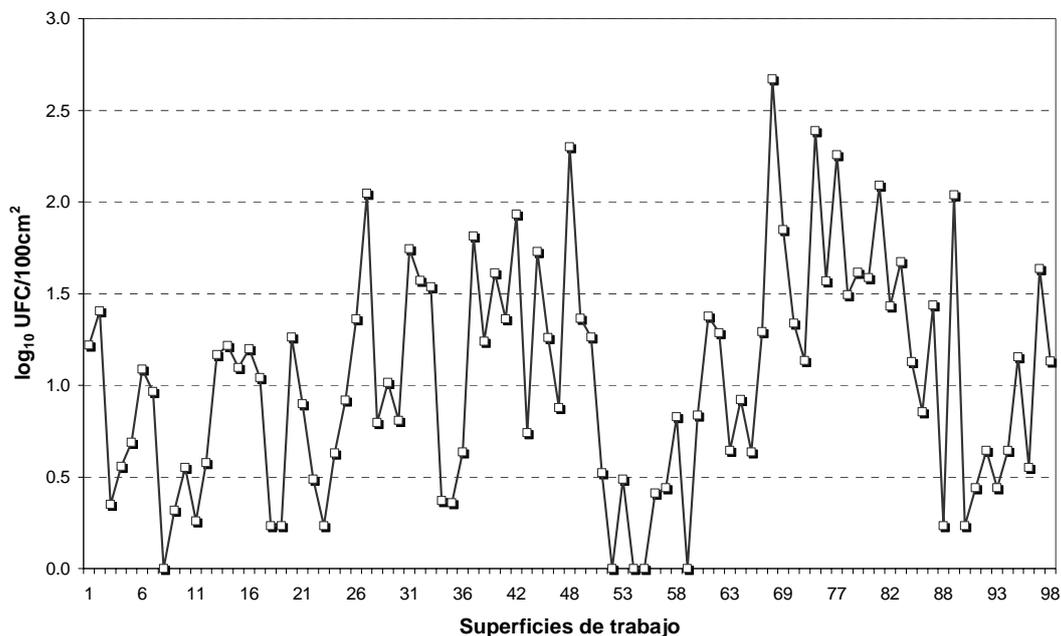
El nivel de contaminación global de las instalaciones se valoró en función de: la metodología aplicada, zona o sección de trabajo, superficies de trabajo, fase del proceso de secado, temperatura de conservación del producto, tipo de material de la superficie y número de ensayo, realizándose el análisis de la varianza y la posterior separación medias con la prueba de Student-Newman-Keuls (SNK). Ambas pruebas con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . Además, se realizó el análisis de regresión para la comparación entre las diferentes metodologías con la finalidad de conocer su relación. Los análisis estadísticos mencionados anteriormente se realizaron con el programa SAS para Windows versión 9.1 (SAS Institute, Inc., EUA).

## 2. Resultados y discusión

### 2.1. Industria alimentaria

#### 2.1.1. Estudio preliminar con placas de contacto Petrifilm para el recuento de mesófilos aerobios

La contaminación promedio de las tres ensayos realizados durante el estudio preeliminar para el recuento de mesófilos aerobios con placas de contacto Petrifilm fue de  $1,03 \pm 0,06 \log_{10}$  UFC/100 cm<sup>2</sup> (n=536) (**Figura 7**). Los resultados del estudio preeliminar mostraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las superficies. Aquellas superficies que se encontraban por encima del valor medio fueron elegidas para su monitorización posterior, al ser consideradas como las más contaminadas. Sin embargo, algunas de estas superficies no se utilizaron para el estudio comparativo debido a que el área y geometría no eran adecuadas para realizar los muestreos múltiples.

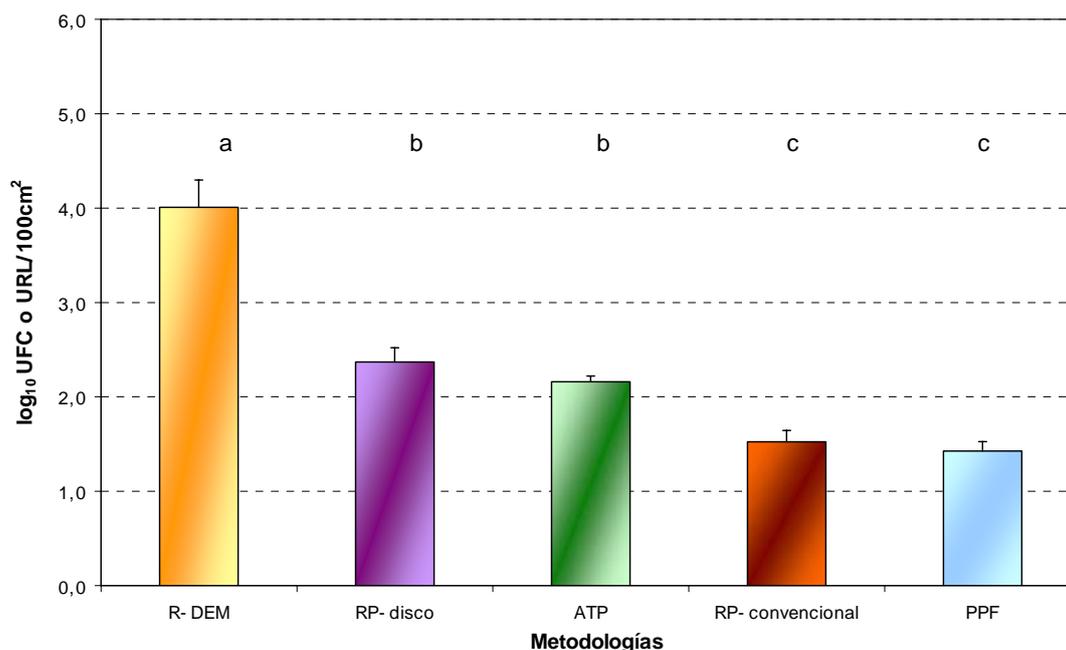


**Figura 7.** Recuento de mesófilos aerobios ( $\log_{10}$  UFC/100cm<sup>2</sup>) en las superficies de trabajo de la industria alimentaria utilizando placas de contacto Petrifilm en el estudio preeliminar. Valor medio de tres muestreos.

### 2.1.2. Estudio comparativo con distintas metodologías

#### 2.1.2.1. Nivel de contaminación en función de las metodologías

En la **Figura 8** se muestra el nivel de contaminación global obtenido en función de las distintas metodologías aplicadas para la determinación del recuento de mesófilos aerobios ( $\log_{10}$  UFC/100cm<sup>2</sup>) y la detección de ATP por bioluminiscencia ( $\log_{10}$  URL/100cm<sup>2</sup>).



**Figura 8.** Nivel de contaminación global en las superficies de la industria alimentaria en función de la metodología utilizada para el recuento de mesófilos aerobios ( $\log_{10}$  UFC/100cm<sup>2</sup>) y la detección de ATP por bioluminiscencia ( $\log_{10}$  URL/100cm<sup>2</sup>). La altura de la columna representa la media  $\pm$  error estándar, n=174.

El análisis estadístico demostró que la metodología aplicada influyó significativamente ( $P < 0,05$ ) sobre el nivel de contaminación global. Además, se pudo observar claramente que el RP-convencional no mostró una diferencia significativa en relación a PPF; lo mismo se observó entre la detección de ATP y RP-disco. Sin embargo, el R-DEM presentó un recuento de células viables significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) con respecto al nivel de contaminación observado por el resto de las metodologías. En este estudio, la exposición de los discos durante una semana y la posterior evaluación por DEM, tiene ventaja con respecto al resto de las metodologías aplicadas, ya que permite evaluar la superficie después de ser sometida a las condiciones reales de la industria, como son: la contaminación *per se* del

proceso y ambiental, y la higienización *in situ*. Además, no es requerido un medio de cultivo para la recuperación de los microorganismos y por lo tanto, el valor obtenido no se ve influenciado por diversos factores como son la composición del medio, el tiempo y temperatura de incubación (Davidson *et al.*, 1999). El RP-convencional resultó en una infraestimación de un orden de  $10^2 - 10^3$  UFC cuando fue comparado con el número de células viables obtenidas por análisis de imagen después de la tinción con LIVE/DEAD. Nuestros resultados son similares a los obtenidos por otros autores (Bredholt *et al.*, 1999).

### 2.1.2.2. Correlación de las metodologías de control higiénico de superficies

Para determinar la existencia de correlación, la RP-convencional fue comparada con las diferentes metodologías y únicamente con la placa Petrifilm (PPF) presentó buena correlación lineal significativa ( $P < 0,0001$ ), con un coeficiente de correlación ( $r$ ) de 0,5546. Posteriormente, se compararon las distintas metodologías entre sí y no se encontraron correlaciones significativas ( $P > 0,05$ ). Nuestros resultados coinciden con Linton *et al.* (1997), que al realizar la comparación entre el método de cultivo convencional y Petrifilm para la recuperación de mesófilos aerobios sobre superficies de acero inoxidable, no encontraron diferencias significativas entre sí.

### 2.1.2.3. Establecimiento de límites de críticos

#### - *En función de límites recomendados*

Los criterios de valoración establecidos, al utilizar placas de contacto tipo “slides”, consideran una contaminación con un valor de RMA  $<1,8$  UFC/cm<sup>2</sup> como ligeramente contaminadas o limpias, entre  $1,8 - 5$  UFC/cm<sup>2</sup> moderada y  $>5$  UFC/cm<sup>2</sup> como inaceptable (Houlala *et al.* 1996 citado por Miettinen *et al.*, 2001). En nuestro estudio, estas pautas microbiológicas podrían tomarse como referencia para el establecimiento de los límites críticos, debido a que a nivel global el RMA obtenido con el uso de placas de contacto Petrifilm (PPF) y el RP-convencional no mostraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ). Además, ambas metodologías presentaron una buena correlación. Basado en lo anterior, si aplicamos estos límites críticos para evaluar la contaminación de las superficies por RP-

convencional y PPF, tendríamos alrededor de un 80% de las superficies como limpias (satisfactorias), un 10% con una contaminación moderada (aceptables) y un 10% como sucias (insatisfactorias).

- ***En función del valor medio del RP-convencional***

En nuestro estudio, el valor medio obtenido por RP-convencional fue 1,53 log<sub>10</sub> UFC/100 cm<sup>2</sup>. Cuando se tomó este valor como límite crítico, el porcentaje de superficies satisfactorias disminuyó a un 54%. En la **Tabla 9** son mostrados los resultados para las distintas metodologías cuando se aplican los límites críticos en función del valor medio de RP-convencional <1,5 log<sub>10</sub> UFC/100 cm<sup>2</sup> como límite satisfactorio y el valor establecido con placas de contacto tipo “slides” >2,7 log<sub>10</sub> UFC/100 cm<sup>2</sup> (equivalente a >5 UFC/cm<sup>2</sup>) como límite insatisfactorio (Houlala *et al.* 1996 citado por Miettinen *et al.*, 2001).

**Tabla 9.** Conformidad de las superficies de la industria alimentaria para las distintas metodologías en función del valor medio de RP-convencional como límite satisfactorio.

Metodología	Conformidad de superficies (%)		
	Satisfactorio (<1,5 log <sub>10</sub> UFC/100 cm <sup>2</sup> )	Aceptable <sup>†</sup> (1,5 – 2,7 log <sub>10</sub> UFC/100 cm <sup>2</sup> )	Insatisfactorio (>2,7 log <sub>10</sub> UFC/100 cm <sup>2</sup> )
RP-convencional	54,0	32,2	13,8
PPF	57,5	32,2	10,3
ATP	12,6	69,0	18,4
RP-disco	24,1	31,0	44,8
R-DEM	32,2	0,0	67,8

<sup>†</sup> Límite de tolerancia obtenido de límites microbiológicos con placa de contacto tipo “slides”, <5 UFC/cm<sup>2</sup>.

**2.1.2.4. Comparación de metodologías en función de la conformidad de superficies**

- ***RP-convencional vs. PPF***

En la **Figura 8** se observó que los valores medios de contaminación global para RP-convencional y PPF estuvieron por debajo del nivel considerado como satisfactorio, siendo de 1,43 y 1,53 log<sub>10</sub> UFC/100 cm<sup>2</sup>, respectivamente. La conformidad de las superficies, en base a los límites críticos del RP-convencional, no mostró diferencias apreciables con

respecto a la clasificación de superficies para PPF. Esto debido a que los valores medios de ambas metodologías no fueron estadísticamente diferentes y a la correlación significativa entre ellas. Aunque ha sido demostrada que la técnica del hisopado no es muy eficaz en la detección de microorganismos adheridos, continua siendo utilizada en las industrias alimentarias debido a su adaptabilidad a la geometría de las superficies y a su fácil manejo (Foschino *et al.*, 2003). Un estudio realizado por Foschino *et al.* (2003), acerca de la comparación de métodos de muestreo en distintas superficies de acero inoxidable, demostró que el porcentaje de recuperación para *E. coli*, por la técnica del hisopado fue de un 1% con respecto a un 80% con el uso de la placa de contacto (Rodac) aplicando un tiempo de contacto de 4h. Nuestros resultados indican que el tiempo de contacto aplicado (alrededor de 10 s) utilizando las placas de contacto Petrifilm fue suficiente para contrastar la recuperación de microorganismos viables, presentes sobre las superficies de acero inoxidable secas, con el hisopado normal para el RP-convencional. Sin embargo, para incrementar la tasa de recuperación con placas de contacto Petrifilm, sería conveniente probar tiempos de contacto más prolongados, pues se ha observado una influencia significativa al incrementar el tiempo de contacto con la superficie contaminada (Foschino *et al.*, 2003).

- ***RP-convencional vs. ATP***

Con respecto a la comparación de los resultados de RP-convencional y ATP (**Tabla 9**), se observó que sólo el 23% de aquellas superficies designadas como limpias por RP-convencional (equivalente a  $<40$  UFC/100 cm<sup>2</sup>) se constataron limpias por ATP. Sin embargo, en las superficies de contaminación moderada por ATP (equivalente a 40 – 500 URL/100 cm<sup>2</sup>), se encontró un contaminación microbiana en un 47% de los hisopados. Por otro lado, solamente el 75% de aquellas superficies designadas como sucias por ATP (equivalente a  $>500$  URL/100 cm<sup>2</sup>) tenían una elevada contaminación microbiana. La principal razón por la cual es difícil encontrar correlación entre los valores de UFC y URL, es porque la medición de ATP es genérica y no puede diferenciar el origen (Larson *et al.*, 2003). En nuestro caso, otra explicación podría ser que no se alcanzó el límite bacteriano ( $10^4$  células/100 cm<sup>2</sup>) descrito por algunos sistemas de detección de ATP, sobre superficies de

acero inoxidable. Esto puede atribuirse al estado metabólico de las bacterias o a la eficiencia del hisopado sobre la superficie (Corbitt *et al.*, 2000).

- ***RP-convencional vs. RP-disco.***

Al comparar los resultados de RP-convencional con RP-disco (**Tabla 9**), se observó que de las superficies designadas como sucias por RP-disco, únicamente el 31% fueron consideradas sucias por RP-convencional (equivalente a  $>500$  UFC/100 cm<sup>2</sup>). Esto puede ser explicado debido a que en el hisopado normal el límite de detección mínimo se ve influenciado por numerosos factores, tales como si la superficie está húmeda o seca, el tipo de microorganismo y el método de siembra utilizado (Davidson *et al.*, 1999). Además, el hisopado normal sobre superficies secas, utilizando un diluyente en la recuperación, generalmente da resultados más escasos (Miettinen *et al.*, 2001). En nuestro caso, el valor medio por RP-convencional fue inferior en una unidad logarítmica del obtenido por el sistema de siembra directa del disco. Lo anterior, hace de la siembra directa del disco una metodología más restrictiva. Además, la ventaja que presenta cuando es adherido sobre superficies secas, es que puede detectar un mayor número de microorganismos que no son recuperados en el hisopado, a pesar de la existencia de células VBNC.

- ***RP-convencional vs. R-DEM.***

Entre los resultados de RP-convencional y R-DEM al aplicar los límites de conformidad (**Tabla 9**), solamente el 60% de superficies limpias clasificadas por RP-convencional fueron limpias por R-DEM. Mientras que las superficies clasificadas como moderadamente sucias por RP-convencional, no se encontró ninguna por R-DEM. Sin embargo, las superficies designadas como sucias por RP-convencional (equivalente a  $>500$  UFC/100 cm<sup>2</sup>) resultaron ser sólo el 20% de las consideradas como sucias por R-DEM, mostrando esta metodología como la más restrictiva.

El porcentaje elevado de insatisfactorios por R-DEM puede ser explicado por dos razones principales, debido a que: i) se ha demostrado que generalmente la técnica DEM proporciona un recuento mayor al método de cultivo convencional, aproximadamente en una unidad logarítmica (Holah *et al.*, 1988), siendo en nuestro caso el valor medio mayor en

más de dos (**Figura 8**), y ii) el recuento correspondió a la fase de células viables, siendo posible que entre ellas existieran células VBNC que no pudieron ser detectadas por el resto de las metodologías de cultivo convencional (Wirtanen y Mattila-Sandholm, 1993; Breeuwer y Abee, 2000). El nulo porcentaje de superficies obtenido, en el rango aceptable, se atribuye al límite de detección de la técnica DEM que va desde  $10^3 - 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup>. Una solución podría el uso de una platina motorizada para incrementar el número de campos y reducir el límite de detección hasta 100 UFC/cm<sup>2</sup> (Maukonen *et al.*, 2003).

#### 2.1.2.5. Criterio de comparación en función del RP-convencional

El límite microbiológico insatisfactorio aplicado anteriormente, se basó en estándares recomendados en la literatura. Sin embargo, es importante definir el intervalo de tolerancia, creado entre el límite satisfactorio e insatisfactorio, de acuerdo al conjunto de datos realmente obtenidos. El valor medio de RP-convencional más el límite superior del intervalo de confianza al 95% ( $1,76 \log_{10}$  UFC/100 cm<sup>2</sup>) origina una reducción considerable del intervalo de tolerancia, generando un 41,4% de superficies insatisfactorias; mientras, con una desviación estándar (DE,  $2,6 \log_{10}$  UFC/100 cm<sup>2</sup>) proporciona un 16,1% de superficies insatisfactorias, siendo este porcentaje muy similar al obtenido cuando se aplicó el límite insatisfactorio recomendado de  $>2,7 \log_{10}$  UFC/100 cm<sup>2</sup> (**Tabla 9**).

El margen de tolerancia creado con una DE indica que los valores, dentro de este, no son significativamente diferentes del valor medio. Por lo tanto, el valor medio RP-convencional mas una DE, proporciona un 54% de superficies satisfactorias y un 83,9% de satisfactorias más aceptables. Utilizando estos porcentajes de conformidad podemos obtener los percentiles dentro del conjunto de resultados de cada metodología (Larson *et al.*, 2003). Los percentiles obtenidos son los límites críticos estandarizados propuestos para las distintas metodologías. Estos límites permitirán mantener porcentajes de conformidad de las superficies similares al RP-convencional cuando se apliquen las otras metodologías. La **Tabla 10** muestra los límites críticos estandarizados que se tendrían que aplicar para las distintas metodologías en función de los porcentajes de conformidad del RP-convencional.

**Tabla 10.** Límites críticos estandarizados para las metodologías evaluadas en las superficies de la industria alimentaria.

Metodología	Unidades	Límites críticos		
		Satisfactorio	Aceptable	Insatisfactorio
RP-convencional	log <sub>10</sub> UFC/100cm <sup>2</sup>	1,53	1,53 – 2,6	2,6
PPF	log <sub>10</sub> UFC/100cm <sup>2</sup>	1,49	1,49 – 2,57	2,57
ATP	log <sub>10</sub> URL/100cm <sup>2</sup>	2,18	2,18 – 2,79	2,79
RP-disco	log <sub>10</sub> UFC/100cm <sup>2</sup>	2,47	2,47 – 3,70	3,70
R-DEM	log <sub>10</sub> UFC/100cm <sup>2</sup>	5,36	5,36 – 6,17	6,17

#### 2.1.2.6. Evaluación de la higiene de las superficies de trabajo

Es primordial realizar un análisis detallado de todas las formas posibles que conducen a una contaminación bacteriana de las superficies y que a su vez pudieran afectar la seguridad higiénica del producto en proceso y posteriormente al producto terminado. A continuación se presenta una evaluación de factores que influyeron en el nivel de contaminación bacteriana sobre las superficies de trabajo.

##### - *Nivel de contaminación en función del tipo de material*

El material constituyente de la mayoría de las superficies evaluadas fue acero inoxidable (tipo 304 2B). Aplicando los límites críticos propuestos en este estudio, obtuvimos un elevado porcentaje de superficies como satisfactorias y aceptables, aún así, es importante destacar el porque de las superficies más contaminadas. Este tipo de acero inoxidable ha sido clasificado con alto estado higiénico, el cual se ha demostrado que está relacionado al tipo y acabado del mismo (Jullien *et al.*, 2002). Sin embargo, existen estudios contradictorios con respecto a la correlación entre la adhesión de bacteriana y el aumento de la rugosidad en el acero inoxidable.

Flint *et al.* (2000) realizaron estudios de adhesión con estreptococos termorresistentes sobre superficies de acero inoxidable con imperfecciones y con uniones por soldadura. Estos investigadores no lograron relacionar la adhesión con el incremento de rugosidad en ambas superficies. No obstante Jullien *et al.* (2002), han demostrado a través de observaciones microscópicas que el tamaño y la forma de las irregularidades de las superficies influyen

sobre el nivel de suciedad después de la limpieza. Por otra parte, la capa de óxido de cromo natural que se forma sobre el acero inoxidable puede incrementar la adhesión bacteriana, debido a la materia orgánica que se adhiere produciendo un substrato condicionante (Flint *et al.*, 2000; Chmielewski y Frank, 2003). Asimismo, el diseño de los equipos es importante, ya que dependiendo de su geometría y ubicación, poseen ciertos sitios con difícil acceso y reducida visibilidad al momento de ser limpiados (Maukonen *et al.*, 2003). Lo anterior mencionado, puede explicar aquellas superficies de acero inoxidable con mayores niveles de contaminación.

En el caso de las dos superficies de hormigón (bases del equipo de secado), la exposición al calor y humedad durante el procesado del producto y su rugosidad favorecen la presencia de residuos alimentarios y en consecuencia la proliferación de microorganismos. La elevada contaminación obtenida con todas las metodologías para este tipo de superficie de trabajo, podría representar un peligro de recontaminación, debido a la supervivencia de los microorganismos después de la higienización (Kusumaningrum *et al.*, 2003).

- ***Nivel de contaminación en función de la zona de trabajo***

Entre las zonas de trabajo (A, B y C), no se observaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) para la mayoría de las metodologías, a excepción del R-DEM para la zona C, donde el valor medio fue menor al límite de detección de la técnica DEM,  $3 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> (Holah *et al.*, 1988). La zona C es una zona de producto listo para su envasado, por lo tanto, es una zona aislada y con medidas higiénicas más estrictas, lo que podría explicar también este resultado.

- ***Nivel de contaminación en función del proceso de secado***

En la **Tabla 11** se puede observar que sólo la detección de ATP mostró diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las superficies clasificadas, siendo el nivel mayor en aquellas después del secado. Existen tratamientos realizados a lo largo del proceso que tienden a repercutir en la reducción global de la contaminación y por consiguiente tienen efectos positivos sobre la calidad microbiológica del producto final (Temelli *et al.*, 2006). En nuestro caso, la etapa del secado (140 – 150 °C) sería uno de ellos, debido a la temperatura alcanzada por el producto. Sin embargo, únicamente la detección de ATP mostró diferencias

significativas después del secado. Esto debido a la presencia de materia orgánica residual, ya que el producto una vez seco y en polvo tiende a diseminarse y acumularse sobre las superficies con mayor facilidad, dificultando la limpieza y desinfección de estas áreas.

**Tabla 11.** Nivel de contaminación en las superficies de la industria alimentaria en función del proceso de secado por las metodologías utilizadas para el recuento de mesófilos aerobios ( $\log_{10}$  UFC/100cm<sup>2</sup>) y la detección de ATP por bioluminiscencia ( $\log_{10}$  URL/100cm<sup>2</sup>).

Metodología	Fase del proceso (media $\log_{10}$ UFC/100cm <sup>2</sup> ± ee)		
	Antes-Secado	Durante-Secado	Después-Secado
R-DEM	4,40 <sup>a</sup> ±0,68	4,07 <sup>a</sup> ±0,53	3,78 <sup>a</sup> ±0,42
RP-disco	2,64 <sup>a</sup> ±0,30	2,29 <sup>a</sup> ±0,31	2,31 <sup>a</sup> ±0,21
ATP	1,94 <sup>b</sup> ±0,10	2,05 <sup>ab</sup> ±0,12	2,32 <sup>a</sup> ±0,08
RP-convencional	1,50 <sup>a</sup> ±0,24	1,81 <sup>a</sup> ±0,21	1,35 <sup>a</sup> ±0,17
PPF	1,11 <sup>a</sup> ±0,18	1,49 <sup>a</sup> ±0,21	1,52 <sup>a</sup> ±0,14

<sup>a,b,c</sup> En una misma fila las medias con letras minúsculas distintas son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).  
ee= error estándar.

- ***Nivel de contaminación en función del ensayo***

La **Tabla 12** muestra el nivel de contaminación de las superficies en función del ensayo para cada una de las distintas metodologías. Entre ensayos, las metodologías R-DEM, RP-convencional y ATP demostraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

El RP-convencional fue mayor en el segundo ensayo. Sin embargo, para el mismo ensayo, el R-DEM fue menor y el valor de ATP se observó entre ambas metodologías. La combinación de estos resultados sugiere que el segundo ensayo presentó, tanto menor contaminación bacteriana como materia orgánica residual, pues la diferencia entre RP-convencional y ATP fue mínima. Además, la diferencia entre RP-convencional y R-DEM indica que existió una pequeña proporción de células VBNC (Wirtanen y Mattila-Sandholm, 1993; Breeuwer y Abee, 2000).

**Tabla 12.** Nivel de contaminación en las superficies de la industria alimentaria en función del ensayo por las metodologías utilizadas para el recuento de mesófilos aerobios ( $\log_{10}$  UFC/100cm<sup>2</sup>) y la detección de ATP por bioluminiscencia ( $\log_{10}$  URL/100cm<sup>2</sup>).

Metodología	Ensayo (media $\log_{10}$ UFC/100cm <sup>2</sup> $\pm$ ee)		
	Primera	Segunda	Tercera
R-DEM	5,19 <sup>a</sup> $\pm$ 0,37	2,61 <sup>b</sup> $\pm$ 0,55	4,12 <sup>a</sup> $\pm$ 0,56
RP-disco	2,52 <sup>a</sup> $\pm$ 0,24	2,50 <sup>a</sup> $\pm$ 0,31	2,11 <sup>a</sup> $\pm$ 0,23
ATP	1,83 <sup>b</sup> $\pm$ 0,11	2,30 <sup>a</sup> $\pm$ 0,06	2,35 <sup>a</sup> $\pm$ 0,11
RP-convencional	1,48 <sup>b</sup> $\pm$ 0,21	2,12 <sup>a</sup> $\pm$ 0,21	0,98 <sup>b</sup> $\pm$ 0,12
PPF	1,60 <sup>a</sup> $\pm$ 0,18	1,51 <sup>a</sup> $\pm$ 0,20	1,17 <sup>a</sup> $\pm$ 0,13

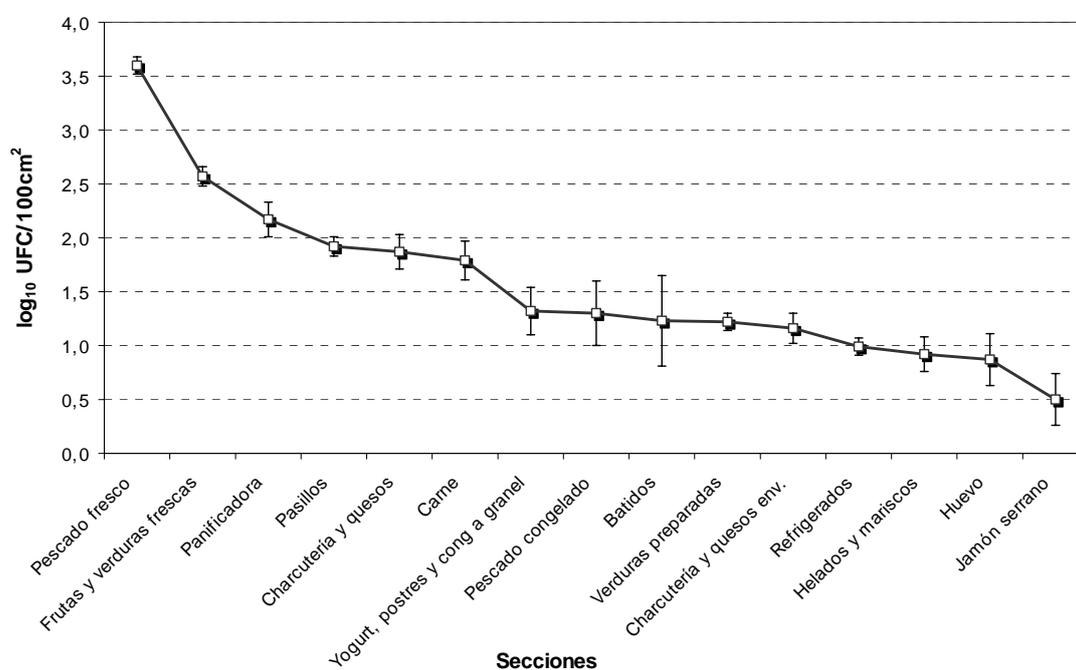
<sup>a,b,c</sup> En una misma fila las medias con letras minúsculas distintas son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).  
ee= error estándar.

Las diferencias observadas por ensayo para ATP pueden atribuirse a una mayor o menor presencia de materia orgánica residual en las superficies; La bioluminiscencia detecta el ATP de células y residuos alimentarios, los cuales persisten después de una inadecuada limpieza y proporcionan una fuente de nutrientes para el crecimiento microbiano. Sin embargo, el nivel de ATP en las células varía dependiendo del medio ambiente que le rodea y la fase de crecimiento de los microorganismos. Aunque otros autores señalan que la reserva de ATP se mantiene normalmente constante por los mecanismos de regulación propios de las células (Corbitt *et al.*, 2000). Las diferencias reflejadas entre ensayos fueron mínimas, lo que indica que el programa de limpieza y desinfección aplicado semanalmente en la industria alimentaria se está llevando a cabo de una forma regular y aceptable.

## 2.2. Supermercado

### 2.2.1. Estudio preliminar con placa de contacto Petrifilm para el recuento de mesófilos aerobios

La contaminación promedio de los tres ensayos realizados durante el estudio preliminar para el recuento de mesófilos aerobios con placas de contacto Petrifilm fue de  $1,73 \pm 0,05$   $\log_{10}$  UFC/100  $\text{cm}^2$  ( $n=600$ ). Los resultados del estudio preliminar mostraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las secciones, siendo las secciones de pescado fresco y frutas y verduras frescas las más contaminadas (**Figura 9**).

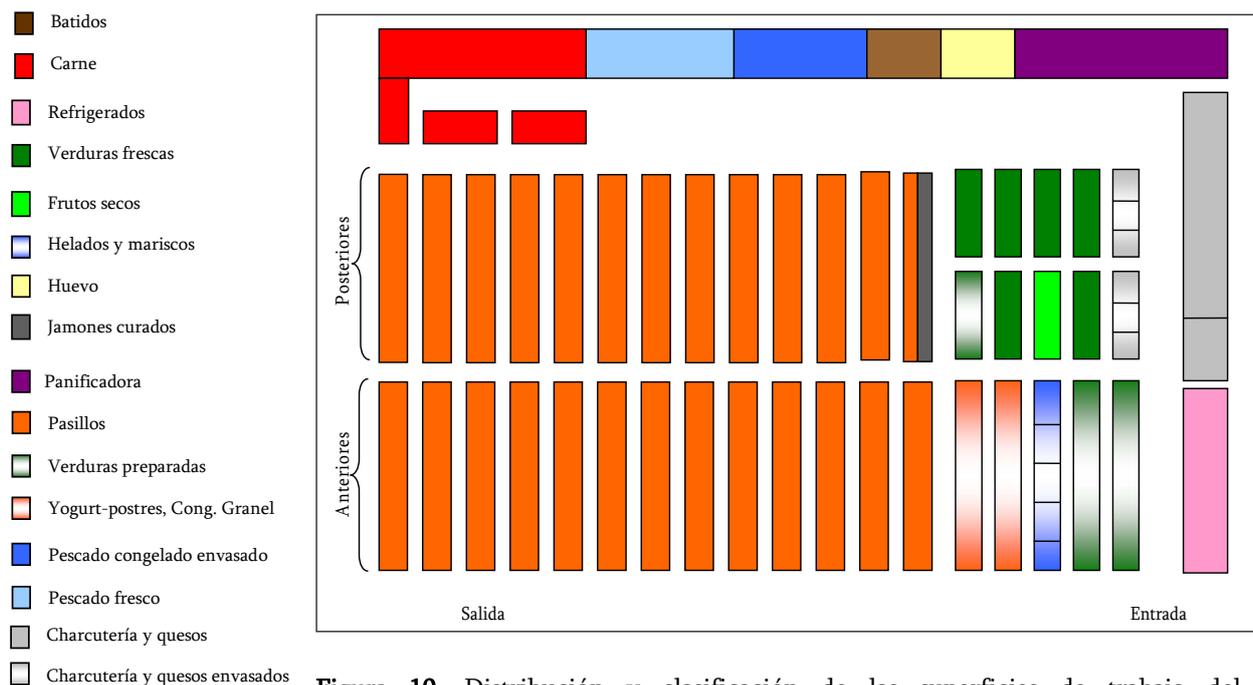


**Figura 9.** Recuento de mesófilos aerobios ( $\log_{10}$  UFC/100 $\text{cm}^2$ ) en las superficies del supermercado utilizando placas de contacto Petrifilm en el estudio preliminar. Valor medio por sección  $\pm$  error estándar,  $n=6 - 144$ .

Las secciones carne, pasillos, charcutería y quesos, se observaron dentro de un mismo recuento bacteriano, en un rango de 1,72 a 1,92  $\log_{10}$  UFC/100  $\text{cm}^2$  (**Figura 9**). Sin embargo, la sección “panificadora” que presentó un recuento bacteriano de 2,17  $\log_{10}$  UFC/100  $\text{cm}^2$  fue descartada para el estudio comparativo de las distintas metodologías, debido a que la mayoría de las placas Petrifilm se observaban invadidas por hongos, lo que dificultaba su lectura.

La sección de pasillos, conformada por 12 en total y cada uno con dos estanterías góndolas, fue analizada para determinar aquellos de mayor contaminación (**Figura 10**).

Una vez determinados, se clasificaron de acuerdo a la ubicación con respecto a las cajas de cobro (salida), como: anteriores (frontal y central) y posteriores (central y fondo). Los recuentos demostraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los pasillos anteriores y posteriores.



**Figura 10.** Distribución y clasificación de las superficies de trabajo del supermercado por secciones (de acuerdo al producto manipulado).

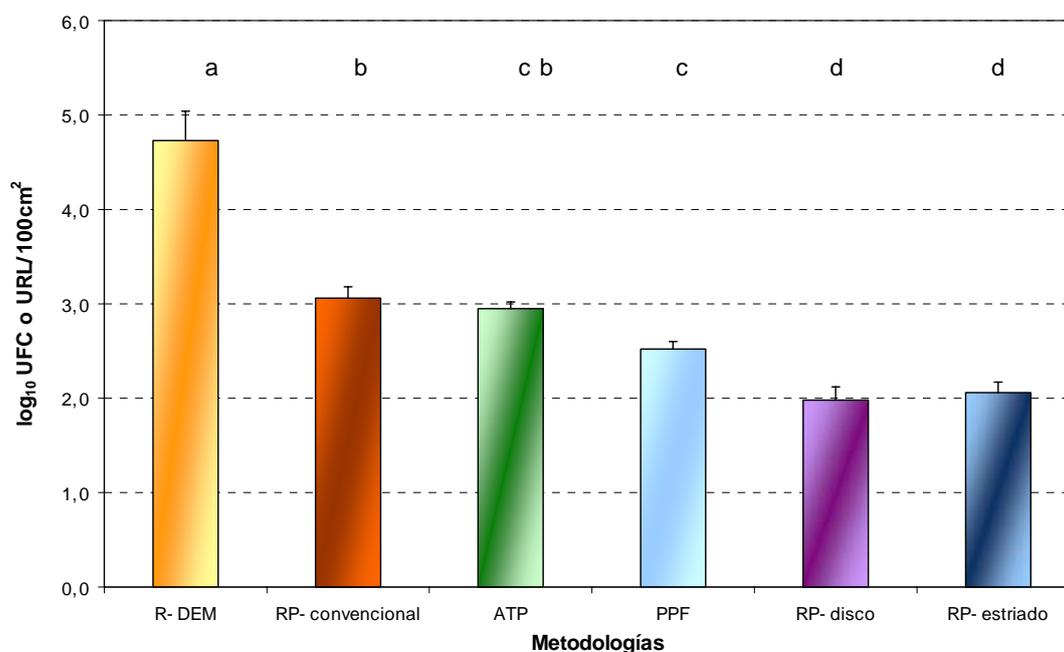
La contaminación fue mayor en los pasillos anteriores, tanto en la parte frontal como en la central, con recuentos bacterianos de  $2,42 \pm 0,17$  y  $2,54 \pm 0,15 \log_{10}$  UFC/100 cm<sup>2</sup>, respectivamente. Conforme se avanzó al pasillo posterior (fondo) se observó una disminución significativa ( $P < 0,05$ ) de la contaminación ( $1,24 \pm 0,15 \log_{10}$  UFC/100 cm<sup>2</sup>). Estos resultados podrían atribuirse debido a que la zona cercana a la salida y entrada, existe un mayor flujo de gente, así como el intercambio de aire con el exterior, aunque los microorganismos no se multiplican en el aire, este es un método efectivo de distribución de bacterias a las superficies (Evans *et al.*, 2004). Por lo anterior, para la comparación de metodologías, se tomaron los pasillos anteriores, correspondientes a los pasillos con

productos varios, como: güisqui y licores, especias y aceite, cereales y cacao, galletas y surtido de galletas, shampoo y cosméticos.

## 2.2.2. Estudio comparativo con distintas metodologías

### 2.2.2.1. Nivel de contaminación en función de las metodologías

La media global obtenida para el RP-convencional muestra diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) con el resto de las metodologías utilizadas, principalmente con el R-DEM. La detección de ATP por bioluminiscencia fue la más próxima al RP-convencional, seguida por el PPF. En cambio, el RP-disco y el RP-estriado reflejaron un nivel de contaminación significativamente inferior ( $P < 0,05$ ) en relación al resto de las metodologías (**Figura 11**).



**Figura 11.** Nivel de contaminación global en las superficies del supermercado en función de la metodología utilizada para el recuento de mesófilos aerobios ( $\log_{10}$  UFC/100cm<sup>2</sup>) y la detección de ATP por bioluminiscencia ( $\log_{10}$  URL/100cm<sup>2</sup>). La altura de la columna representa la media  $\pm$  error estándar, n=180.

### 2.2.2.2. Correlación de los metodologías de control higiénico de superficies

Al investigar la existencia de correlación del RP-convencional *versus* las diferentes metodologías, se observaron unos coeficientes de correlación ( $r$ ) moderados (0,23, 0,26, 0,27) para ATP, RP-disco y PPF, respectivamente. Únicamente, el RP-estriado mostró una correlación lineal significativa ( $r = 0,7085$ ,  $P < 0,0001$ ). Posteriormente, se evaluaron

posibles correlaciones entre las distintas metodologías y no se observaron correlaciones significativas entre sí ( $P > 0,05$ ). Aunque el RP-estriado se correlacionó significativamente con el RP-convencional, su límite de detección fue significativamente menor ( $P < 0,05$ ). Davidson *et al.* (1999) observaron que un estriado directo con el hisopo sobre la superficie del agar proporcionó límites de detección mínimos de  $10^2$  UFC/100cm<sup>2</sup> para *S. aureus* y *E. coli*, cuando el muestreo se realizó en superficies húmedas, mientras que los límites de detección se incrementaron a  $10^5$  y  $10^7$ , respectivamente en superficies secas. Estos autores, obtuvieron mejor tasa de recuperación a partir de superficies secas para *S. aureus* a partir del diluyente que con el estriado directo, mientras que para *E. coli* la recuperación en diluyente fue negativa. Por lo tanto, nuestros resultados pueden atribuirse a la sequedad de la mayoría de las superficies del supermercado y a la habilidad de los microorganismos para tolerar condiciones de sequedad (Davidson *et al.*, 1999).

### 2.2.2.3. Establecimiento de límites críticos

#### - *En función de límites recomendados*

La contaminación de las superficies en contacto con los alimentos, en base al RMA, ha sido valorada como satisfactoria, de acuerdo a los estándares recomendados, con un valor  $<50$  UFC/cm<sup>2</sup>, equivalente a  $<3,7 \log_{10}$  UFC/100cm<sup>2</sup> (Nortje *et al.* 1990 citado por Legnani *et al.*, 2004), mientras que otros autores proponen un valor  $<100$  UFC/cm<sup>2</sup>, equivalente a  $<4 \log_{10}$  UFC/100cm<sup>2</sup> (Seeger y Griffiths, 1994). Considerando estos estándares como referencias, el primero genera un 70% y el segundo un 80% de superficies satisfactorias en nuestro estudio.

#### - *En función de valor medio de RP-convencional*

En este estudio el valor medio de RMA obtenido por RP-convencional fue  $3,06 \log_{10}$  UFC/100 cm<sup>2</sup>. Cuando se toma este valor como límite satisfactorio, el porcentaje de superficies limpias disminuye a un 51,1%. En la **Tabla 13** se muestra la conformidad de las superficies para todas las metodologías en función del valor medio de RP-convencional  $<3,06 \log_{10}$  UFC/100 cm<sup>2</sup> como límite satisfactorio y como límite insatisfactorio moderado, utilizamos el valor de los estándares recomendados de  $>3,7 \log_{10}$  UFC/100cm<sup>2</sup> equivalente  $>50$  UFC/cm<sup>2</sup> (Nortje *et al.* 1990 citado por Legnani *et al.*, 2004).

**Tabla 13.** Conformidad de las superficies del supermercado para las distintas metodologías en función del valor medio de RP-convencional como límite satisfactorio.

Metodología	Conformidad de superficies (%)		
	Satisfactorio ( $<3,1 \log_{10} \text{UFC}/100\text{cm}^2$ )	Aceptable <sup>†</sup> ( $3,1 - 3,7 \log_{10} \text{UFC}/100\text{cm}^2$ )	Insatisfactorio ( $>3,7 \log_{10} \text{UFC}/100\text{cm}^2$ )
RP-convencional	51,1	18,9	30,0
PPF	65,6	32,2	2,2
RP-estriado	77,8	22,2	0,0
ATP	58,9	31,1	10,0
RP-disco	83,0	10,0	7,0
R-DEM	28,9	0,0	71,1

<sup>†</sup> Límite de tolerancia obtenido de los estándares recomendados,  $<50 \text{UFC}/\text{cm}^2$  (Nortje *et al.* 1990 citado por Legnani *et al.*, 2004).

#### 2.2.2.4. Comparación de metodologías en función de la conformidad de las superficies

##### - *RP-convencional vs. RP-estriado*

A pesar de la correlación existente entre el RP-estriado y RP-convencional, el nivel de contaminación detectado por RP-estriado fue menor que por RP-convencional, siendo de 2,06 y 3,06  $\log_{10} \text{UFC}/100 \text{cm}^2$ , respectivamente (**Figura 11**).

En la **Tabla 13** se observó que el 100% de las superficies fueron designadas como satisfactorias y aceptables por RP-estriado, mientras que sólo el 70% lo fueron por RP-convencional (equivalente a  $<5000 \text{UFC}/100 \text{cm}^2$ ). Las diferencias observadas pueden deberse al principal problema que presenta el hisopado, que son la variaciones individuales o bien que al momento del estriado los microorganismos sean retenidos en el capuchón del hisopo sin ser transferidos al medio sólido. La precisión y enumeración de la carga microbiana usando la técnica del hisopado confía inicialmente en la habilidad del hisopo para remover los microorganismos desde la superficie, seguido de su efecto de liberarlos desde el capuchón del hisopo y su subsecuente recuperación (Moore y Griffith, 2002a). En este caso, la composición del diluyente pudo jugar un papel importantísimo en la recuperación, liberación y disgregación de las bacterias que están retenidas en el hisopo, lo

que proporcionó un mayor recuento por RP-convencional (Moore y Griffith, 2002a; Moore y Griffith, 2002b).

- ***RP-convencional vs. PPF***

En el caso del supermercado, a diferencia de la industria alimentaria, se observó una menor eficiencia de las placas de contacto con respecto al RP-convencional. En la **Tabla 13** se puede observar que solamente el 2,2% de las superficies fueron insatisfactorias por PPF, mientras que el RP-convencional detectó un 30%. Una de las desventajas principales que presenta la placa de contacto, es que deben ser usadas preferiblemente en superficies planas (Moore y Griffith, 2002a). Otra desventaja importante, es que no pueden romper o disgregar la estructura de un biofilm de la superficie, lo que origina recuentos menores (Pontrefract, 1991; Boer y Beumer, 1999). La posible formación de biofilms sobre las superficies y los diferentes tipos de materiales de las superficies, podrían explicar los resultados de la menor detección obtenidos por PPF.

- ***RP-convencional vs. ATP***

El porcentaje de superficies clasificadas como limpias por RP-convencional fue aproximadamente igual por ATP (**Tabla 13**). Sin embargo, en las superficies de contaminación moderada por ATP (equivalente a 1150 – 5000 URL/100 cm<sup>2</sup>), se encontró contaminación microbiana en sólo un 61% de los hisopados. Teóricamente, la cantidad más baja de ATP detectable (100 fg) es equivalente a 100 células bacterianas. Sin embargo, bajo condiciones prácticas la sensibilidad es alrededor de 1000 fg, que pueden ser 1000 células bacterianas o 2 células de levaduras (Murphy *et al.*, 1998). Además, sólo el 33% de los hisopados de aquellas superficies designadas como sucias por RP-convencional (equivalente a >5000 UFC/100 cm<sup>2</sup>) se constataron sucias por ATP. Lo anterior se puede atribuir a que el nivel de ATP microbiano es más bajo en las células estresadas y en la fase de crecimiento estacionaria (Murphy *et al.*, 1998). Además se ha observado que la generación de ATP, tanto intracelular como extracelular, durante la adhesión a superficies es influenciada por el tipo de superficie, ocurriendo primero un mayor incremento, de ambos tipos de ATP, en las superficies hidrofóbicas (Ivanova *et al.* 2006). En las superficies del supermercado, el ATP

presente pudo provenir de varias fuentes, como: células somáticas, una diversidad de residuos alimentarios y de microorganismos.

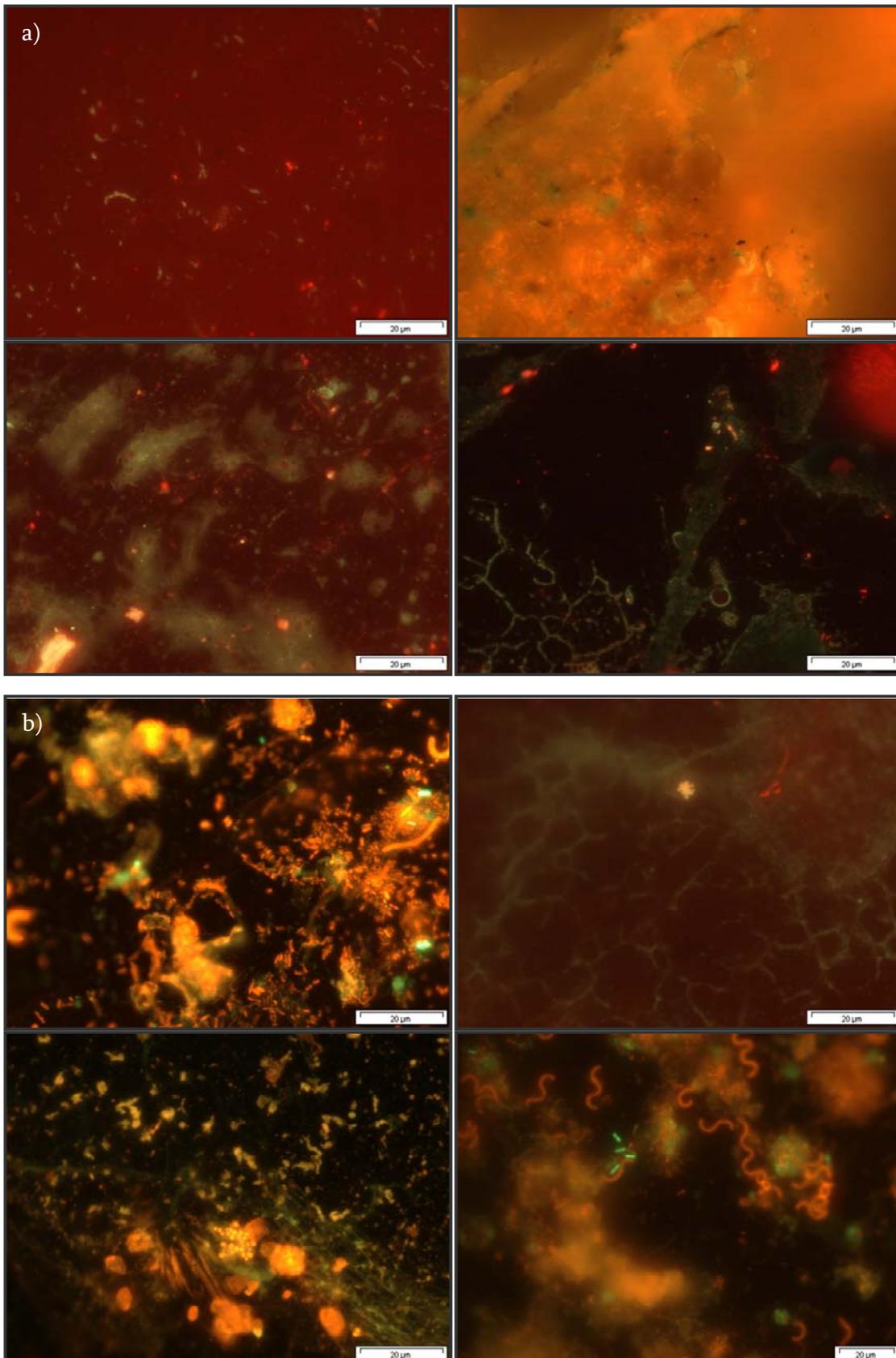
- ***RP-convencional vs. RP-disco***

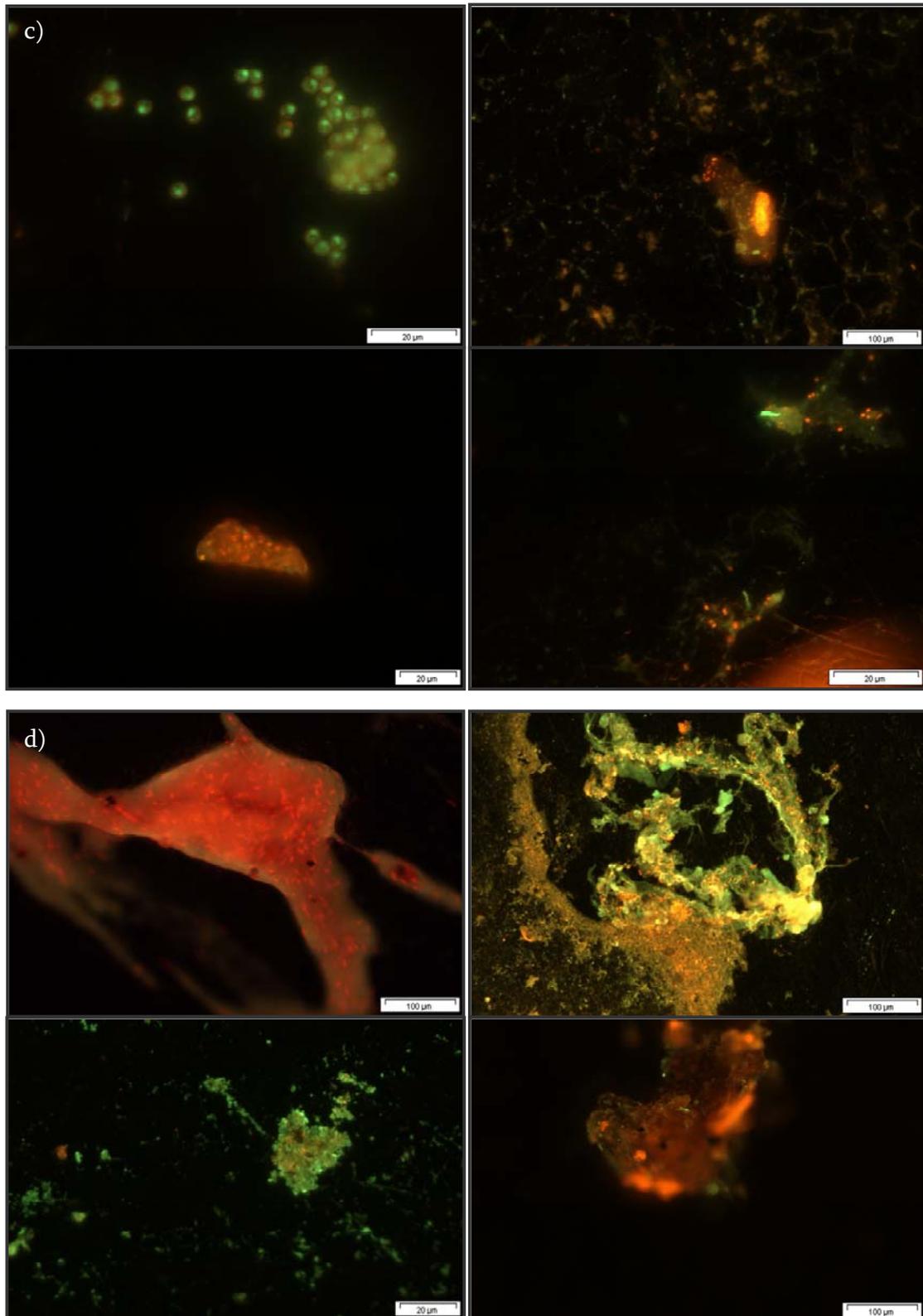
Al comparar los resultados de RP-convencional con RP-disco (**Tabla 13**), se observó un comportamiento similar al RP-estriado y PPF, lo que hizo suponer la formación de biofilms en las superficies del supermercado, lo que fue confirmado por microscopía (**Figura 12**). Un biofilm bacteriano desarrolla microcolonias o agregados y usando el cultivo convencional, tales agregados producirán sólo una colonia sobre la placa de agar (Bredholt *et al.*, 1999). Por lo tanto, al realizar la siembra directa del disco, se podrían infraestimar los recuentos bacterianos. Una alternativa en este caso, sería la agitación mecánica del disco en un medio previo a la siembra. Aunque, se menciona que al utilizar un diluyente en la recuperación, los resultados pueden ser escasos (Miettinen *et al.*, 2001), en este caso podría ser favorable para la recuperación de células lesionadas no recuperadas en el medio sólido.

- ***RP-convencional vs. R-DEM***

En la **Tabla 13** se observa que únicamente el 57% de superficies limpias clasificadas por RP-convencional fueron limpias por R-DEM. Mientras que en el rango de aceptables no obtuvimos ningún porcentaje por R-DEM. Sin embargo, las superficies designadas como sucias por RP-convencional resultaron ser únicamente el 42% de las consideradas como sucias por R-DEM. Anteriormente mencionamos que la técnica DEM proporciona un recuento mayor al método de cultivo convencional (Holah *et al.*, 1988), siendo en nuestro caso el valor medio mayor en casi dos unidades logarítmicas (**Figura 11**). Además, que la tinción vital aplicada para R-DEM, pone de manifiesto células viables, entre las cuales existe la posibilidad de VBNC, que no suelen ser detectadas por el cultivo convencional (Wirtanen y Mattila-Sandholm, 1993; Breeuwer y Abee, 2000). Por otra parte, los recuentos bajos obtenidos por cultivo convencional pueden ser debidos también al hecho de que el hisopado no fue lo suficientemente eficiente para desprender y recuperar las células de la superficie (Bredholt *et al.*, 1999). Con DEM se ha demostrado que a pesar de un hisopado vigoroso, solamente una pequeña porción de biofilm y de las células de este son desprendidas (Wirtanen *et al.*, 2001b). El límite de detección de la técnica DEM ( $10^3 - 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup>)

nuevamente no permitió obtener un porcentaje de conformidad en el rango aceptable (Maukonen *et al.*, 2003).





**Figura 12.** Biofilms desarrollados naturalmente sobre los discos de acero inoxidable adheridos a las superficies del supermercado. (a) Charcutería y quesos, (b) pescado fresco, (c) carne y (d) carne-pescado. Análisis mediante microscopía de epifluorescencia directa (DEM).

### 2.2.2.5. Criterio de comparación en función del RP-convencional

La conformidad de las superficies en función del valor medio para RP-convencional más el límite superior del intervalo de confianza al 95% ( $3,29 \log_{10}$  UFC/100 cm<sup>2</sup>), proporciona una reducción considerable del intervalo de tolerancia, dando como resultado un 38,9% de superficies insatisfactorias; mientras, una DE ( $4,17 \log_{10}$  UFC/100 cm<sup>2</sup>) proporciona un 14,4% de superficies insatisfactorias. El valor medio más una DE proporciona un porcentaje similar al obtenido al aplicar el estándar sugerido (100 UFC/cm<sup>2</sup>) por Seeger y Griffiths (1994).

En este estudio optamos por definir el intervalo de tolerancia aplicando el límite superior del intervalo de confianza al 95% al valor medio del RP-convencional, debido a que el programa de higienización en el supermercado podría ser mejorado. Los porcentajes de conformidad correspondientes a satisfactorios y a satisfactorios mas aceptables, fueron de 51,1% y 61,1%, respectivamente, los cuales se utilizaron para determinar los percentiles dentro del conjunto de resultados de cada metodología (Larson *et al.*, 2003). La **Tabla 14** muestra los límites críticos estandarizados que se tendrían que aplicar para las distintas metodologías en función de los porcentajes de conformidad del RP-convencional.

**Tabla 14.** Límites críticos estandarizados para las metodologías evaluadas en las superficies del supermercado.

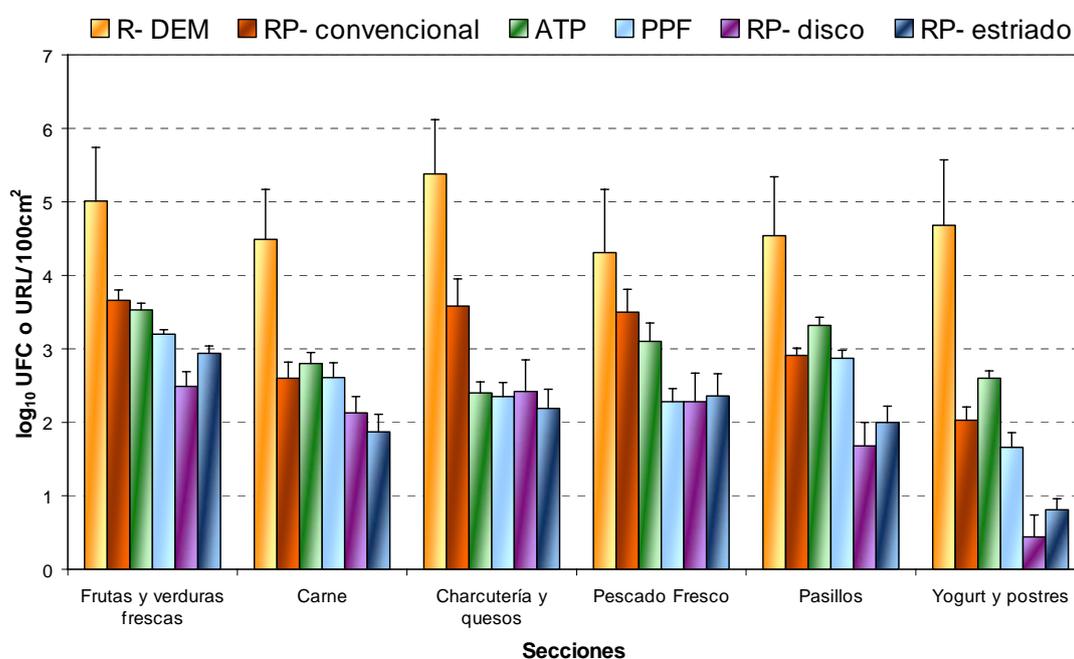
Metodología	Unidades	Límites críticos		
		Satisfactorio	Aceptable	Insatisfactorio
RP-convencional	$\log_{10}$ UFC/100cm <sup>2</sup>	3,06	3,06 – 3,29	3,29
RP-estriado	$\log_{10}$ UFC/100cm <sup>2</sup>	2,10	2,10 – 2,48	2,48
PPF	$\log_{10}$ UFC/100cm <sup>2</sup>	2,73	2,73 – 2,93	2,93
ATP	$\log_{10}$ URL/100cm <sup>2</sup>	2,96	2,96 – 3,14	3,14
RP-disco	$\log_{10}$ UFC/100cm <sup>2</sup>	2,28	2,28 – 2,50	2,50
R-DEM	$\log_{10}$ UFC/100cm <sup>2</sup>	5,82	5,82 – 6,17	6,17

### 2.2.2.6. Evaluación de la higiene de las superficies de trabajo

#### - Nivel de contaminación en función de las secciones

En la **Figura 13** se muestran los resultados del nivel de contaminación en función de las secciones del supermercado. Entre secciones, se demostró que la sección fue un factor que

influyó significativamente ( $P < 0,05$ ) sobre el nivel de contaminación obtenido por cada metodología aplicada, con excepción del R-DEM. Así que las secciones más contaminadas por la mayoría de las metodologías, en orden decreciente, fueron: frutas y verduras frescas, charcutería y quesos, pescado fresco, y pasillos. Se han descrito valores de RMA que oscilan entre 6,3 – 8,7  $\log_{10}$  UFC/g para diferentes verduras (lechugas, apio, coliflor y brócoli), lo que podría suponer una contaminación mayor de las superficies que entran en contacto con dichos productos frescos (Thumbberg *et al.*, 2002). Esto podría explicar el caso de frutas y verduras frescas que fue la sección más contaminada, pero a pesar de ello, no se alcanzaron niveles excesivos.



**Figura 13.** Nivel de contaminación de las superficies en el supermercado en función de la sección de trabajo por las metodologías utilizadas para el recuento de mesófilos aerobios ( $\log_{10}$  UFC/100cm<sup>2</sup>) y la detección de ATP por bioluminiscencia ( $\log_{10}$  URL/100cm<sup>2</sup>). La altura de la columna representa la media  $\pm$  error estándar, n=24 - 42.

Aunque, el programa de higienización describe el uso de hipoclorito como desinfectante aplicado con bayeta, este no es aplicado a diario, ni en todas las secciones. El hipoclorito estabilizado (pH alcalino) es utilizado cuando se requiere una desinfección de larga duración, como sería el caso de las superficies del supermercado (Wirtanen *et al.*, 2001b). Sin embargo, cuando hay una disminución de pH o un aumento de la carga orgánica su

acción se ve disminuida, como sería en el caso de la sección de pescado fresco donde se observaron valores de 3,50 y 3,10  $\log_{10}$  UFC o URL/100  $\text{cm}^2$ , para el RP-convencional y ATP, respectivamente. En el caso de charcutería y quesos, los valores fueron de 3,58 y 2,40  $\log_{10}$  UFC o URL/100  $\text{cm}^2$  para RP-convencional y ATP, respectivamente. A pesar de la temperatura de refrigeración en esta sección, el recuento microbiano elevado, puede deberse a la microbiota propia del alimento, a la manipulación constante de los productos sobre las mesas de trabajo y a la escasa desinfección durante el día. Con respecto a las diferencias entre los resultados de ATP, en pescado fresco y charcutería y quesos (3,10 y 2,40  $\log_{10}$  URL/100  $\text{cm}^2$ , respectivamente), son debidas probablemente a la variación en los niveles de ATP intrínseco del alimento. Corbitt *et al.* (2000), al analizar una serie de residuos alimentarios, detectaron mayores niveles de ATP en el pescado, la carne y los productos lácteos que en el brócoli, las patatas y la mayonesa. Además, estos investigadores consiguieron mayores niveles ATP de residuos procedentes de superficies húmedas con respecto a secas. Además, sugirieron que el nivel bajo de ATP en la mayonesa quizá sea resultado de la inhibición por la materia grasa durante la extracción del ATP. Asimismo, la cantidad elevada de grasa en los productos de charcutería y quesos podría explicar el nivel bajo de ATP con respecto a la sección de pescado.

- ***Nivel de contaminación en función de la temperatura de conservación del producto.***

La **Tabla 15** muestra que los resultados del nivel de contaminación en función de la temperatura de conservación del producto. Entre temperaturas de conservación, se observó que esta influyó significativamente ( $P < 0,05$ ) en el nivel de contaminación obtenido por ciertas metodologías, como es el caso del ATP, PPF y RP-estriado. Aunque nuestros resultados muestran una contaminación más elevada a temperatura ambiente por ciertas metodologías (ATP, PPF y RP-estriado), la microbiota residente en el supermercado se sugiere psicotrofa. Los cambios en las condiciones ambientales, que se alejan de los valores óptimos, generan una respuesta de estrés. Por lo tanto, las estrategias están dirigidas más a la supervivencia que al crecimiento bacteriano (Beales, 2004).

**Tabla 15.** Nivel de contaminación de las superficies en el supermercado en función de la temperatura de conservación del producto por las metodologías utilizadas para el recuento de mesófilos aerobios ( $\log_{10}$  UFC/100cm<sup>2</sup>) y la detección de ATP por bioluminiscencia ( $\log_{10}$  URL/100cm<sup>2</sup>).

Metodología	Temperatura de conservación (media $\log_{10}$ UFC/100cm <sup>2</sup> $\pm$ ee)	
	Ambiente	Refrigeración
R-DEM	4,80 <sup>a</sup> $\pm$ 0,53	4,70 <sup>a</sup> $\pm$ 0,39
RP-disco	2,13 <sup>a</sup> $\pm$ 0,20	1,91 <sup>a</sup> $\pm$ 0,19
ATP	3,44 <sup>a</sup> $\pm$ 0,07	2,74 <sup>b</sup> $\pm$ 0,09
RP-convencional	3,33 <sup>a</sup> $\pm$ 0,11	2,94 <sup>a</sup> $\pm$ 0,16
PPF	3,05 <sup>a</sup> $\pm$ 0,06	2,29 <sup>b</sup> $\pm$ 0,11
RP-estriado	2,52 <sup>a</sup> $\pm$ 0,14	1,86 <sup>b</sup> $\pm$ 0,14

<sup>a,b,c</sup> En una misma fila las medias con letras minúsculas distintas son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).  
ee= error estándar.

Las bajas temperaturas pueden afectar las actividades metabólicas y las reacciones enzimáticas de los microorganismos, provocando un retardo en el proceso de crecimiento, lesión o muerte de células aeróbicas; además, también pueden ser responsables de una modificación del estado coloidal del protoplasma celular (Chang *et al.*, 2003). Asimismo, la adhesión bacteriana, con el subsiguiente desarrollo de biofilms, es dependiente de parámetros microbiológicos, físicos, químicos y relacionados al tipo de material (Hilbert *et al.*, 2003; Stepanovic *et al.*, 2003).

#### - ***Nivel de contaminación en función del tipo de material***

La **Tabla 16** muestra los resultados del nivel de contaminación en función del tipo de material de la superficie. Entre los tipos de material, se logró apreciar que el nivel de contaminación fue significativamente ( $P < 0,05$ ) mayor en la madera (con pintura) para la mayoría de las metodologías, a excepción de R-DEM. Se sugiere que las irregularidades de las superficies protegen a las células adheridas del estrés y consecuentemente disminuyen la eficiencia del procedimiento de limpieza (Bower *et al.*, 1996), como sería en el caso de la madera, que aún recubierta con pintura, poseía muchas irregularidades con respecto al resto de las superficies muestreadas.

**Tabla 16.** Nivel de contaminación de las superficies en el supermercado en función del tipo de material por las metodologías utilizadas para el recuento de mesófilos aerobios ( $\log_{10}$  UFC/100cm<sup>2</sup>) y la detección de ATP por bioluminiscencia ( $\log_{10}$  URL/100cm<sup>2</sup>).

Metodología	Material de superficie de trabajo (media $\log_{10}$ UFC/100cm <sup>2</sup> ± ee)			
	Acero Inoxidable	PVC	Madera (pintura)	Chapa de acero (pintura epoxi)
R-DEM	4,84 <sup>a</sup> ±0,56	4,49 <sup>a</sup> ±0,68	5,01 <sup>a</sup> ±0,73	4,60 <sup>a</sup> ±0,58
RP-disco	2,35 <sup>a</sup> ±0,28	2,13 <sup>a</sup> ±0,22	2,49 <sup>a</sup> ±0,20	1,06 <sup>b</sup> ±0,25
ATP	2,75 <sup>b</sup> ±0,16	2,80 <sup>b</sup> ±0,15	3,53 <sup>a</sup> ±0,09	2,96 <sup>b</sup> ±0,10
RP-convencional	3,54 <sup>a</sup> ±0,24	2,60 <sup>b</sup> ±0,22	3,66 <sup>a</sup> ±0,14	2,47 <sup>b</sup> ±0,14
PPF	2,31 <sup>b</sup> ±0,13	2,61 <sup>b</sup> ±0,93	3,20 <sup>a</sup> ±0,06	2,26 <sup>b</sup> ±0,17
RP-estriado	2,28 <sup>b</sup> ±0,20	1,87 <sup>bc</sup> ±0,24	2,94 <sup>a</sup> ±0,10	1,40 <sup>c</sup> ±0,18

<sup>a,b,c</sup> En una misma fila las medias con letras minúsculas distintas son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

ee= error estándar.

Además, en todas la metodologías, exceptuando el R-DEM, se observó una influencia significativa ( $P < 0,05$ ) de la sección, según el tipo de producto manipulado, y de la temperatura de conservación del producto. En el caso de la madera, los niveles elevados de contaminación fueron influenciados por la sección de frutas y verduras frescas y por la temperatura ambiente, y en el caso del acero inoxidable por las secciones de charcutería y quesos y pescado fresco (**Figura 13**).

Los experimentos de limpieza realizados con materiales de distintas propiedades superficiales han fracasado en determinar alguna influencia sobre la facilidad de ser limpiados (Holah y Thorpe, 1990 citado por Jullien *et al.*, 2002). Por lo tanto, existen resultados contradictorios e inconsistentes en las investigaciones realizadas, debido a que la adhesión de un microorganismo a una superficie es influenciado por diversos factores (Flint *et al.*, 2000). Como consecuencia, la fuerza de adhesión varía enormemente dependiendo de las propiedades del material y conlleva a una resistencia a los procedimientos de limpieza (Jullien *et al.*, 2002). Entre los factores relacionados se encuentran las características fisiológicas y estructurales de las cepas utilizadas, el método para detectar la bacteria, la temperatura y naturaleza del fluido donde se encuentre suspendido y a las características del

material en contacto, tales como la geometría, la porosidad, la rugosidad, la composición y la hidrofobicidad (Flint *et al.*, 2000; Foschino *et al.*, 2003).

- **Nivel de contaminación en función del ensayo**

En la **Tabla 17** se observan los resultados del nivel de contaminación en función del ensayo. Únicamente en las metodologías de PPF y el RP-disco mostraron diferencias ( $P < 0,05$ ) en el nivel de contaminación detectado.

**Tabla 17.** Nivel de contaminación en las superficies del supermercado en función de la replica por las metodologías utilizadas para el recuento de mesófilos aerobios ( $\log_{10}$  UFC/100cm<sup>2</sup>) y la detección de ATP por bioluminiscencia ( $\log_{10}$  URL/100cm<sup>2</sup>).

Metodología	Ensayo (media $\log_{10}$ UFC/100cm <sup>2</sup> ± ee)		
	Primera	Segunda	Tercera
R-DEM	4,12 <sup>a</sup> ±0,56	5,05 <sup>a</sup> ±0,50	4,94 <sup>a</sup> ±0,56
RP-disco	1,52 <sup>b</sup> ±0,22	1,98 <sup>ab</sup> ±0,24	2,44 <sup>a</sup> ±0,26
ATP	2,96 <sup>a</sup> ±0,13	3,13 <sup>a</sup> ±0,13	2,75 <sup>a</sup> ±0,12
RP-convencional	3,03 <sup>a</sup> ±0,18	3,37 <sup>a</sup> ±0,20	2,77 <sup>a</sup> ±0,22
PPF	2,61 <sup>ab</sup> ±0,16	2,21 <sup>b</sup> ±0,14	2,73 <sup>a</sup> ±0,12
RP-estriado	2,13 <sup>a</sup> ±0,21	2,14 <sup>a</sup> ±0,19	1,90 <sup>a</sup> ±0,19

<sup>a,b,c</sup> En una misma fila las medias con letras minúsculas distintas son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).  
ee= error estándar.

La notificación de nuestra visita al supermercado para realizar la evaluación de la higiene sobre las superficies, puede sugerir la obtención de resultados sesgados. Sin embargo, la escasa diferencia entre los recuentos por ensayo, indican que el programa de higienización aplicado diariamente se lleva a cabo de una forma regular.

### 2.2.3. Análisis de algunos patógenos de interés alimentario y recuento total de enterobacterias

#### 2.2.3.1. Recuento y confirmación de estafilococos coagulasa positiva

El recuento de estafilococos obtenido a partir del medio Baird Parker por hisopado fue de  $1,98 \pm 0,16 \log_{10}$  UFC/100 cm<sup>2</sup> (n=90) y por discos de  $1,03 \pm 0,35 \log_{10}$  UFC/100 cm<sup>2</sup> (n=18),

siendo significativamente distintos ( $P < 0,05$ ). La distribución de estafilococos fue parecida en todas las secciones. Sin embargo, en la sección de carne fue donde se observaron colonias sospechosas, las que fueron aisladas e identificadas como: *S. cohnii ssp. urealyticum* y *S. cohnii ssp. cohnii*. Sin embargo, no se confirmó la presencia de estafilococos coagulasa positiva. La diferencia de los recuentos entre métodos de muestreo podría ser sesgada, debido a que en éstas secciones los discos se encontraban más visibles y accesibles al personal, quienes pudieron manipular la limpieza regular.

Es ampliamente conocido que los humanos son la principal fuente de contaminación de las intoxicaciones por *S. aureus* (coagulasa positiva), así que la higiene personal es de suma importancia (Temelli *et al.*, 2006). La ausencia de *S. aureus* en nuestro estudio sugiere una higiene personal aceptable de los trabajadores del supermercado. Por otro lado, el uso de temperaturas de refrigeración en algunas secciones de trabajo pudo ayudar a inhibir su crecimiento (por debajo de 5 °C). Asimismo, la desinfección de las superficies del supermercado con hipoclorito a las concentraciones de uso doméstico (3,5 g /l). Luppens *et al.* (2002) desarrollaron un biofilm de *S. aureus* sobre acero inoxidable con una población inicial de 0,4 – 1,3 x 10<sup>8</sup> UFC/cm<sup>2</sup> y observaron una supervivencia de las células del biofilm de sólo un 1% con 3 g/l de hipoclorito. Sin embargo, la presencia de otras especies de estafilococos puede ser importante, ya que podrían ayudar a prevenir la adhesión de algunos patógenos. Leriche y Carpentier (2000), realizaron un estudio con biofilms de *Staphylococcus sciuri* sobre superficies de acero inoxidable, y demostraron que la competición por nutrientes, además de la producción de los exopolisacáridos, previnieron la adhesión de *L. monocytogenes*.

### 2.2.3.2. Detección de *Listeria monocytogenes*

La detección de *L. monocytogenes* fue negativa en todas las muestras analizadas por ambas metodologías de muestreo utilizadas. Todos los miembros del género *Listeria* se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y han sido aislados de diferentes fuentes, incluyendo el ambiente de procesado alimentario. La contaminación ambiental es la causa más frecuente de su transmisión a productos terminados (Lin *et al.*, 2006). A pesar de ello,

sólo se logró aislar de una superficie, correspondiente a la sección de pescado, una colonia típica de listeria, la cual fue identificada como *Listeria grayi*. Las especies *L. innocua* y *L. grayi* aún no han sido descritas como causantes de enfermedad (McLauchlin *et al.*, 2004).

### 2.2.3.3. Detección de *Salmonella* spp.

En nuestro estudio, la presencia de *Salmonella* spp. no fue detectada con ambas metodologías. Sin embargo, se observó el desarrollo de otras colonias en el medio de cultivo selectivo, por lo que se aislaron para su identificación, encontrándose bacterias como: *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter amnigenus* 2, *Enterobacter cloacae*, *Flavimonas oryzae*, *E. coli* 1, *Pseudomonas stutzeri* y *Pseudomonas* spp. El hallazgo de *E. sakazakii* se puede relacionar con la variedad de tipos de productos existentes, ya que ha sido aislada en fábricas de leche en polvo, cereales, chocolate, harina de patata, pastas y ambientes domésticos; además, en queso, carne picada, salchichas y vegetales. Esto indica que es un microorganismo generalizado, sin embargo, no está muy claro porque la infección que produce sólo ocurre en neonatos y bebés prematuros y ésta se encuentra asociada al consumo de la fórmula infantil (Kandhai *et al.*, 2004). Por lo tanto, su presencia en el supermercado podría implicar un riesgo. La presencia de *Pseudomonas* en las zonas de charcutería y quesos y pescado fresco, puede encontrarse relacionada a la temperatura de conservación de los productos, ya que ha sido encontrada formando biofilms junto a otros microorganismos (*Proteus vulgaris* y *Sphingobacterium multivorum*) en refrigeradores de ambientes alimentarios sobre bandejas plásticas de policarbonato (Michaels *et al.*, 2002). Una variedad de bacterias ha sido aislada de frutas y verduras frescas, siendo comúnmente encontrada *Enterobacter* spp. (Thumberg *et al.*, 2002).

### 2.2.3.4. Recuento total de enterobacterias

Los recuentos en medio VRBGA por hisopado y discos fueron de  $0,78 \pm 0,14 \log_{10}$  UFC/100 cm<sup>2</sup> (n=90) y  $0,59 \pm 0,30 \log_{10}$  UFC/100 cm<sup>2</sup> (n=18), respectivamente. Los recuentos obtenidos por ambos métodos no fueron significativamente diferentes ( $P > 0,05$ ), esto nos indica que el análisis a partir de la agrupación de discos por secciones fue representativo y eficaz como el hisopado para la detección de enterobacterias. Cabe mencionar, que no todos

los microorganismos desarrollados en el medio selectivo VRBGA, pertenecieron a la familia *Enterobacteriaceae*. Entre ellos podemos mencionar a *Pseudomonas* spp. que son frecuentemente aisladas de las superficies de equipos y son importantes microorganismos de alteración (Langsrud *et al.*, 2003). La sección de pescado fresco presentó el mayor número de enterobacterias (Tabla 18). En esta sección, la presencia de *E. coli* como indicador de contaminación fecal, podría implicar un factor de riesgo para los consumidores (Moore y Griffith, 2002a). Lo anterior, podría originar un riesgo de contaminación cruzada en el hogar debido al manejo del producto crudo, seguido del contacto con alimentos listos para el consumo, superficies de trabajo de la cocina o utensilios (Burgess *et al.*, 2005). La contaminación fecal es la mejor vía por la que patógenos como: *Salmonella*, *Campylobacter* y *E. coli* O157:H7 acceden a los alimentos (Russell, 2000). Además, entre los microorganismos identificados y que raramente son causantes de enfermedades transmitidas por alimentos, están: *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp. y *Pseudomonas* spp. (Vanne *et al.*, 1996).

Tabla 18. Microflora aislada e identificada a partir del medio VRBGA utilizado para el recuento total de enterobacterias.

Microflora aislada e identificada	Secciones
<i>Klebsiella ozaenae</i> (7,7%), <i>Aeromonas hydrophila</i> (23,1%), <i>Cedecea davisae</i> (7,7%), <i>E. coli</i> 1 (7,7%) y <i>Proteus vulgaris</i> (7,7%)	Pescado fresco
<i>E. amnigenus</i> 2 (7,7%)	Frutas y verduras frescas
<i>Pantoea</i> spp. 3 (23,1%) (7,7%)	Frutas y verduras frescas Pasillos
<i>Pseudomonas</i> spp. (7,7%)	Charcutería y quesos

### 2.3. Discusión general

En la industria alimentaria, con respecto a sus características estructurales, se puede mencionar que la industria cumple con los estándares de seguridad requeridos, una adecuada separación de las zonas de trabajo y salas exclusivas para almacenar las piezas limpias de equipos desmontables, con lo que se minimiza el riesgo de contaminación cruzada. En el supermercado, al realizar la inspección de las superficies durante el muestreo, algunas presentaron vertidos de alimentos envasados (leche, yogurt, chocolate en polvo, conservas de aceitunas y exudado de pollo), en las secciones de yogurt, pasillos y carne, que incluso permanecieron durante todos los ensayos. Por lo tanto, el programa de higienización puede ser mejorado, realizándolo con mayor frecuencia y de manera rigurosa. Sumado al muestreo de las superficies de contacto con los productos alimentarios, se sugiere una validación y verificación de la higienización por: i) inspección de las superficies limpiadas, y ii) basadas en las referencias microbiológicas obtenidas en cada sección.

Por otra parte, en el supermercado, la ausencia de patógenos como *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* y *S. aureus* (coagulasa positiva) y el recuento de enterobacterias bajo ( $<1$  UFC/cm<sup>2</sup>), indica buenas prácticas de higiene, elaboración y un apropiado almacenaje, por lo que podemos deducir que el medio ambiente y la mayoría de las superficies de contacto con los productos no implican un riesgo higiénico-sanitario considerable (González-Rodríguez *et al.*, 2002).

A pesar de que la toma de muestras, para las distintas metodologías, se realizó en áreas cercanas entre sí al punto de muestreo elegido, al final el área muestreada siempre fue distinta. Por lo tanto, si la higienización de la superficie total de un equipo no es homogénea contribuye a la escasa correlación entre métodos. Además, las diferencias en los resultados, entre métodos, se pueden atribuir a diferencias en la adherencia bacteriana o a la pérdida de viabilidad (Davidson *et al.*, 1999). En este estudio se demuestra una vez más, que numerosos factores pueden influir sobre los resultados de la superficie de muestreo, incluyendo el método de muestreo, el material de la superficie, los factores ambientales, las propiedades de

los microorganismos, el protocolo de procesado de la muestra y el método de análisis (Buttner *et al.*, 2007). Por lo tanto, el riesgo de una enfermedad alimentaria asociada a una contaminación cruzada, es potencial. No obstante, siempre dependerá de dos factores, como son: i) el nivel de contaminación de las superficies y ii) la probabilidad de que esta se transfiera a los alimentos que son consumidos (Bloomfield y Scott, 1997).

En la industria alimentaria, los resultados del R-DEM demostraron que alrededor de  $10^4$  células viables permanecieron sobre las superficies después de ser tratadas con un agente limpiador alcalino fuerte, seguido de un desinfectante a base de aldehídos y amonio cuaternario. En el caso del supermercado, los resultados del R-DEM fueron alrededor de  $10^5$  células viables, con la aplicación irregular del detergente e hipoclorito con bayeta. Lo anterior, indica que al menos estos recuentos podrían estar dentro de los límites de detección de las metodologías por cultivo convencional y la detección de ATP, aunque éstas metodologías infraestimen el número de bacterias reales remanentes sobre las superficies (Bredholt *et al.*, 1999). En la industria alimentaria estudiada, el uso de la placa de contacto Petrifilm ofrece una buena alternativa para el control microbiológico de las superficies de acero inoxidable, debido a que proporcionó resultados similares al método de cultivo convencional (Park *et al.*, 2001). Mientras en el supermercado, esta metodología detectó una menor contaminación, quizá debido a la mayor formación de biofilms, conjuntamente con la diversidad del tipo de material, las temperaturas y sequedad de las superficies.

En el supermercado, la detección de ATP podría ser recomendada para la evaluación de las superficies, porque a diferencia del recuento microbiológico, estima la contaminación total, incluyendo la contaminación microbiana, residuos alimentarios y células de origen somático (Davidson *et al.*, 1999; Corbitt *et al.*, 2000). Con respecto a la detección de ATP, tiene como ventaja que no requiere una subsiguiente preparación de la muestra a analizar, ni de la separación de los microorganismos o concentración de los mismos (Boer y Beumer, 1999). Otra ventaja importante del uso de ATP es la facilidad para transportar el equipo al punto de muestreo que permite realizar las lecturas en el instante en la misma unidad de producción

(Calvert *et al.*, 2000), así como su habilidad de proporcionar resultados en pocos minutos, opuesto a los métodos microbiológicos que requieren días (Davidson *et al.*, 1999).

La aplicación de la DEM, a partir de los discos de acero inoxidable como soporte para evaluar cualquier tipo de superficie, es recomendable porque pone de manifiesto la contaminación ambiental real, sin que influya significativamente ( $P = 0,9495$ ) el tipo del material de la superficie evaluada. El acero inoxidable siendo una superficie hidrofóbica, se cree que las células pudieran encontrarse distribuidas homogéneamente. Además, se ha demostrado que las superficies hidrofóbicas aumentan la adhesión de células vegetativas o esporas bacterianas (Jullien *et al.*, 2002; Ivanova *et al.*, 2006). Asimismo, el uso de la tinción vital considera células VBNC, por lo tanto es una herramienta valiosa que pone de manifiesto, sin infraestimar, la contaminación real sobre las superficies de acero inoxidable (Wirtanen *et al.*, 2001b; Ivanova *et al.*, 2006). Por lo tanto, una combinación del cultivo convencional, análisis de imagen y ATP podría ser un protocolo recomendable para la evaluación de la eficiencia de los procedimientos de limpieza y desinfección. De esta manera, los procedimientos de higiene a escala industrial podrían ser optimizados. Además, servirían para evaluar la sensibilidad de otros métodos microbianos, como las placas de contacto (Bredholt *et al.*, 1999). Aunque existe una cantidad de métodos para evaluar la contaminación microbiana de las superficies, no existe un consenso para que un estándar sea aceptado. La precisión y la capacidad de repetibilidad de las mediciones de un método son afectadas considerablemente por la habilidad del operario y la técnica de recuperación; por lo que los resultados no son a menudo significativos cuando el número de microorganismos sobre las superficies es bajo (Foschino *et al.*, 2003).

La contaminación global fue significativamente ( $P < 0,05$ ) mayor en el supermercado con respecto a la industria alimentaria, con niveles de 2,87 y 2,29 unidades logarítmicas, respectivamente. Además, el programa de higienización aplicado, influyó significativamente ( $P < 0,0001$ ). En ambas instalaciones, el nivel de contaminación fue dependiente ( $P < 0,0001$ ) de la metodología utilizada. Algunos estudios señalan que la primera fuente de contaminación proviene principalmente de las materias primas y el aire ambiental, y en

segundo termino del equipo de procesado y las manos del personal (Cogan *et al.*, 2002; Temelli *et al.*, 2006). Por lo tanto, la promoción de buenas prácticas de higiene en los operarios o manipuladores de productos alimenticios es recomendable para evitar o minimizar las infecciones alimentarias (Burgess *et al.*, 2005).

La calidad del control microbiológico de las superficies ha sido identificada como indicador útil para el control de los puntos críticos representados por procedimientos de limpieza y desinfección. El RMA es generalmente tomado como referencia y correlacionado, aunque no específicamente, con los procedimientos de higiene (Legnani *et al.*, 2004). Sin embargo, en un programa de higienización, la elección del agente limpiador o desinfectante junto a una concentración óptima y tiempo de acción es muy importante para la destrucción de los microorganismos patógenos y alterantes de cualquier proceso industrial, evitando la contaminación del alimento y por consiguiente la llegada de éste al consumidor (Grönholm *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 1999; Bagge-Ravn *et al.*, 2003a). Sin embargo, debe considerarse que la tasa de destrucción de microorganismos es más baja en superficies, debido a que el desarrollo de biofilms proporciona mayor resistencia a los agentes limpiadores y desinfectantes, que en suspensiones; además de las resistencias microbianas que puedan existir (Grönholm *et al.*, 1999). En resumen, para mantener la higiene en cualquier ámbito, es necesario adecuar el programa de higienización de acuerdo al proceso (Foschino *et al.*, 2003).

V. Adaptación de la PCR en tiempo real como método de control de patógenos en superficies

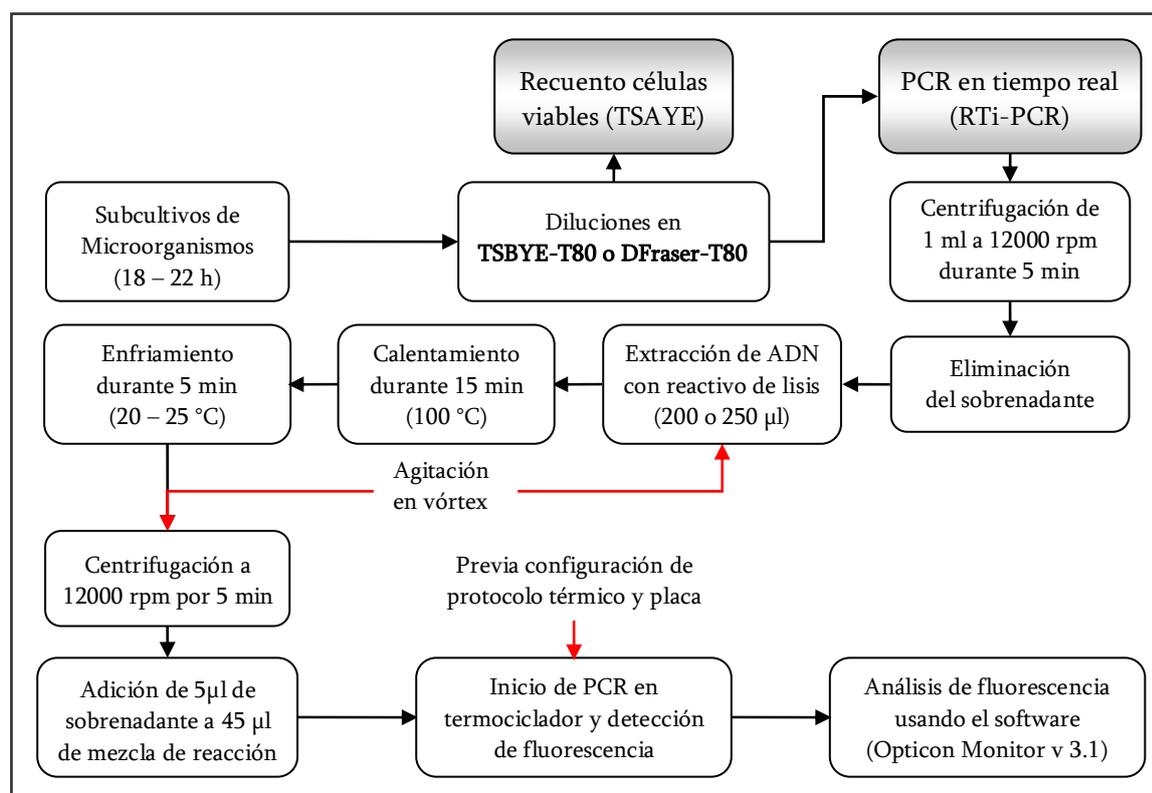


# 1. Puesta a punto de PCR en tiempo real en la detección de *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes*. Efecto del medio de pre-enriquecimiento adicionado de Tween 80

## 1.1. Material y métodos

### 1.1.1. Plan de trabajo

La **Figura 14** muestra el esquema del plan de trabajo para la puesta a punto de la PCR en tiempo real (RTi-PCR) para detectar *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* mediante la evaluación de los kits iQCheck™ *Salmonella* e iQCheck™ *Listeria monocytogenes* usando caldo triptona soja con extracto de levadura (TSBYE) y Demi-Faser (DFraser), respectivamente, ambos adicionados con Tween 80 al 0,1% p/v (T80) como dispersante bacteriano. Este experimento preliminar nos permitió proponer una metodología para la recuperación y detección a partir de superficies de acero inoxidable.



**Figura 14.** Esquema del plan de trabajo del experimento 1 (sección V).

**TSBYE-T80**= caldo triptona soja con extracto de levadura adicionado con Tween 80 (0,1% p/v).

**DFraser-T80**= caldo Demi Fraser adicionado con Tween 80 (0,1% p/v).

### 1.1.2. Cepas bacterianas y preparación de subcultivos

Las cepas bacterianas usadas fueron: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) CCUG 29478 y *Listeria monocytogenes* CCUG 15526 provenientes de la Colección de Cultivos de la Universidad de Göteborg (Suecia). Las cepas de cada microorganismo (cultivo stock en crioviales a -20 °C) fueron resuspendidas en caldo triptona soja (TSB; Becton Dickinson and Co., Le Pont De Claix, Francia) con 6 g/l de extracto de levadura (TSBYE; Becton Dickinson) e incubadas a 37 °C por 24 h. Posteriormente se sembraron por estría en agar triptona soja (TSA; Becton Dickinson) y se incubaron a 37 °C durante 24 h. A partir de una colonia aislada se inoculó en 10 ml de TSBYE y se incubó a 37 °C por 18 – 24 h, para ambos microorganismos, con la finalidad obtener cultivos en fase estacionaria.

### 1.1.3. Determinación de la sensibilidad y eficacia del análisis de RTi-PCR

Los análisis de la RTi-PCR fueron realizados con iQCheck™ *Salmonella* kit (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francia) e iQCheck™ *Listeria monocytogenes* kit (Bio-Rad). Para determinar la sensibilidad y la eficacia del análisis de RTi-PCR se utilizaron los medios de pre-enriquecimiento en TSBYE con 1 g/l de Tween 80 (TSBYE-T80; Panreac Química S.A., Barcelona, España) para *S. Typhimurium* y en caldo Demi Fraser (bioMérieux® SA, Mercy l'Etoile, Francia) con 1g/l de Tween 80 (DemiFraser-T80) para *L. monocytogenes*. Para cada microorganismo, a partir de los subcultivos se realizaron diluciones decimales de 10<sup>2</sup> a 10<sup>7</sup>. Paralelamente se llevó un control del recuento inicial de las diluciones sembrando en 5 placas de TSA. Asimismo, se realizó una comparación utilizando agua de peptona tamponada (bioMérieux®), medio de pre-enriquecimiento recomendado por Bio-Rad, con y sin Tween 80; además, del TSBYE sin Tween 80.

### 1.1.4. Análisis de PCR en tiempo real

A partir de la serie de diluciones fueron tomadas alícuotas de 1,0 ml (TSBYE-T80) y 1,5 ml (DFraser-T80) de ambos caldos, para el análisis de *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*, respectivamente.

- ***Extracción de ADN***

La muestra fue colocada en un tubo Eppendorf de 1,5 ml con tapón de anilla rosca (SUDELAB S.L., Barcelona, España) y centrifugada (MIKRO 12-24, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Alemania) a 12000 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Después fue retirado cuidadosamente todo el sobrenadante con micropipeta pipetman (Gilson S.A.S., Villiers-le-Bel, Francia) utilizando puntas con filtro de 1-1000 µl (StarLab GMBH, Ahrensburg, Alemania). A continuación el “pellet” fue resuspendido, dependiendo del microorganismo, con 200 o 250 µl del reactivo de lisis (Bio-Rad), el cual se mantuvo sobre una placa de agitación a una velocidad moderada. Después la mezcla obtenida se agitó por 30 s en vórtex a velocidad máxima. Posteriormente el tubo Eppendorf fue colocado en baño de agua a 100 °C por 15 min. Se permitió el enfriado de la muestra a temperatura ambiente durante 5 min y se agitó nuevamente en vórtex a velocidad máxima por 15 s. De nuevo fue centrifugada a 12000 rpm por 5 min. Para su análisis inmediato, se retiraron cuidadosamente 5 µl del sobrenadante. Para el análisis posterior, un volumen 70 – 100 µl del sobrenadante fue congelado a -20 °C en otro tubo Eppendorf estéril. Las muestras se analizaron por duplicado.

- ***Mezcla de PCR***

La mezcla de PCR fue preparada utilizando los volúmenes correspondientes de la solución de amplificación y de las sondas fluorescentes, según las indicaciones del fabricante (Bio-Rad). La solución de amplificación contiene: buffer, cloruro de magnesio, nucleótidos, cebadores específicos del microorganismo, la enzima *Taq* ADN polimerasa y el control interno de amplificación (IAC). El control interno es añadido para confirmar una correcta amplificación del ADN, se trata de un ADN sintético (a una concentración subóptima) que es amplificado al mismo tiempo que el gen diana del microorganismo en cuestión, pero es detectado por un segundo fluoróforo, TEXAS RED para *Salmonella* spp. y FAM (6-carboxifluoresceína) para *L. monocytogenes*. El control interno ayuda a determinar si existen inhibidores de la PCR que interfieren con la amplificación.

Las sondas fluorescentes son del tipo baliza molecular o “molecular beacon” (MB), un oligonucleótido fluorogénico marcado en el extremo 5' con FAM para *Salmonella* spp. y con

TEXAS RED para *L. monocytogenes*, cuyos rangos de absorción/emisión son 490/530 nm y 575/620 nm, respectivamente (Liming *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 2006). Ambos oligonucleótidos están marcados en el extremo 3' con DABCYL, que actúa como un inhibidor de fluorescencia o *quencher*. El uso de DABCYL como *dark quencher* tiene la ventaja sobre otro *quencher* convencional, que siendo no fluorescente (excitación 452 nm), reduce el background, eliminando así el riesgo de interferencia por la fluorescencia que emite un “quencher” convencional (Lukhtanov *et al.*, 2001 citado por Reynisson *et al.*, 2006). El MB de iQCheck™ *Salmonella* de Bio-Rad se basa en la especificidad de las sondas y los cebadores que amplifican el gen *iagA* (invasión asociada al gen) específico para *Salmonella* spp. (Uyttendaele *et al.*, 2003; Fakhr *et al.*, 2006). Y la detección de iQCheck™ *Listeria monocytogenes* amplifica el gen *hlyA* (virulencia de la listeriolisina ligada al gen) específico para *L. monocytogenes* (Liming *et al.*, 2004).

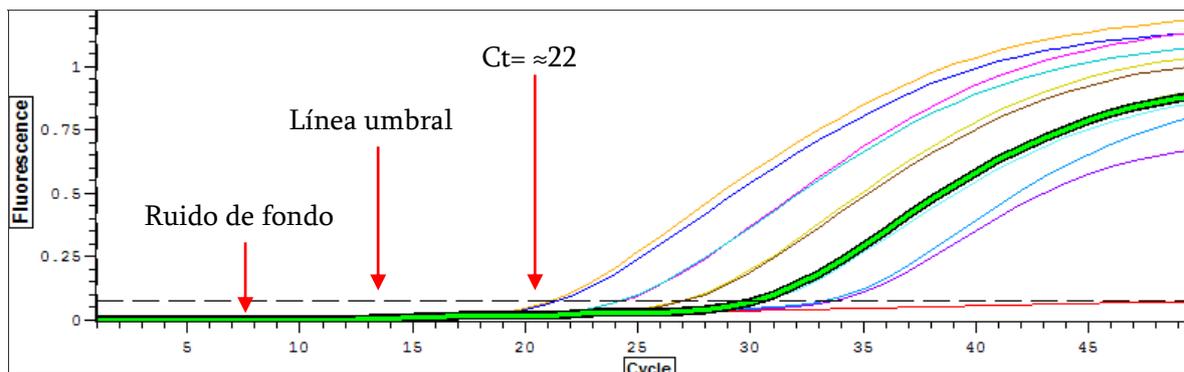
Se tomaron 45 µl de la mezcla de PCR y fueron colocadas en los tubos Eppendorf de PCR, seguidamente de 5 µl de la muestra o controles, tanto positivos como negativos. Los tubos fueron sellados con las tapas ópticas para ser colocados en el termociclador. La mezcla de PCR se mantuvo en condiciones de refrigeración (1 h máx. a 4 °C) durante el llenado de la microplaca, debido a su inestabilidad.

#### - **Protocolo térmico de PCR**

Los parámetros usados para el ciclo térmico fueron los indicados por el fabricante: 1<sup>er</sup> Ciclo: 50 °C por 2 min, 2<sup>o</sup> Ciclo: 95 °C por 10 min, 3<sup>er</sup> Ciclo: 95 °C por 20 s (desnaturalización de ADN), 55 °C por 20 s (hibridación de sondas fluorescentes y cebadores-medida de fluorescencia) y 72 °C por 30 s (extensión de ADN por la Taq polimerasa). El tercer ciclo se repitió un total de 50 veces. La amplificación fue visualizada y analizada en el equipo Chromo4™ Real Time System (Bio-Rad, Hercules, California, EUA) usando el software Opticon Monitor versión 3.1 (Bio-Rad Laboratories, California, EUA).

### - Interpretación de resultados de RTi-PCR

Los valores de corte (cutoff values) son expresados como “Threshold cycle” (Ct) que se refiere al primer incremento significativo de fluorescencia que excede el ruido de fondo y cruza la línea umbral (Figura 15).



**Figura 15.** Curvas de amplificación (número de ciclo vs. unidades relativas de fluorescencia) obtenidas en el equipo Chromo4™ Real Time System usando el software Opticon Monitor versión 3.1.

Los valores de Ct son analizados para determinar la presencia o ausencia del ADN diana. Sin embargo, cuando un Ct es igual a no aplicable (N/A) indica que la fluorescencia de la muestra no alcanzó significativamente el ruido de fondo, por lo tanto, no cruzó el umbral. Un Ct mayor o igual a 10 para la sonda fluorescente del ADN diana o del IAC se consideró positivo. Un Ct igual a N/A para el ADN diana, además de un Ct mayor o igual a 10 para el IAC se consideró negativo. Cuando se obtuvieron valores de Ct iguales a N/A para ambas sondas, se consideró inhibición de la reacción de PCR.

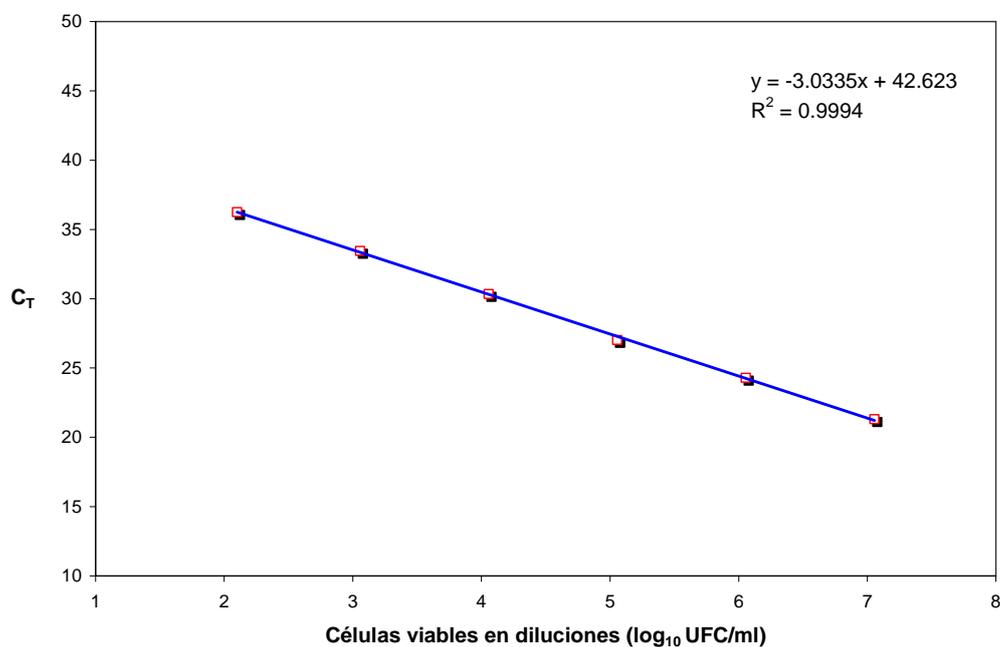
#### 1.1.5. Análisis estadístico

Se realizaron dos réplicas en diferentes días. En cada réplica las muestras se efectuaron por duplicado. Los recuentos de células viables (TSA) se expresaron en unidades logarítmicas (base 10) UFC/ml. Para cada microorganismo se realizó el análisis de regresión para la comparación entre el recuento de células viables (TSA) y los valores de Threshold cycle (Ct), con la finalidad de conocer su relación. El análisis estadístico mencionado anteriormente se realizó con el programa SAS (SAS Institute, Inc.).

## 1.2. Resultados y discusión

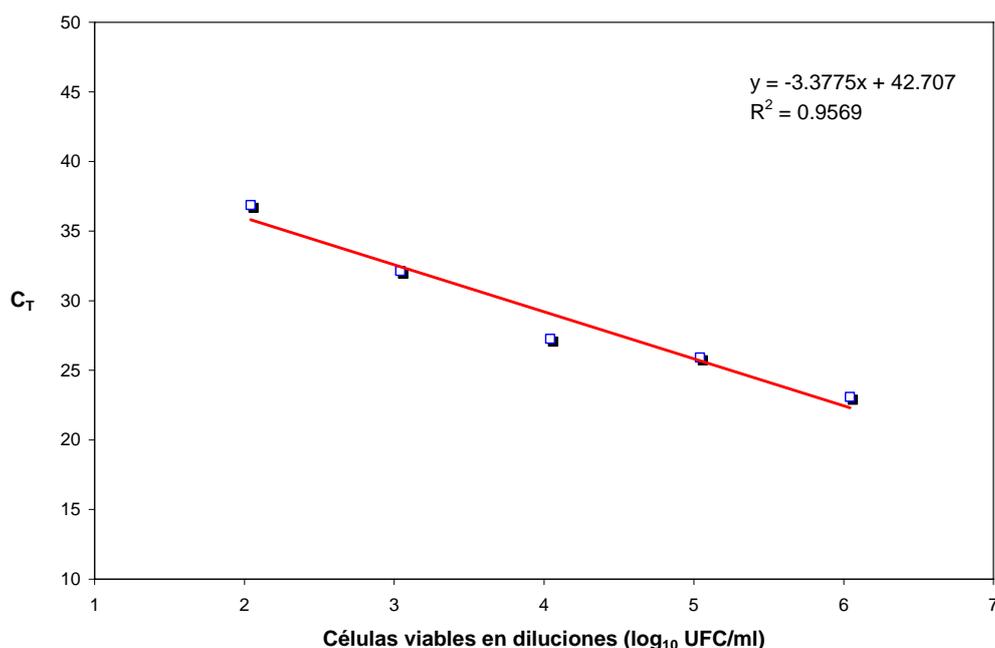
### 1.2.1. Sensibilidad de iQCheck kits RTi-PCR

La sensibilidad del método iQCheck™ *Salmonella* real-time PCR para detectar *S. Typhimurium* a partir de TSBYE-T80 fue demostrada al realizar el análisis de regresión, entre el recuento de células viables en TSA y los valores de Ct, y obtener un coeficiente de determinación elevado ( $R^2 = 0,9994$ ), lo que demuestra que la cuantificación del método es lineal en un intervalo entre  $10^2$  a  $10^7$  UFC/ml (**Figura 16**).



**Figura 16.** Curvas estándar generada con los valores de Threshold cycle para las diluciones decimales de *S. Typhimurium* CCUG 29478 en TSBYE-T80 ( $10^2$  a  $10^7$ ).

De igual manera, se demostró la sensibilidad del método iQCheck™ para la detección de *L. monocytogenes* a partir de DFraser-T80. El alto coeficiente de determinación ( $R^2 = 0,9569$ ) demostró que la cuantificación del método fue lineal en un intervalo entre  $10^2$  a  $10^6$  UFC/ml (**Figura 17**). Como se esperaba, los valores de Ct fueron inversamente proporcionales con el número inicial de copias bacterianas (Berrada *et al.*, 2006).



**Figura 17.** Curvas estándar generada con los valores de Threshold cycle para las diluciones decimales de *L. monocytogenes* CCUG 15526 en DFraser-T80 ( $10^2$  a  $10^6$ ).

La comparación entre los medios de pre-enriquecimiento, agua de peptona tamponada (sugerido por Bio-Rad) y TSBYE, con o sin Tween 80, no presentaron diferencias apreciables en el valor obtenido de  $C_t$  (Tabla 19). En todos los casos se utilizó la misma concentración de *S. Typhimurium*.

**Tabla 19.** Valores de  $C_t$  para los distintos medios de pre-enriquecimiento, con o sin Tween 80. Valor medio  $\pm$  desviación estándar,  $n=4$ .

Medio de pre-enriquecimiento	$C_t$ (Threshold cycle)
Agua de peptona tamponada	$32,36 \pm 0,14$
Agua de peptona tamponada - T80	$32,78 \pm 0,30$
TSBYE	$32,58 \pm 0,21$
TSBYE-T80	$32,54 \pm 0,23$

### 1.2.2. Eficiencia de la PCR

La cuantificación relativa de la carga bacteriana en una muestra desconocida puede ser calculada por extrapolación de los valores de  $C_t$  a partir de la curva generada con las diluciones del microorganismo diana. Por lo tanto, cuando se obtiene una curva de

calibración es importante evaluar la **eficiencia de la PCR**, además del coeficiente de determinación (Wolffs *et al.*, 2005). En este estudio, se determinó conjuntamente la **eficiencia de la PCR**, cuyo valor óptimo es uno, y de acuerdo a la fórmula siguiente proporciona una pendiente (m) de -3,3219 (Higuchi *et al.*, 1993).

$$\text{Eficiencia de la PCR} = \left[ 10^{(-1/\text{pendiente})} \right] - 1$$

Sin embargo, la eficiencia de la reacción puede ser afectada negativamente por diversos factores, tales como: el mal funcionamiento del equipo, la mezcla de reacción incorrecta, la escasa actividad enzimática y las sustancias inhibidoras presentes en las matrices de muestras complejas disminuyendo por consecuencia la ventana de detección (Rossen *et al.*, 1992; Wolffs *et al.*, 2005).

En las **Figuras 16** y **17** se observan los valores de las pendientes de las curvas de regresión, siendo de m= -3,0335 para *S. Typhimurium* y m= -3,3775 para *L. monocytogenes*, que generaron eficiencias de la PCR de 1,14 y 0,98, respectivamente. De lo que se concluye que la RTi-PCR se llevó a cabo satisfactoriamente para ambos microorganismos en los medios de pre-enriquecimiento adicionados con Tween 80. Rodríguez-Lázaro *et al.* (2004), en un estudio de la detección de *L. monocytogenes* en productos de carne por RTi-PCR, determinaron las eficiencias de la reacción y con valores por encima de 0,83 consideraron la reacción como excelente.

El protocolo de iQCheck *Salmonella* kit recomienda únicamente un paso de pre-enriquecimiento en agua de peptona tamponada (Liming y Bhagwat, 2004). Sin embargo, Uyttendaele *et al.* (2003), utilizaron un paso de pre-enriquecimiento en caldo de infusión de cerebro corazón (BHI) y demostraron la sensibilidad del kit detectando un número menor a 10 UFC por reacción de PCR. Además, Fakhr *et al.* (2006) realizaron un paso adicional de enriquecimiento selectivo con caldo de tetracionato y demostraron la sensibilidad del kit detectando un mayor número de muestras positivas por RTi-PCR que por el método

convencional. No obstante, los dos estudios anteriores no mostraron los valores de la eficiencia de la reacción para las matrices utilizadas.

La necesidad de sondas mas sensibles es requerida, debido a que las matrices de muestras alimentarias y ambientales contienen bajas cantidades de patógenos que con frecuencia presentan una gran microbiota acompañante (Malorny y Hoorfar, 2005). Además, los fluoróforos de las sondas deben evitar la interacción con los constituyentes de la muestra, para no complicar las lecturas de fluorescencia (Hoorfar *et al.*, 2004).

En resumen, “molecular beacons”, son un tipo de sondas fluorogénicas sensibles y específicas, que pueden ayudar a disminuir el tiempo de enriquecimiento para la detección de pocas copias de ADN y por lo tanto proporcionar una respuesta diagnóstica más rápida (Reynisson *et al.*, 2006).



## 2. Comparación de la PCR en tiempo real y el método inmunoenzimático VIDAS en la detección de *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes* a partir de superficies no porosas de acero inoxidable

### 2.1. Material y métodos

#### 2.1.1. Plan de trabajo

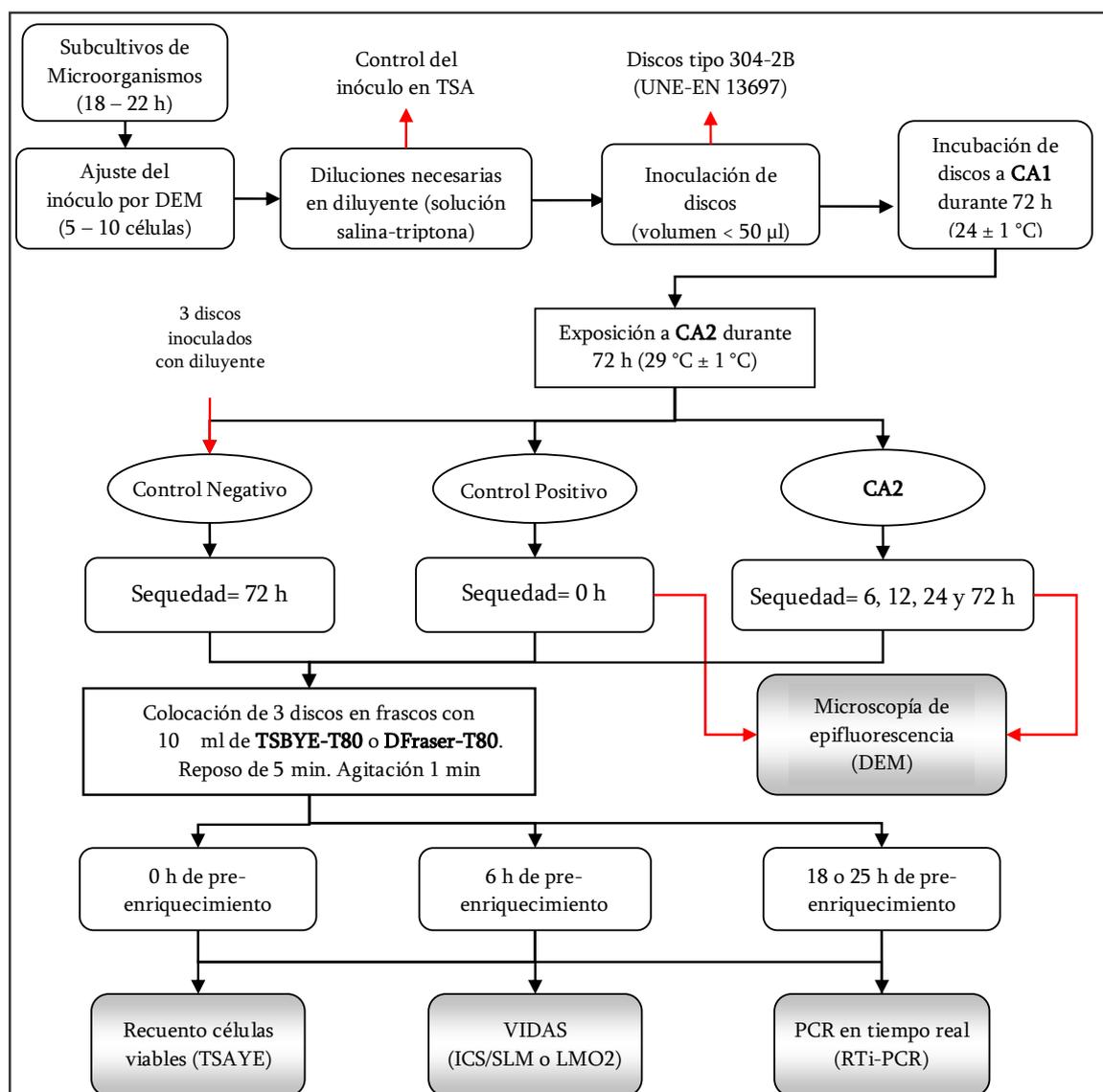


Figura 18. Esquema del plan de trabajo del experimento 2 (sección V).

CA1= Humedad relativa elevada.

CA2= Sequedad con flujo laminar.

TSBYE-T80= caldo triptona soja con extracto de levadura adicionado con Tween 80 (0,1% p/v).

DFraser-T80= caldo Demi Fraser adicionado con Tween 80 (0,1% p/v).

ICS/SLM= inmunocentración de salmonela/salmonela

LMO2= *L. monocytogenes* II

La **Figura 18** muestra el plan de trabajo para evaluar la sensibilidad y eficacia de detección de la PCR en tiempo real *vs.* VIDAS, a partir de los biofilms de *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* desarrollados sobre las superficies de acero inoxidable. El estudio fue diseñado a partir de biofilms desarrollados durante 72h en condiciones de humedad relativa elevada y posteriormente sometidos a sequedad con flujo laminar. Los biofilms fueron analizados por ambos métodos a diferentes tiempos de exposición a sequedad y a distintos tiempos de pre-enriquecimiento. Además se evaluó: i) el desarrollo del biofilm, ii) el efecto de la condición de estrés aplicada al biofilm, iii) el efecto del medio pre-enriquecimiento en la recuperación de células viables, y iv) la posible degradación del ADN durante 72 h de sequedad con flujo laminar.

### **2.1.2. Cepas bacterianas y preparación de subcultivos**

Las cepas bacterianas (*S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*) fueron revivificadas para la obtención de subcultivos en fase estacionaria (**sección V 1.1.2.**). La concentración del subcultivo fue determinada por recuento microscópico, mediante DEM (**sección IV 1.4.6.**). A partir de este subcultivo se realizaron diluciones decimales en diluyente (solución salina-triptona, 0,05 g/l de triptona [Bacto™ Tryptone, Difco™]; 8,5 g/l de cloruro de sodio [Panreac Química]; ajustado a pH 7,2) para inocular las superficies de trabajo. Para ambos microorganismos, se seleccionó la dilución cuya concentración permitiera un inóculo de 5 – 10 células en un volumen menor a 50 µl.

### **2.1.3. Inoculación de las superficies de trabajo**

Como soporte se emplearon discos de acero inoxidable con acabado tipo 304 grado 2B, de 2 cm de diámetro por 1 mm de grosor, de superficie plana. Los discos fueron limpiados de acuerdo con el procedimiento descrito en la UNE-EN 13697 (Anónimo, 2002) y esterilizados a 121 °C por 15 min. Los discos fueron inoculados en el centro de la superficie y paralelamente se llevó un control del número de células inicial sembrando en diez placas de TSA (Becton Dickinson).

#### **2.1.4. Desarrollo de biofilms**

Los discos inoculados fueron colocados en placas Petri estériles y sometidos a una condición ambiental con humedad relativa elevada, alrededor de 65% (CA1). Para lo anterior se utilizó una caja plástica color gris opaco (30 cm x 15 cm x 12 cm) y en su base interior fueron colocadas gasas estériles humedecidas con 100 ml de agua destilada. La caja fue cubierta con papel aluminio para proteger los discos de la luz y mantener la humedad. La caja fue incubada a  $24 \pm 1$  °C durante 72h y se colocó un sensor de humedad relativa. Además, se incubaron 3 discos inoculados con diluyente (solución salina-triptona), sin microorganismos, como un control del proceso para confirmar las condiciones asépticas a lo largo del mismo.

#### **2.1.5. Condición de estrés aplicada al biofilm**

Al finalizar el tiempo de incubación los discos fueron sometidos a un tratamiento de sequedad con flujo laminar vertical a  $29 \pm 1$  °C (CA2), temperatura ambiente en el interior de la cabina de bioseguridad utilizada (Modelo Bio-II-A; Telstar, Terrasa, España). Los discos fueron retirados en grupos (17 unidades) a diferentes intervalos de tiempo: 0, 6, 12, 24 y 72h de exposición a sequedad. Además, fue colocado un sensor de humedad relativa en el interior de la cabina. Una vez retirado cada grupo de discos, una parte (5 unidades) fue analizada inmediatamente por DEM; el resto de los discos (12 unidades) se les aplicó el pre-enriquecimiento.

#### **2.1.6. Procedimiento de pre-enriquecimiento**

Para cada microorganismo, los discos fueron colocados de tres en tres en frascos de 50 ml con 10 ml de caldo de pre-enriquecimiento, TSBYE-T80 para *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*; además, en caldo DFraser-T80 sólo para *L. monocytogenes*. Los frascos conteniendo los discos reposaron 5 min y después fueron agitados durante 1 min utilizando un agitador mecánico vórtex a velocidad máxima. A continuación, los frascos fueron incubados a 37 °C para *S. Typhimurium* y 30 °C para *L. monocytogenes*. Para realizar la detección de los microorganismos por los métodos correspondientes, los frascos fueron

agitados como se describió anteriormente. La toma de alícuotas fue realizada a distintos tiempos de pre-enriquecimiento, a las 0, 6 y 18 h para *S. Typhimurium* y a las 0, 6 y 25 h para *L. monocytogenes*.

### **2.1.7. Métodos de detección de microorganismos**

#### **2.1.7.1. Recuento por microscopía de epifluorescencia directa**

Los discos retirados a distintos tiempos después de la exposición a sequedad (sección V 1.5.) fueron evaluados por DEM (sección IV 1.4.6.). En este caso, sólo se agregaron 20 µl de la mezcla de colorantes sobre las superficies de los discos, se mezcló vigorosamente utilizando la misma punta, con excepción de dos discos para observar la estructura del biofilm, e inmediatamente después se colocó un cubreobjetos sobre la preparación, continuando con las indicaciones del fabricante (Molecular Probes). Se realizó el análisis de imagen y con el recuento microscópico conjuntamente se determinó el área celular. El recuento por DEM se realizó por triplicado.

#### **2.1.7.2. Recuento de células viables en TSAYE**

Para determinar el recuento de la carga total de células viables, una alícuota de 1 ml de TSBYE-T80 y DFraser-T80 fueron sembradas en TSA con 6 g/l de extracto de levadura (TSAYE, Becton Dickinson) e incubadas a 37 °C durante 24 – 48h. Las muestras fueron analizadas por duplicado.

#### **2.1.7.3. Prueba inmunoenzimática: VIDAS**

Para *S. Typhimurium* una alícuota de 0,8 ml TSBYE-T80 fue tomada para el análisis VIDAS® I.C. *Salmonella* (ICS, bioMérieux® SA, Marcy l'Etoile, Francia), que permite una inmunocentración mediante una captura inmunológica automatizada de *Salmonella* spp., móvil y no móvil, mediante una mezcla de anticuerpos muy específicos dirigidos contra los antígenos somáticos "O" y flagelares "H". Siguiendo las indicaciones del fabricante (bioMérieux®) se efectuó un enriquecimiento específico (no selectivo) a 42 °C durante 5 h. Después se transfirió una alícuota de 0,5 ml del caldo enriquecido para el análisis VIDAS®

*Salmonella* (SLM, bioMérieux®). Para *L. monocytogenes* una alícuota de 0,1 ml de TSB-YE-T80 y DFraser-T80 fue inoculada a 10 ml de caldo de enriquecimiento selectivo Fraser (bioMérieux®) e incubado a 37 °C durante 48 h. Posteriormente del caldo Fraser, se tomaron alícuotas de 0,5 ml para el análisis VIDAS® *Listeria monocytogenes* II (LMO2, bioMérieux®).

#### **2.1.7.4. PCR en tiempo real**

Los análisis de RTi-PCR fueron realizados a partir de alícuotas de 1,0 ml de TSBYE-T80 para *S. Typhimurium* y 1,5 ml de ambos caldos, TSB-YE-T80 y DFraser-T80, para *L. monocytogenes*. El análisis de RTi-PCR se efectuó bajo las mismas condiciones descritas en la **sección V 1.1.4.**

#### **2.1.8. Análisis estadístico**

Un total de 95 discos fueron inoculados por experimento para cada microorganismo. Al final se realizaron tres réplicas en diferentes días. En cada réplica, las muestras se efectuaron por cuadruplicado. Los recuentos de células viables en TSAYE y DEM se expresaron en unidades logarítmicas (base 10). Para cada microorganismo (*S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*) se determinaron los valores de tamaño celular (área en  $\mu\text{m}^2$ ) entre los tiempos de exposición a sequedad (0, 6, 12, 24 y 72 h) sin pre-enriquecimiento (0 h). Para cada microorganismo (*S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*) y tiempos de pre-enriquecimiento (0, 6 y 18 o 25 h) se compararon los recuentos en TSAYE (UFC/ml) y los valores de Ct entre los tiempos de exposición a sequedad (0, 6, 12, 24 y 72 h). La comparación global de medias se realizó utilizando el análisis de la varianza y la posterior separación medias con la prueba de Student-Newman-Keuls (SNK); ambas pruebas con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . Además, para cada microorganismo se realizó el análisis de regresión para la comparación entre el recuento de células viables en TSAYE (UFC/cm<sup>2</sup>) y DEM, o los valores de Ct, con la finalidad de conocer su relación. Los análisis estadísticos mencionados anteriormente y el cálculo de las frecuencias de aparición de las muestras, positivas y negativas, para el método inmunoenzimático VIDAS (ICS/SLM o LMO2) se realizaron con el programa SAS (SAS Institute, Inc.).

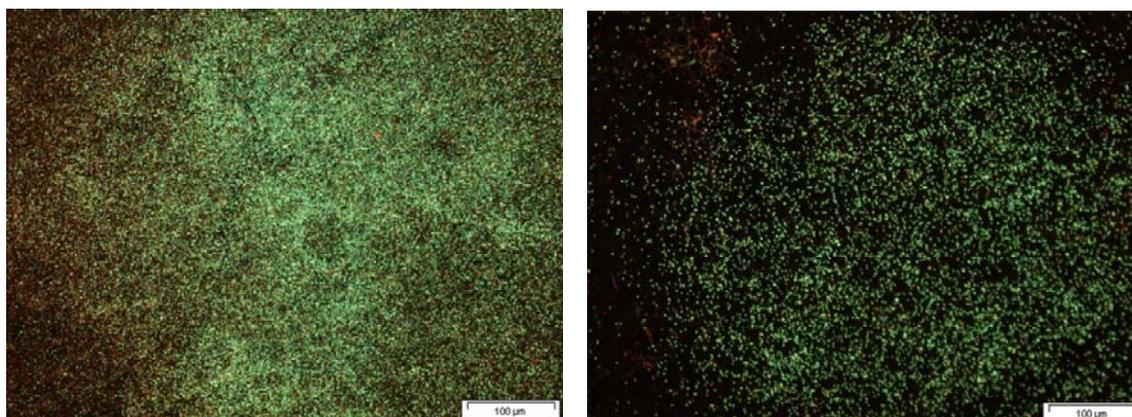
## 2.2. Resultados y discusión

### 2.2.1. Desarrollo de biofilms

El crecimiento de los biofilms a una humedad relativa (HR) elevada de 68 – 73% e incubados a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 72 h, fue para simular las condiciones ambientales que podrían originarse en las superficies de una planta procesadora de alimentos sin aplicar un secado posterior a la higienización, sobretodo después de un lapso de inactividad laboral. La solución triptona-salina diluida fue usada para el crecimiento y adhesión celular, con la finalidad de que las células se adaptaran a un ambiente bajo en nutrientes (Leriche y Carpentier, 2000). La temperatura para el desarrollo de los biofilms fue seleccionada de acuerdo a estudios anteriores donde se ha demostrado que la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) es dependiente de la temperatura. Herald y Zottola (1988) observaron que, en el caso de *L. monocytogenes* (cepa), la temperatura óptima de producción fue  $21^\circ\text{C}$ , pero no a  $10^\circ\text{C}$  o  $35^\circ\text{C}$ . En otro estudio para *L. monocytogenes* Scott A y FM876 presentó una adherencia óptima a  $18^\circ\text{C}$  y a temperatura de refrigeración ( $4^\circ\text{C}$ ) la adherencia fue también considerable (Norwood y Gilmour, 2001).

El tiempo seleccionado de 72 h para el desarrollo de los biofilms garantizó la adhesión bacteriana a las superficies de ensayo. Lundén *et al.* (2000) observaron que cepas resistentes y no resistentes de *L. monocytogenes* requirieron periodos de tiempo muy cortos para adherirse a superficies de contacto alimentarias de acero inoxidable. Stepanovic *et al.* (2003) encontraron resultados similares para *Salmonella* spp., cuya temperatura y tiempo óptimos para la producción del biofilm fueron alrededor de  $22^\circ\text{C}$  durante 48 h, además de encontrar una mayor producción del biofilm en condiciones estáticas (sin agitación). Hassan *et al.* (2004) determinaron el comportamiento de *L. monocytogenes* (monoespecie o multiespecies) en biofilms (mono o dúo especies) sobre una superficie formadora de condensados y observaron un fácil desprendimiento de las células adheridas, tanto de *L. monocytogenes* como de *Pseudomonas putida*. Estos autores demostraron que un biofilm desarrollado sobre una superficie limpia, en condiciones de humedad relativa elevada puede actuar como fuente de microorganismos contaminantes durante varias semanas.

Los biofilms desarrollados sobre superficies no porosas de acero inoxidable, tanto para *S. Typhimurium* como para *L. monocytogenes* alcanzaron una densidad celular de  $5,2 \pm 0,32 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> y  $5,4 \pm 0,14 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente. El desarrollo de los biofilms a las 72 h fue confirmado por DEM (**Figura 19**). Nuestros resultados concuerdan con: i) Joseph *et al.* (2001) que desarrollaron biofilms de *Salmonella* sobre distintas superficies de contacto alimentarias para evaluar su sensibilidad a desinfectantes y a las 48 h obtuvieron poblaciones de  $5,5 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> sobre acero inoxidable utilizando TSB diluido (0,2% P/V), y ii) Chae y Schraft (2001) que desarrollaron biofilms de *L. monocytogenes* durante diez días y al segundo día alcanzaron una densidad celular de  $5 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>, con una disminución de 1 unidad logarítmica al sexto día y recuperando nuevamente la misma densidad al décimo día.



**Figura 19.** Biofilms de *S. Typhimurium* CCUG 29478 y *L. monocytogenes* CCUG 15526 desarrollados con humedad relativa elevada durante 72 h sobre superficies no porosas de acero inoxidable. Análisis mediante microscopía de epifluorescencia directa (DEM).

### 2.2.2. Efecto de la condición de estrés aplicada al biofilm

La exposición de los biofilms a sequedad con flujo laminar a  $29 \pm 1^\circ\text{C}$  con HR 28 – 32% ocasionó, para ambos microorganismos, una reducción significativa ( $P < 0,05$ ) en el tamaño celular (área). Durante las primeras 6 h de exposición se observó una disminución de 22% para *S. Typhimurium*, y esta fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) que para *L. monocytogenes* (**Tabla 20**). Es conocido que entre los factores que afectan el desarrollo del biofilm se encuentran las fuerzas hidrodinámicas (Chmielewski y Frank, 2003).

**Tabla 20.** Efecto de la exposición a sequedad en el tamaño de las células de *S. Typhimurium* CCUG 29478 y *L. monocytogenes* CCUG 15526 provenientes del biofilm desarrollado con humedad relativa elevada durante 72 h sobre superficies no porosas de acero inoxidable. Análisis mediante microscopía de epifluorescencia directa (DEM).

Tiempo de sequedad <sup>α</sup> (h)	<i>S. Typhimurium</i> CCUG 29478		<i>L. monocytogenes</i> CCUG 15526	
	Tamaño celular <sup>β</sup> (μm <sup>2</sup> )	Reducción celular (%)	Tamaño celular <sup>β</sup> (μm <sup>2</sup> )	Reducción celular (%)
0	1,06 <sup>a</sup> ± 0,13	0	0,77 <sup>a</sup> ± 0,23	0
6	0,83 <sup>b</sup> ± 0,23	22	0,75 <sup>a</sup> ± 0,24	3
12	0,86 <sup>b</sup> ± 0,27	19	0,69 <sup>b</sup> ± 0,21	10
24	0,76 <sup>bc</sup> ± 0,27	28	0,62 <sup>c</sup> ± 0,19	19
72	0,70 <sup>c</sup> ± 0,31	34	0,62 <sup>c</sup> ± 0,20	19

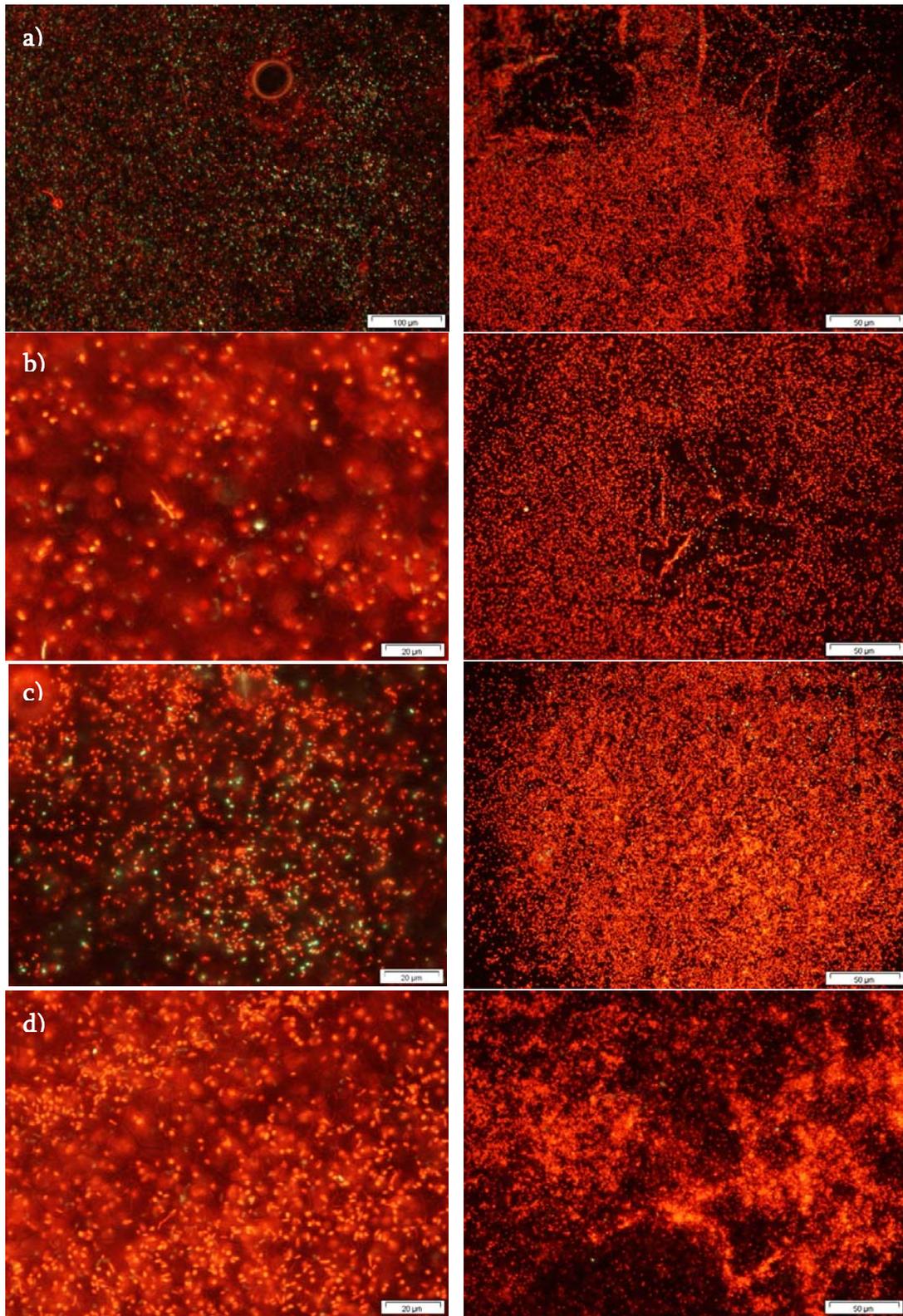
<sup>α</sup> Sequedad con flujo laminar a 28 – 30 °C.

<sup>β</sup> Valores medios del área celular ± desviación estándar (n= 50 – 200).

<sup>a,b,c</sup> En una misma columna las medias con distintas letras son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

La reducción observada en el tamaño celular del biofilm quizás se originó por la influencia del flujo laminar, pues se ha observado que durante el desarrollo de biofilms produce agregados celulares redondeados e irregulares que se encuentran separados por espacios intersticiales (Davey y O'toole, 2000). Además, las condiciones que se crean en el interior del biofilm como el agotamiento de nutrientes o anaerobiosis, serían otros factores que pueden influir en la disminución del tamaño celular (Luppens *et al.*, 2002).

Al aplicar la tinción vital LIVE/DEAD sobre el biofilm, se observó la influencia de la sequedad. La mayoría de las células exhibieron una coloración roja, es decir, las células se encontraban muertas o lesionadas; no obstante, también fue observada la presencia de bacterias teñidas de verde, células viables, pero el número disminuyó a lo largo del tiempo (**Figura 20**). Las bacterias que consiguen sobrevivir a un tratamiento de estrés, generalmente adquieren un daño subletal y a su vez una mayor sensibilidad. Sin embargo, en condiciones óptimas las células son capaces de recuperarse a diferencia de las que se encuentran en estado VBNC (Foong y Dickson, 2004).

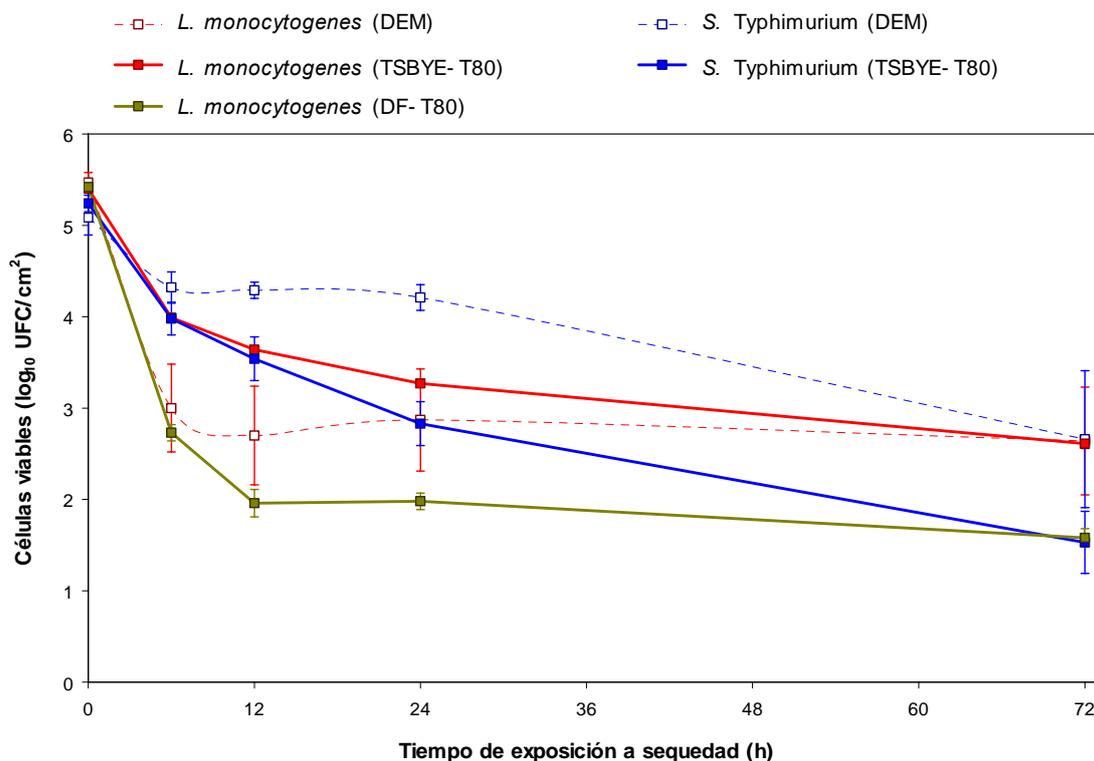


**Figura 20.** Biofilms de *S. Typhimurium* CCUG 29478 (izquierda) y *L. monocytogenes* CCUG 15526 (derecha) sobre superficies no porosas de acero inoxidable después diferentes tiempos de exposición a sequedad con flujo laminar a 28 – 30 °C. (a) 6 h, (b) 12 h, (c) 24 h y (d) 72 h. Análisis mediante microscopía de epifluorescencia directa (DEM).

### 2.2.3. Efecto del medio de pre-enriquecimiento en la recuperación de células viables

#### 2.2.3.1. A diferentes tiempos de exposición a sequedad (0 h de preenriquecimiento)

En la **Figura 21** se muestra una comparación de la microscopía de epifluorescencia directa (DEM) y el recuento en placa (TSAYE) en la detección células viables de biofilms de *S. Typhimurium* CCUG 29478 y *L. monocytogenes* CCUG 15526 a partir de superficies no porosas de acero inoxidable después de la exposición a sequedad con flujo laminar. El TSBYE-T80 y DFraser-T80 (0 h de pre-enriquecimiento) se usaron en la recuperación de las células viables en TSAYE. Los recuentos de células viables obtenidos por DEM mostraron una disminución significativa ( $P < 0,05$ ) para ambos microorganismos; sin embargo, la disminución fue considerablemente mayor a partir de las 6 h de sequedad para *L. monocytogenes*.



**Figura 21.** Comparación de la microscopía de epifluorescencia directa (DEM) y el recuento en placa (TSAYE) en la detección células viables de biofilms de *S. Typhimurium* CCUG 29478 y *L. monocytogenes* CCUG 15526 a partir de superficies no porosas de acero inoxidable después de la exposición a sequedad. El TSBYE-T80 y DFraser-T80 (0 h de pre-enriquecimiento) fueron usados para la recuperación de las células viables.

Además, los recuentos de células viables por DEM fueron similares a los obtenidos por TSAYE y mostraron una regresión lineal significativa ( $P < 0,05$ ) para ambos microorganismos en ambos medios de recuperación. Para *S. Typhimurium* se obtuvo un coeficiente de determinación elevado ( $R^2= 0,8903$ ) y en el caso de *L. monocytogenes* los coeficientes de determinación fueron dependientes del medio utilizado para recuperar las células viables, siendo mayor con el DFraser-T80 ( $R^2= 0,9713$ ) que con el TSBYE-T80 ( $R^2= 0,8232$ ). Nuestros resultados concuerdan con estudios realizados al usar la tinción vital LIVE/DEAD como indicador metabólico de bacterias, tanto de bacterias Gram negativas como Gram positivas, donde han encontrado buenas correlaciones y una clara distinción entre células viables y muertas o lesionadas (Maukonen *et al.*, 2000).

Para ambos microorganismos, los resultados obtenidos en TSAYE a partir de la recuperación en TSBYE-T80 coinciden con un estudio de Janning *et al.* (1994) donde evaluaron la resistencia de cepas bacterianas en condiciones de sequedad y agruparon las cepas de acuerdo al nivel de supervivencia, siendo observado el nivel mas alto para las bacterias Gram positivas y *Salmonella* spp., que presentaron una disminución inicial de células viables de 0,1 – 2,7 unidades logarítmicas. La pérdida de viabilidad bacteriana está relacionada al daño de su pared celular y membrana citoplasmática, por lo tanto, la supervivencia obtenida para ambos microorganismos puede ser explicada por las diferencias estructurales de la pared celular (Brennan *et al.*, 1986). Se ha demostrado que la pared celular de los microorganismos Gram positivos contiene un 80% de peptidoglicanos, como ácidos teicocos y proteínas, y que sirven como una capa protectora ante la penetración de cristales de hielo durante la congelación (Chang *et al.*, 2003); sin embargo, los microorganismos Gram negativos poseen una capa delgada de peptidoglicanos, una membrana externa y una zona periplásmica, lo que al parecer le infiere mayor resistencia contra los agentes microbianos (Wirtanen *et al.*, 2001b).

Kusumaningrum *et al.* (2003) realizaron un estudio de supervivencia sobre superficies de acero inoxidable para *S. enteritidis*, *C. jejuni* y *S. aureus* probando niveles de contaminación elevada, moderada y baja, sometiénolos a sequedad sin flujo laminar y a temperatura

ambiente (22 – 25 °C). Los resultados obtenidos demostraron que la supervivencia bacteriana decreció rápidamente (1 – 2 unidades logarítmicas) de acuerdo a los niveles de contaminación iniciales. En este estudio, se utilizó el mismo nivel de contaminación elevado usado por estos autores ( $10^5$  UFC/cm<sup>2</sup>) y durante las primeras 6 h la supervivencia disminuyó significativamente ( $P < 0,05$ ) en más de una unidad logarítmica, tanto para *L. monocytogenes* como para *S. Typhimurium*.

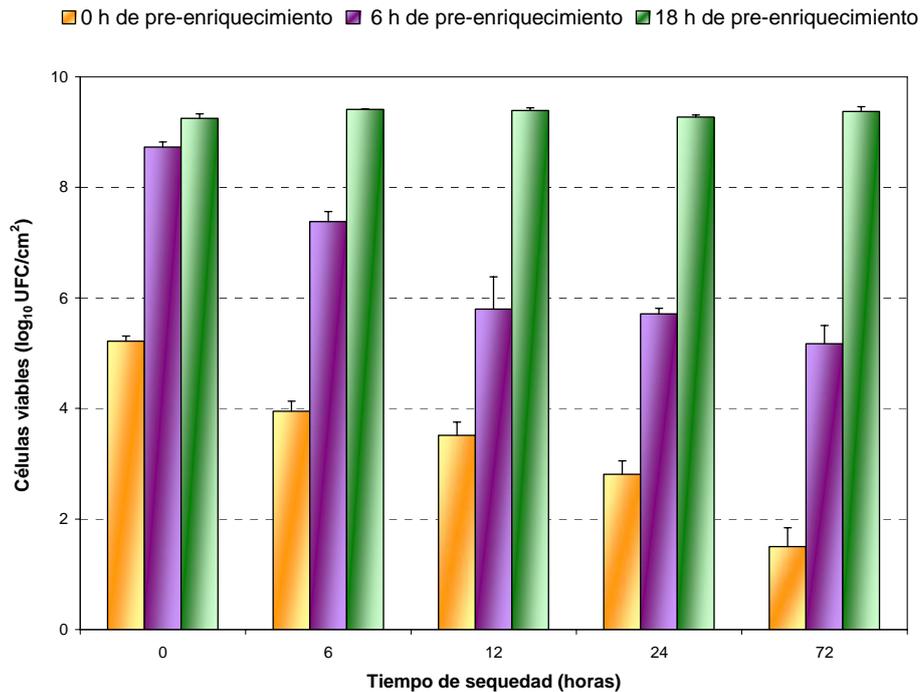
Después de 72 h de sequedad, se observó la recuperación de 1,5 y 2,6 log<sub>10</sub> UFC/ml de células viables (a partir de TSBYE-T80) de *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*, respectivamente (**Figura 21**). Las condiciones aplicadas en este estudio para evaluar la supervivencia bacteriana, 30 °C con flujo laminar, fueron mas enérgicas que las empleadas por Kusumaningrum *et al.* (2003), así que nuestros resultados mostraron una resistencia o adaptabilidad mayor de las células del biofilm desarrollado previamente con respecto a las células en suspensión que son usadas generalmente en la mayoría de los estudios (Davey y O'toole, 2000).

En la **Figura 21** también se muestran los recuentos obtenidos de células viables (a partir de DFraser-T80) de *L. monocytogenes* después de la exposición a sequedad con flujo laminar. Los valores de células viables a partir de DFraser-T80 son menores que aquellos valores de células viables obtenidos a partir de TSBYE-T80, lo que puede indicar que algunas células inicialmente estresadas y lesionadas por la sequedad, al entrar en contacto con el medio DFraser-T80 algunas fueron lesionadas aún mas, resultando letal o cambiando a un estado VBNC, siendo incapaces de recuperarse en el medio sólido de TSAYE. La generación de células VBNC o lesionadas es uno de los cambios comúnmente implicados en una respuesta de adaptación al estrés (Chae y Schraft, 2001). Sin embargo, en un estudio de Foong y Dickson (2004) sobre la supervivencia y recuperación de VBNC de *L. monocytogenes* (inoculada en arena) después de la desecación con flujo laminar durante 24 h y posteriormente almacenada durante dos meses a 4 °C, indicaron que la bacteria no fue capaz de permanecer en un estado VBNC. Estos autores, dentro del primer mes de estudio mencionaron la observación microscópica de algunas células de una longitud mayor, las

cuales denominaron VBNC; no obstante, bajo las condiciones de estrés de nuestro estudio no se observó ninguna célula de *L. monocytogenes* mas alargada. La resistencia antimicrobiana que exhibe un biofilm está relacionada a su estructura tridimensional y producción de exopolisacáridos, cuando el biofilm se rompe, se especula que esta se pierde (Chae y Schraft, 2001). Lo anterior puede explicar la mayor susceptibilidad de las células provenientes del biofilm a los componentes selectivos del medio DFraser-T80. Suh y Knabel (2001) observaron la inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* no lesionada con concentraciones de acriflavina entre 0,01 – 0,02 g/l, cuya función es suprimir las bacterias Gram positivas. Estos mismos investigadores demostraron que factores como: el grado de lesión por calor, el tipo de caldo de enriquecimiento, el oxígeno y la flora acompañante, afectaron significativamente la recuperación de *L. monocytogenes* lesionada por calor.

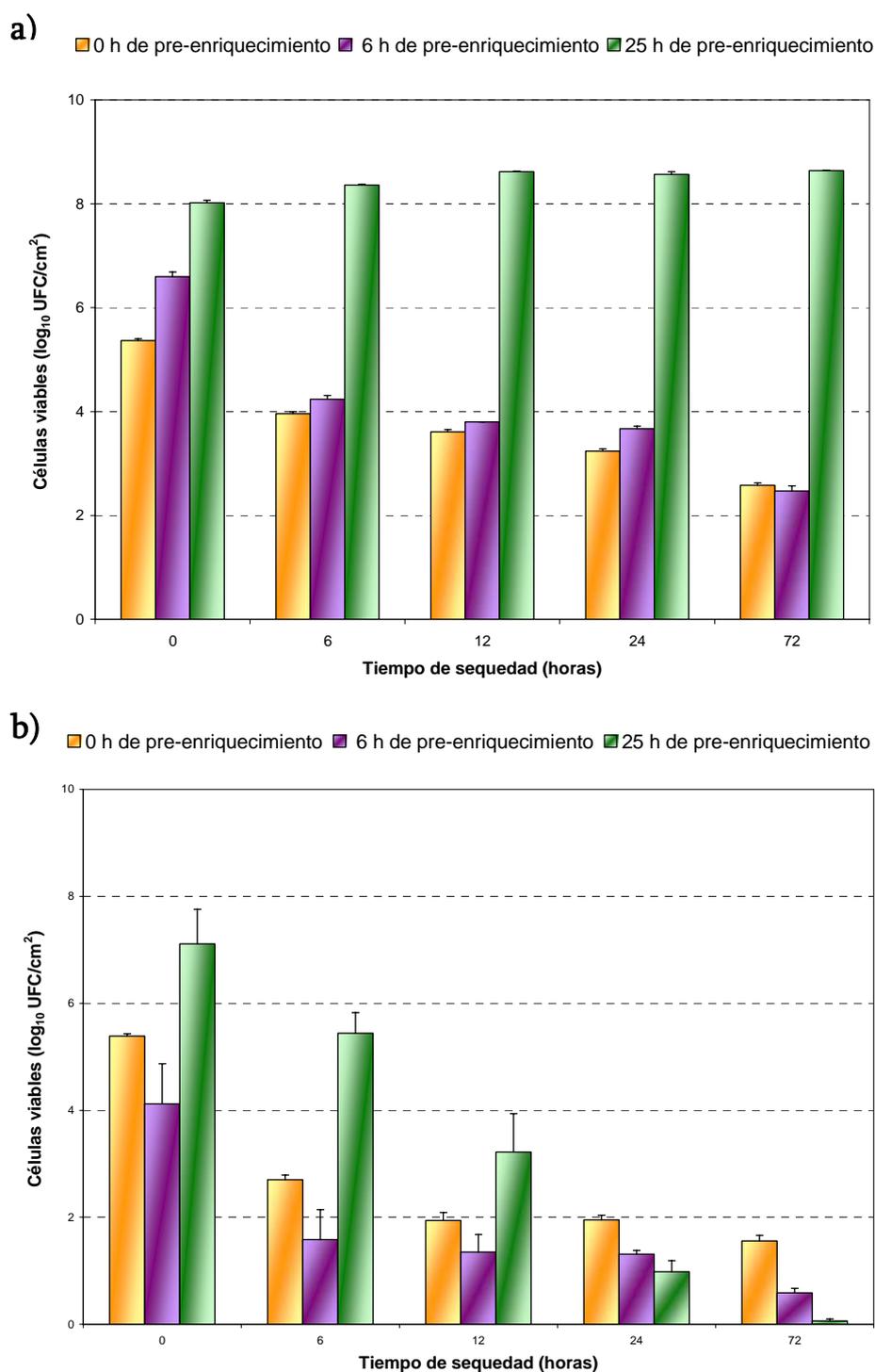
#### **2.2.3.2. A diferentes tiempos de exposición a sequedad y con distintos tiempos de pre-enriquecimiento**

En la **Figura 22** se muestra el efecto del medio de pre-enriquecimiento en la recuperación de células viables (TSAYE) del biofilm de *S. Typhimurium* a partir de superficies no porosas de acero inoxidable después de la exposición a sequedad con distintos tiempos de pre-enriquecimiento. La recuperación de células viables (TSAYE) utilizando el medio TSBYE-T80 fue significativamente ( $P < 0,05$ ) dependiente del tiempo de pre-enriquecimiento. Para cada tiempo de sequedad, se observó que el incremento de células viables fue significativo ( $P < 0,05$ ) a mayor tiempo de pre-enriquecimiento. La recuperación a las 6 h de pre-enriquecimiento fue notable, siendo total a las 18 h.



**Figura 22.** Efecto del medio de pre-enriquecimiento en la recuperación de células viables (TSAYE) del biofilm de *S. Typhimurium* CCUG 29478 a partir de superficies no porosas de acero inoxidable después de la exposición a sequedad con diferentes tiempos de pre-enriquecimiento. La altura de la columna representa la media  $\pm$  error estándar,  $n=12$ .

En la **Figura 23 (a y b)** se muestra claramente el efecto del medio de pre-enriquecimiento en la recuperación de células viables (TSAYE) del biofilm de *L. monocytogenes* a partir de superficies no porosas de acero inoxidable después de la exposición a sequedad con diferentes tiempos de pre-enriquecimiento. En la **Figura 23 (a)** se observó que la recuperación de las células viables (TSAYE) utilizando el medio TSBYE-T80 fue significativamente ( $P < 0,05$ ) dependiente del tiempo de pre-enriquecimiento. Para cada tiempo de sequedad, se observó que el incremento de células viables fue significativo ( $P < 0,05$ ) a mayor tiempo de pre-enriquecimiento y en todos los tiempos de sequedad, así la recuperación fue total a las 25 h. En la **Figura 23 (b)** se muestra la recuperación de células viables (TSAYE) utilizando el medio DFraser-T80. Para los tiempos de sequedad 0, 6 y 12 h, se observó una disminución significativa de las células viables a las 6 h de pre-enriquecimiento y posteriormente un incremento significativo ( $P < 0,05$ ) a las 25 h, mientras que para los tiempos de sequedad de 24 y 72 h, se observó una disminución significativa ( $P < 0,05$ ) de las células viables a mayor tiempo de pre-enriquecimiento.



**Figura 23.** Efecto del medio de pre-enriquecimiento en la recuperación de células viables (TSAYE) del biofilm de *L. monocytogenes* CCUG 15526 a partir de superficies no porosas de acero inoxidable después de la exposición a sequedad con diferentes tiempos de pre-enriquecimiento. (a) TSBYE-T80 y (b) DFraser-T80. La altura de la columna representa la media  $\pm$  error estándar, n=12.

Por lo tanto, *L. monocytogenes* mostró mejor habilidad para recuperarse en TSBYE-T80 que en DFraser-T80 (Figura 21 y 23). Esta observación concuerda con los resultados obtenidos

por Budu-Amoako *et al.* (1992) cuando evaluaron la recuperación de células de *L. monocytogenes* lesionadas por calor y congelación en medios de enriquecimiento primarios y observaron, para ambos tipos de células lesionadas, una mayor recuperación en medio TSBYE que en el medio *Listeria* enrichment broth (LEB). El LEB contiene una concentración de acriflavina (0,015 g/l) similar al caldo Demi-Fraser (0,0125 g/l) (Anónimo, 1997c). Presumiblemente se atribuye a la acriflavina la escasa recuperación de las células del biofilm de *L. monocytogenes* lesionadas por desecación. Los resultados de este estudio demuestran que la composición del medio de enriquecimiento primario es un factor importante a ser considerado en la recuperación de células lesionadas por desecación de *L. monocytogenes*.

#### 2.2.4. Comparación de RTi-PCR vs. el método inmunoenzimático VIDAS

En la **Tabla 21** se muestran los recuentos de células viables (TSA YE) y los valores de Ct, para *S. Typhimurium* recuperada en TSBYE-T80, mientras que en la **Tabla 22** los resultados para *L. monocytogenes* recuperada en DFraser-T80 y TSBYE-T80. Es importante mencionar que para ambos microorganismos todas las muestras analizadas por la RTi-PCR no mostraron inhibición de la reacción de PCR. Por lo tanto, todas las muestras con un valor de Ct numérico se consideraron positivas, siendo la frecuencia de detección por la RTi-PCR de 100%.

##### 2.2.4.1. Comparación RTi-PCR y VIDAS ICS/SLM

Como se muestra en la **Tabla 21**, para *S. Typhimurium* la RTi-PCR fue más sensible que el método VIDAS ICS/SLM. La frecuencia de detección con VIDAS ICS/SLM, con un recuento inicial de  $5,2 \log_{10}$  UFC/ml, fue nula sin un pre-enriquecimiento previo para todos los tiempos de sequedad, con excepción de una muestra. Además, se observó que después de un periodo de pre-enriquecimiento de 6 h sólo se lograron detectar en su totalidad aquellas muestras que tuvieron una exposición a sequedad menor o igual a 6 h. Al mayor tiempo de pre-enriquecimiento (18 h) y a los distintos tiempos de sequedad, la frecuencia de detección con VIDAS fue del 100%. Hammack *et al.* (2004) realizaron un estudio para evaluar la efectividad relativa de métodos del “Bacteriological Analytical Manual” (BAM) para

recuperar *Salmonella* a partir de la superficie de melones cantalupos comparando medios selectivos y métodos rápidos, como el VIDAS ICS/SLM. Estos investigadores con el método rápido obtuvieron una escasa recuperación de *Salmonella* con una contaminación artificial de  $10^3 - 10^4$  UFC por melón, después de una desecación a temperatura ambiente de 3 – 4 h y un almacenaje durante tres días a 2 – 6 °C.

**Tabla 21.** Comparación del método inmunoenzimático VIDAS ICS/SLM y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RTi-PCR) en la detección de *S. Typhimurium* a partir un biofilm desarrollado en superficies no porosas de acero inoxidable después de diferentes tiempos de exposición a sequedad y a distintos tiempos de pre-enriquecimiento en TSBYE-T80.

<i>S. Typhimurium</i> CCUG 29478 (TSBYE-T80)				
Tiempo de pre-enriquecimiento	Tiempo de sequedad <sup>α</sup> (h)	TSAYE <sup>β</sup> (log <sub>10</sub> UFC/ml)	Ct <sup>γ</sup> RTi-PCR	VIDAS <sup>ε</sup> ICS-SLM
0 h	0	5,22 <sup>a</sup> ± 0,32	26,99 <sup>a</sup> ± 0,49	0/12
	6	3,95 <sup>b</sup> ± 0,63	27,10 <sup>a</sup> ± 0,46	1/12
	12	3,51 <sup>b</sup> ± 0,82	26,70 <sup>a</sup> ± 0,43	0/12
	24	2,81 <sup>c</sup> ± 0,82	27,19 <sup>a</sup> ± 0,46	0/12
	72	1,50 <sup>d</sup> ± 0,82	27,01 <sup>a</sup> ± 0,69	0/12
6 h	0	8,73 <sup>a</sup> ± 0,30	18,82 <sup>c</sup> ± 5,91	12/12
	6	7,38 <sup>b</sup> ± 0,62	20,05 <sup>c</sup> ± 1,04	12/12
	12	5,80 <sup>c</sup> ± 2,02	22,14 <sup>bc</sup> ± 3,02	6/12
	24	5,71 <sup>c</sup> ± 0,36	24,18 <sup>ba</sup> ± 1,10	0/12
	72	5,17 <sup>c</sup> ± 0,81	26,51 <sup>a</sup> ± 2,41	0/12
18 h	0	9,25 <sup>a</sup> ± 0,27	15,87 <sup>a</sup> ± 3,24	12/12
	6	9,41 <sup>a</sup> ± 0,05	14,63 <sup>ba</sup> ± 0,36	12/12
	12	9,39 <sup>a</sup> ± 0,18	14,46 <sup>ba</sup> ± 0,28	12/12
	24	9,27 <sup>a</sup> ± 0,14	14,50 <sup>ba</sup> ± 0,40	12/12
	72	9,37 <sup>a</sup> ± 0,22	13,57 <sup>b</sup> ± 0,43	12/12

<sup>α</sup> Sequedad con flujo laminar a 28 – 30 °C.

<sup>β</sup> Valores medios del recuento de células viables ± desviación estándar, n=12.

<sup>γ</sup> Valores medios de Ct ± desviación estándar, n=9.

<sup>ε</sup> Frecuencia de detección: no. de muestras positivas/ no. de muestras analizadas.

De acuerdo al fabricante el umbral mínimo detectable para VIDAS ICS/SLM es de 2 log<sub>10</sub> UFC/ml (bioMerieux, Francia). Hornes *et al.* (1991) al aplicar inmunoseparación magnética (IMS) observaron que la separación de células no viables es posible cuando los antígenos de la superficie celular están intactos; por lo tanto, la escasa detección de VIDAS, en la etapa de

ICS y sin previo pre-enriquecimiento, pudo originarse por efecto de la exposición a sequedad con flujo laminar, provocando daños en la superficie celular de *S. Typhimurium*, y por consecuencia a los antígenos somáticos o flagelares, disminuyendo la captura por los anticuerpos específicos. El límite de detección intrínseca de VIDAS SLM es 4,3 – 5,9 log<sub>10</sub> UFC/ml de acuerdo al fabricante (bioMerieux, Francia). Así que otra posible explicación de la escasa detección pudo ser que las 5 h de post-enriquecimiento a 42 °C en el caldo ICS no fue suficiente para alcanzar el nivel requerido, especialmente teniendo en cuenta el estado subletal. Hammack *et al.* (2004) al observar los resultados en conjunto de los medios selectivos probados para la recuperación de *Salmonella*, demostraron que el caldo de inmunocentración (ICS) del sistema VIDAS fue significativamente menos efectivo que el caldo lactosa (LAC) aprobado por BAM para el pre-enriquecimiento a partir de frutas frescas.

#### 2.2.4.2. Comparación RTi-PCR y VIDAS LMO2

En la **Tabla 22**, para *L. monocytogenes* se observa que la RTi-PCR fue nuevamente más sensible que el método VIDAS LMO2. Con un recuento inicial de 5,4 log<sub>10</sub> UFC/ml sin pre-enriquecimiento y sin exposición a sequedad, tanto en DFraser-T80 como en TSBYE-T80, la detección con VIDAS LMO2 fue del 100%; sin embargo, una vez iniciada la exposición a sequedad la detección es nula, posiblemente debido al efecto de los componentes selectivos del caldo Fraser. Sin embargo, después de 6 y 25 h de pre-enriquecimiento a los distintos tiempos de sequedad *L. monocytogenes*, recuperada en TSBYE-T80, presentó una frecuencia de detección con VIDAS LMO2 del 100%.

Por otro lado, cuando *L. monocytogenes* fue recuperada con DFraser-T80 después 6 h de pre-enriquecimiento, la detección sólo fue posible sin haber sido expuesta a sequedad. Además, después del tiempo máximo de pre-enriquecimiento (25 h) la detección fue disminuyendo a medida que se incrementó el tiempo de exposición a sequedad. El umbral de detección para VIDAS LMO2 es de 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> UFC/ml o g, por lo tanto los resultados falsos negativos de algunas muestras fueron ocasionados por la inhabilidad de *L. monocytogenes* para recuperarse en el medio DFraser-T80 y alcanzar el umbral de detección mínimo

requerido (Keith, 1997; Gasanov *et al.*, 2005). La alta especificidad de VIDAS LMO2 ha sido demostrada en estudios como el realizado por Rola *et al.* (2006), que evaluaron *L. monocytogenes* en leche en polvo y observaron un límite de detección igual al del fabricante.

**Tabla 22.** Comparación del método inmunoenzimático VIDAS LMO2 y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RTi-PCR) en la detección de *L. monocytogenes* a partir un biofilm desarrollado en superficies no porosas de acero inoxidable después de diferentes tiempos de exposición a sequedad y a distintos tiempos de pre-enriquecimiento en DFraser-T80 y TSBYE-T80.

<i>L. monocytogenes</i> CCUG 15526							
Tiempo de pre-enriquecimiento	Tiempo de sequedad <sup>α</sup> (h)	DFraser-T80			TSBYE-T80		
		TSAYE <sup>β</sup> (log <sub>10</sub> UFC/ml)	Ct <sup>γ</sup> RTi-PCR	VIDAS <sup>ε</sup> LMO2	TSAYE <sup>β</sup> (log <sub>10</sub> UFC/ml)	Ct <sup>γ</sup> RTi-PCR	VIDAS <sup>ε</sup> LMO2
0 h	0	5,39 <sup>a</sup> ± 0,14	29,36 <sup>a</sup> ± 2,31	12/12	5,37 <sup>a</sup> ± 0,10	28,78 <sup>b</sup> ± 0,39	6/6
	6	2,70 <sup>b</sup> ± 0,30	30,40 <sup>a</sup> ± 1,29	0/12	3,96 <sup>b</sup> ± 0,15	29,56 <sup>a</sup> ± 0,10	0/6
	12	1,94 <sup>c</sup> ± 0,51	30,90 <sup>a</sup> ± 1,98	0/12	3,61 <sup>c</sup> ± 0,12	30,01 <sup>a</sup> ± 0,27	0/6
	24	1,95 <sup>c</sup> ± 0,33	31,35 <sup>a</sup> ± 3,70	0/12	3,24 <sup>d</sup> ± 0,15	29,77 <sup>a</sup> ± 0,28	0/6
	72	1,56 <sup>d</sup> ± 0,35	31,32 <sup>a</sup> ± 3,22	0/12	2,58 <sup>e</sup> ± 0,16	29,69 <sup>a</sup> ± 0,94	0/6
6 h	0	4,12 <sup>a</sup> ± 2,59	29,33 <sup>a</sup> ± 0,49	12/12	6,60 <sup>a</sup> ± 0,31	25,32 <sup>c</sup> ± 0,13	6/6
	6	1,58 <sup>b</sup> ± 1,95	31,60 <sup>a</sup> ± 1,64	0/12	4,24 <sup>b</sup> ± 0,26	28,33 <sup>a</sup> ± 0,40	6/6
	12	1,35 <sup>b</sup> ± 1,13	30,96 <sup>a</sup> ± 1,46	0/12	3,80 <sup>c</sup> ± 0,00	28,75 <sup>a</sup> ± 0,58	6/6
	24	1,31 <sup>b</sup> ± 0,24	31,54 <sup>a</sup> ± 3,06	0/12	3,67 <sup>c</sup> ± 0,18	27,81 <sup>b</sup> ± 0,45	6/6
	72	0,59 <sup>b</sup> ± 0,28	30,05 <sup>a</sup> ± 5,19	0/12	2,47 <sup>d</sup> ± 0,33	28,38 <sup>a</sup> ± 0,23	6/6
25 h	0	7,11 <sup>a</sup> ± 2,24	20,88 <sup>b</sup> ± 2,88	12/12	8,02 <sup>c</sup> ± 0,19	15,90 <sup>ba</sup> ± 0,21	6/6
	6	5,44 <sup>b</sup> ± 1,35	29,82 <sup>a</sup> ± 3,33	12/12	8,36 <sup>b</sup> ± 0,06	16,04 <sup>ba</sup> ± 0,84	6/6
	12	3,22 <sup>c</sup> ± 2,48	29,01 <sup>a</sup> ± 2,90	12/12	8,62 <sup>a</sup> ± 0,02	15,58 <sup>b</sup> ± 0,46	6/6
	24	0,98 <sup>d</sup> ± 0,71	29,83 <sup>a</sup> ± 2,06	10/12	8,57 <sup>a</sup> ± 0,16	16,52 <sup>a</sup> ± 0,66	6/6
	72	0,06 <sup>d</sup> ± 0,13	30,12 <sup>a</sup> ± 0,98	0/12	8,64 <sup>a</sup> ± 0,04	15,41 <sup>b</sup> ± 0,20	6/6

<sup>α</sup> Sequedad con flujo laminar a 28 – 30 °C.

<sup>β</sup> Valores medios del recuento de células viables ± desviación estándar, n=6 – 12.

<sup>γ</sup> Valores medios de Ct ± desviación estándar, n=6 – 12.

<sup>δ</sup> Frecuencia de detección: no. de muestras positivas/ no. de muestras analizadas.

Además, obtuvieron una sensibilidad de 5 – 10 células en 25 ml de muestra analizada, dependiente de la matriz utilizada, siendo menos sensible en leche cruda que en leche pasteurizada, y una alta correlación con el método de referencia (PN EN ISO 11290-1, 1999). Sewell *et al.* (2003), analizaron 324 muestras alimentarias contaminadas naturalmente obtuvieron resultados confiables después de 52 h de incubación, con una

sensibilidad de 98,1%, una especificidad de 97%, y una eficiencia del 97%, con un 1,9% y 2,3% de resultados falsos negativos y falsos positivos, respectivamente.

### 2.2.5. Degradación de ADN en superficies

En la **Tabla 21** y **Tabla 22**, para ambos microorganismos a 0 h de pre-enriquecimiento durante los distintos tiempos de exposición a sequedad, los recuentos de células viables en TSAYE (recuperadas en TSBYE-T80) no mostraron una correlación lineal significativa ( $P > 0,05$ ) con los valores de Ct. Mientras que *L. monocytogenes* recuperada en DFraser-T80 (**Tabla 22**), si presentó correlación lineal ( $R^2=0,9189$ ,  $P < 0,05$ ). Sin embargo, los valores de Ct no mostraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) a los distintos tiempos de sequedad, permaneciendo constantes. Estos resultados descartan la degradación de ADN a lo largo del tiempo, debida a las condiciones de estudio (sequedad con flujo laminar durante 72 h) o por ADNasas internas de las bacterias muertas (Nogva *et al.*, 2000).

Aunque el mayor obstáculo de la amplificación de los ácidos nucleicos en los sistemas actuales es la separación de los microorganismos vivos y muertos, la mayoría de los sistemas de descontaminación y técnicas de preservación en la industria alimentaria están enfocadas a inactivar o eliminar patógenos potenciales. Genralmente, se asume que la molécula de ADN persiste después de que la bacteria ha muerto (Nogva *et al.*, 2000). Sin embargo, la habilidad de los ácidos nucleicos de generar señal de PCR a partir de células de muertas es afectada, tanto por el tratamiento utilizado como por los propios microorganismos. Las ADNasas bacterianas intrínsecas pueden reducir la vida media del ADN (Herman, 1997). Por esto es necesario conocer la estabilidad de los ácidos nucleicos ante diversas condiciones y así poder interpretar la señal generada de PCR es debida a patógenos vivos o muertos.

### 3. Comparación de la PCR en tiempo real y el método de cultivo convencional en la detección de *Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes* a partir de superficies no porosas de acero inoxidable

#### 3.1. Material y métodos

##### 3.1.1. Plan de trabajo

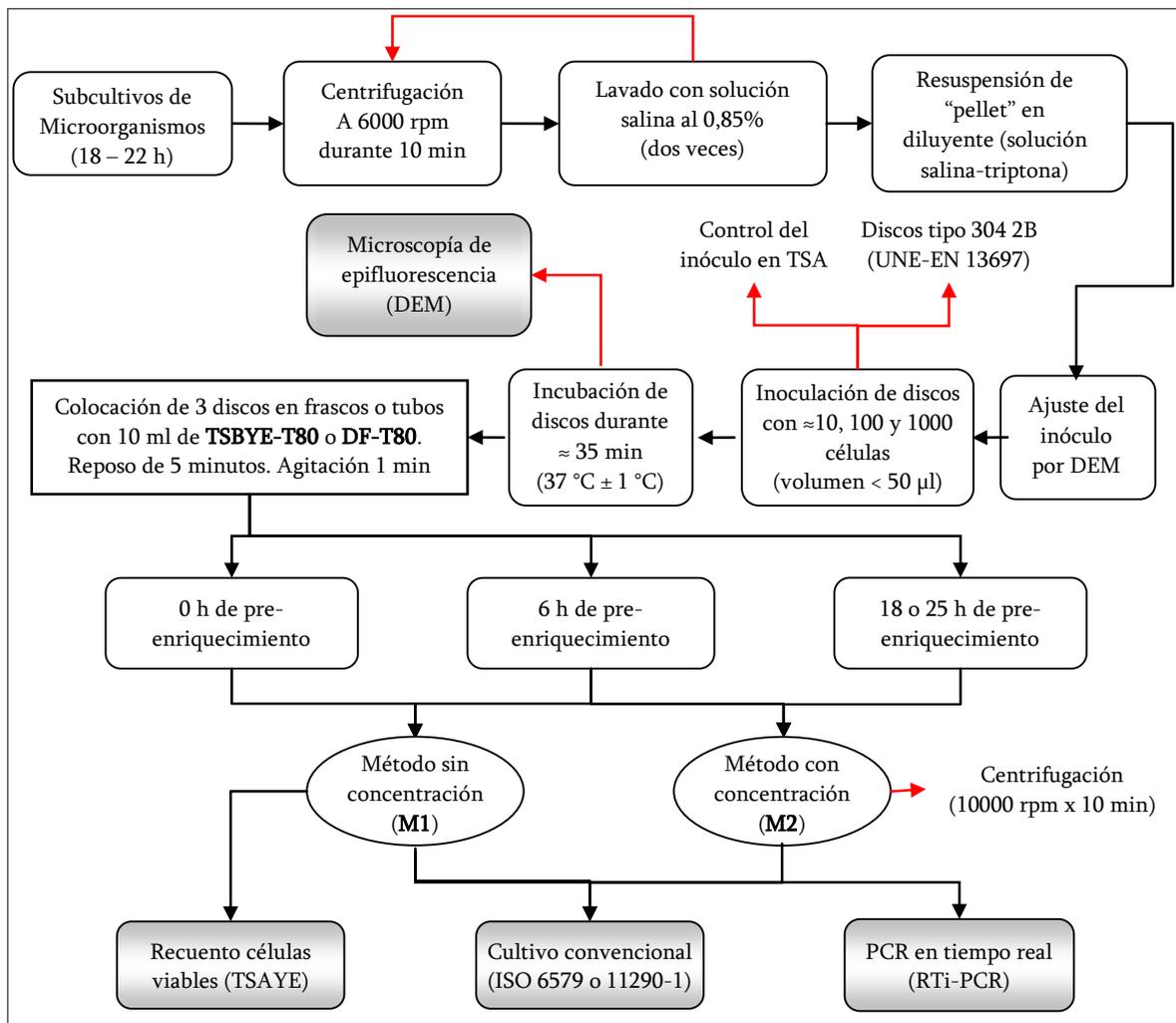


Figura 24. Esquema del plan de trabajo del experimento 3 (sección V).

TSBYE-T80= caldo triptona soja con extracto de levadura adicionado con Tween 80 (0,1% p/v).

DFraser-T80= caldo Demi Fraser adicionado con Tween 80 (0,1% p/v).

La Figura 24 muestra el plan de trabajo para evaluar la sensibilidad y eficacia de la PCR en tiempo real vs. el método de cultivo convencional (ISO) para detectar *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* a partir de superficies no porosas de acero inoxidable contaminadas

artificialmente con inóculos conteniendo un número bajo de células. La evaluación de ambos métodos se realizó a diferentes tiempos de pre-enriquecimiento e incluyendo un protocolo de concentración. Este experimento nos permitió observar los límites de detección de la PCR en tiempo real a partir de superficies de acero inoxidable para los microorganismos de estudio.

### **3.1.2. Cepas bacterianas y preparación de la suspensión bacteriana**

Las cepas bacterianas (*S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*) fueron revivificadas para la obtención de subcultivos en fase estacionaria (**sección V 1.1.2.**). Los subcultivos fueron centrifugados a 6000 rpm por 10 min, siendo lavados dos veces con solución salina (8,5 g/l de cloruro de sodio) y finalmente resuspendidos en 8,5 ml de solución salina-triptona, para obtener una suspensión bacteriana con una concentración aproximada de  $10^8$  unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml). La concentración del subcultivo fue determinada por recuento microscópico, mediante DEM (**sección IV 1.4.6.**). A partir de esta suspensión se realizaron diluciones decimales en solución salina-triptona para inocular las superficies de trabajo con volúmenes menores a 50  $\mu$ l.

### **3.1.3. Inoculación de las superficies de trabajo**

Como soporte se emplearon discos de acero inoxidable (**sección V 2.1.3.**). Para ambos microorganismos, los discos fueron inoculados en el centro de la superficie con 10, 100 y 1000 células, paralelamente se llevó un control de los inóculos de cada concentración sembrando en diez placas de TSA (Becton Dickinson).

### **3.1.4. Condición de estrés**

Los discos inoculados fueron colocados a 37 °C, por no más de 60 min, para permitir el secado y adhesión de los microorganismos a la superficie, simulando las condiciones de las superficies en situaciones prácticas de aplicación (Anónimo, 2002). Al finalizar el tiempo de secado se eligió al azar un disco de cada concentración y se aplicó la tinción vital

LIVE/DEAD para verificar la presencia y observar la vitalidad de las células; a los demás discos se les aplicó un proceso de pre-enriquecimiento.

### 3.1.5. *Procedimiento de pre-enriquecimiento*

Para cada microorganismo, se tomaron tres discos de la misma concentración y fueron colocados en frascos y tubos de centrifuga de 50 ml con 10 ml de caldo de pre-enriquecimiento, TSBYE-T80 para *S. Typhimurium* y caldo DFraser-T80 para *L. monocytogenes*. El procedimiento de pre-enriquecimiento se llevó a cabo bajo las mismas condiciones descritas en la **sección V 2.1.6**. Además, la toma de alícuotas se realizó a los mismos tiempos de pre-enriquecimiento, a las 0, 6 y 18 h para *S. Typhimurium* y a las 0, 6 y 25 h para *L. monocytogenes*.

### 3.1.6. *Recuperación de microorganismos*

Se utilizaron dos procedimientos de recuperación, un método sin concentración (**M1**) y otro concentrando las muestras (**M2**). Para **M1** se utilizaron frascos y se procedió como se describió en la **sección V 3.1.5**. Mientras tanto en **M2** se usaron tubos de centrifuga y se procedió igualmente que en **M1**. Sin embargo, antes de la toma de las alícuotas se realizó la concentración; para ello, primeramente los discos fueron retirados, previo lavado con 10 ml de solución tampón salino fosfato (PBS; cloruro de sodio 8,0 g/l, cloruro de potasio 0,2 g/l, fosfato bisódico 1,15 g/l, fosfato monopotásico 0,2 g/l; pH 7,3). Los discos lavados con PBS fueron sembrados en TSAYE para observar la eficiencia del desprendimiento de las bacterias adheridas a las superficies de ensayo.

A continuación, los tubos fueron centrifugados a 10000 rpm durante 5 min. Los sobrenadantes fueron descartados y los “pellets” fueron resuspendidos con 3 ml y 3,5 ml del caldo de pre-enriquecimiento para *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*, respectivamente. Posteriormente, se realizó la detección de los microorganismos.

### 3.1.7. *Métodos de detección de microorganismos*

#### 3.1.7.1. Recuento de células viables en TSAYE

El recuento de células viables se determinó a partir de TSBYE-T80 y DFraser-T80 como se describió en la **sección V 2.1.7.2.**

#### 3.1.7.2. Método de cultivo convencional

Para *S. Typhimurium*, de acuerdo al método UNE-EN ISO 6579 (Anónimo, 2003), una alícuota de 0,1 ml de TSBYE-T80 fue inoculada a 10 ml de caldo de enriquecimiento selectivo Rappaport-Vassiliadis (RV; bioMérieux®, Francia) e incubado a 42 °C por 24 h. Después, fueron estriadas placas de agar SM ID 2 (bioMérieux®, Francia) e incubadas a 37 °C por 24 – 48 h. Para *L. monocytogenes*, según el método UNE-EN ISO 11290-1 (Anónimo, 1997c; Anónimo, 2005), una alícuota de 0,1 ml de DFraser-T80 fue inoculada a 10 ml de caldo de enriquecimiento selectivo Fraser (bioMérieux®, Francia) e incubada a 37 °C durante 48 h. Ambos caldos, DFraser-T80 y Fraser, fueron estriados en placas de agar PALCAM (bioMérieux®, Francia) y agar ALOA (AES, Francia) e incubadas a 37 °C por 24 – 48 h.

#### 3.1.7.3. PCR en tiempo real

Los análisis de la RTi-PCR (descritos en la **sección V 1.1.4.**) fueron realizados a partir de alícuotas de 1,0 ml de TSBYE-T80 para *S. Typhimurium* y 1,5 ml de DFraser-T80, para *L. monocytogenes*.

### 3.1.8. *Análisis estadístico*

En total se realizaron tres réplicas en diferentes días. Las muestras se efectuaron por cuadruplicado en cada réplica. Los recuentos de células viables en TSAYE se expresaron en unidades logarítmicas (base 10). Para cada microorganismo (*S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*), procedimiento de recuperación (M1 y M2) y niveles de contaminación (30, 300 y 3000 UFC) se compararon los recuentos en TSAYE y los valores de Ct entre los tiempos de enriquecimiento (0, 6 y 18 o 25 h). La comparación global de medias se realizó utilizando el análisis de la varianza y para determinar si existían diferencias significativas

entre las medias se utilizó la prueba de Student-Newman-Keuls (SNK); ambas pruebas con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . Se realizó el análisis de regresión para la comparación entre el recuento de células viables y el valor de Ct, con la finalidad de conocer su relación. Los análisis estadísticos mencionados anteriormente y el cálculo de las frecuencias de aparición de las muestras, positivas y negativas, para el método de cultivo convencional y la RTi-PCR se realizaron con el programa SAS (SAS Institute, Inc.).

## 3.2. Resultados y discusión

### 3.2.1. Efecto de la condición de estrés

En las muestras contaminadas naturalmente, los microorganismos con frecuencia son dañados subletalmente y no tienen el mismo estado fisiológico que cuando crecen en un cultivo puro bajo condiciones de laboratorio (Fakhr *et al.*, 2006). Por lo tanto, la sensibilidad de los métodos evaluados sólo con muestras contaminadas artificialmente pueden dar resultados sobreestimados (Notzon *et al.*, 2006). En este estudio se consideró este aspecto estresando a los microorganismos con sequedad, que es una condición similar de las superficies en situaciones prácticas de aplicación. El tiempo máximo requerido para la desecación fue de 35 min aproximadamente a 37 °C. Cuando se aplicó la tinción LIVE/DEAD BacLigth para verificar la vitalidad de las bacterias después del proceso de desecación se observó que la mayoría de las células estaban muertas o lesionadas. Al comparar los recuentos de células viables en TSAYE de los microorganismos inoculados en los discos, antes y después de la desecación, se observó una reducción significativa ( $P < 0,05$ ) aproximadamente a una unidad logarítmica para todos los niveles de contaminación (10, 100 y 1000 células), tanto en *S. Typhimurium* como en *L. monocytogenes* (datos no mostrados). Fuster-Valls *et al.* (2007) realizaron un estudio del efecto de diferentes condiciones ambientales sobre la supervivencia bacteriana en superficies de acero inoxidable y observaron que la exposición a sequedad (secado lento a 22 °C) influyó negativamente sobre la supervivencia de los microorganismos, reduciendo considerablemente los recuentos bacterianos (células viables en PCA y DEM).

### 3.2.2. Efecto del medio de pre-enriquecimiento

Cabe mencionar que en el caso de *L. monocytogenes* se usó DFraser-T80 y además TSBYE-T80 para determinar la carga total a los distintos tiempos de pre-enriquecimiento. Los recuentos de células viables en TSAYE, obtenidos para ambos caldos, fueron comparados y se observó que el desarrollo del microorganismo en TSBYE-T80 fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) en 1,66 unidades logarítmicas. Esta observación coincide con el estudio de (Budu-Amoako *et al.*, 1992), donde encontraron que la recuperación de células de *L.*

*monocytogenes* lesionadas subletalmente fue suprimida cuando utilizaron un caldo de enriquecimiento selectivo, como el caldo de enriquecimiento *Listeria* (LEB); sin embargo, cuando usaron un medio no selectivo, como el caldo TSBYE, éstas se recuperaron completamente dentro de las 6 – 8 h. Por lo mencionado anteriormente, recomendaron un enriquecimiento primario no selectivo durante este tiempo antes de la adición de los componentes selectivos que suprimen la flora acompañante. No obstante, Silk *et al.* (2002) evaluaron la cinética de crecimiento de *L. monocytogenes* a partir de células lesionadas subletalmente y no apreciaron demasiadas diferencias significativas al usar medios de enriquecimientos selectivos y no selectivos.

### **3.2.3. Recuperación de microorganismos**

Los discos lavados con PBS y sembrados en TSAYE para observar la eficacia del desprendimiento de las bacterias adheridas a las superficies de ensayo (procedimiento de recuperación **M2**), no mostraron recuento alguno en las muestras de 0 h y 6 h de pre-enriquecimiento para ambos microorganismos. Sin embargo, al tiempo máximo de pre-enriquecimiento (18 o 25 h) si se obtuvieron recuentos de 3 y 0,47 unidades logarítmicas para *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*, respectivamente, debido al incremento del número de microorganismos en el cultivo y por consecuencia al lavado insuficiente con 10 ml de PBS.

### **3.2.4. Comparación de la RTi-PCR vs. el método de cultivo convencional (ISO)**

Cuando Notzon *et al.* (2006) evaluaron la sensibilidad de la RTi-PCR usando como referencia el método de cultivo convencional, consideraron falsos positivos aquellos resultados que sólo fueron detectados por la RTi-PCR, a pesar de que las muestras fueron inoculadas. No obstante, en una muestra pueden estar presentes bacterias viables, pero en estado VBNC, que sólo pueden ser detectadas por la RTi-PCR haciéndola más sensible que el método de cultivo convencional (Seo *et al.*, 2006).

### 3.2.4.1. Sensibilidad de la RTi-PCR para *S. Typhimurium*

La detección de un número bajo de células de salmonela es importante puesto que la evidencia epidemiológica sugiere que la dosis infectiva puede estar en el rango de 10 a 100 células (Bhagwat, 2003). Los niveles de contaminación evaluados fueron 30, 300 y 3000 UFC/10 cm<sup>2</sup> (correspondiente a 3 discos). En la **Tabla 23** se muestran los resultados de la comparación del método de cultivo convencional y la RTi-PCR en la detección de *S. Typhimurium* a partir de superficies no porosas de acero inoxidable con diferentes niveles de contaminación a distintos tiempos de pre-enriquecimiento. El límite de detección práctico de la RTi-PCR con el **M1** fue 30 UFC/cm<sup>2</sup> sin pre-enriquecimiento y fue reducido a 3 UFC/cm<sup>2</sup> después 18 h de pre-enriquecimiento. Por otro lado, con el **M2** fue 30 UFC/cm<sup>2</sup> sin pre-enriquecimiento y 3 UFC/cm<sup>2</sup> con 6 h de pre-enriquecimiento. Aunque no se observaron diferencias de los límites de detección sin pre-enriquecimiento entre **M1** y **M2**, si se logró reducir el tiempo para la detección de 3 UFC/cm<sup>2</sup> con el **M2**.

Los límites de detección previamente reportados para *Salmonella* por RTi-PCR, aunque no en superficies, sino en diferentes matrices de alimentos y muestras ambientales, contaminados artificialmente y naturalmente, son comparables a nuestros resultados (Uyttendaele *et al.*, 2003; Bhagwat, 2004; Nam *et al.*, 2005). Ellingson *et al.* (2004) indicaron un límite de detección para *S. Abaetuba* de 1 UFC/ml después de 6 h de incubación y con un paso de concentración por centrifugación, en alimentos de carne preparados. Liming y Bhagwat (2004) alcanzaron un límite de detección de 4 UFC/25 g para *S. Typhimurium* en frutas y vegetales después de 16 horas de pre-enriquecimiento. Por RTi-PCR, todas las muestras con un nivel de contaminación de 300 UFC/10 cm<sup>2</sup> mostraron resultados positivos sin pre-enriquecimiento; sin embargo, las muestras con 30 UFC/10 cm<sup>2</sup> requirieron de pre-enriquecimiento para dar resultados positivos (**Tabla 23**).

Myint *et al.* (2006) en un estudio sobre la evaluación del tiempo mínimo de pre-enriquecimiento para la detección de *Salmonella* en muestras de pollo crudo contaminadas naturalmente por RTi-PCR, observaron que se necesitó un mínimo de 8 h para detectarla en algunas muestras, no obstante para ser detectada en todas las muestras se requirió de 18 h.

**Tabla 23.** Comparación del método de cultivo convencional (ISO 6579) y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RTi-PCR) en la detección de *S. Typhimurium* a partir de superficies no porosas de acero inoxidable con diferentes niveles de contaminación a distintos tiempos de pre-enriquecimiento y por dos métodos de recuperación.

Método de recuperación $\alpha$	Nivel de contaminación (UFC/10 cm <sup>2</sup> ) $\beta$	Tiempo de pre-enriquecimiento (h)	TSAYE $\gamma$ (log <sub>10</sub> UFC/ml)	Ct $\delta$ (Threshold cycle)	Frecuencia de detección $\epsilon$	
					ISO 6579	RTi-PCR
M1	30	0	0,05 ± 0,12	38,50 ± 1,31	0/6	5/6
		6	1,08 ± 1,05	37,68 ± 0,57	3/6	2/6
		18	8,85 ± 0,46	15,21 ± 0,73	4/6	6/6
	300	0	0,78 ± 0,31	36,34 ± 0,66	2/6	6/6
		6	3,68 ± 0,47	30,73 ± 1,94	6/6	6/6
		18	8,97 ± 0,24	15,51 ± 0,49	6/6	6/6
	3000	0	1,56 ± 0,30	33,30 ± 0,36	4/6	6/6
		6	4,37 ± 0,44	28,25 ± 0,83	6/6	6/6
		18	9,03 ± 0,20	14,79 ± 0,69	6/6	6/6
M2	30	0	---	36,78 ± 2,29	0/6	5/6
		6	---	36,25 ± 1,56	6/6	6/6
		18	---	13,63 ± 0,45	4/6	6/6
	300	0	---	34,01 ± 2,96	3/6	6/6
		6	---	31,18 ± 1,13	6/6	6/6
		18	---	13,96 ± 0,33	6/6	6/6
	30000	0	---	32,45 ± 0,45	4/6	6/6
		6	---	29,91 ± 1,04	6/6	6/6
		18	---	13,86 ± 0,07	6/6	6/6

$\alpha$  M1=método sin concentrar y M2 método con concentración.

$\beta$  Nivel contaminación total en la superficie analizada correspondiente a tres discos.

$\gamma$  Valores medios del recuento de células viables ± desviación estándar, n=6.

$\delta$  Valores medios de Ct ± desviación estándar, n=6.

$\epsilon$  No. de muestras positivas/ no. de muestras analizadas.

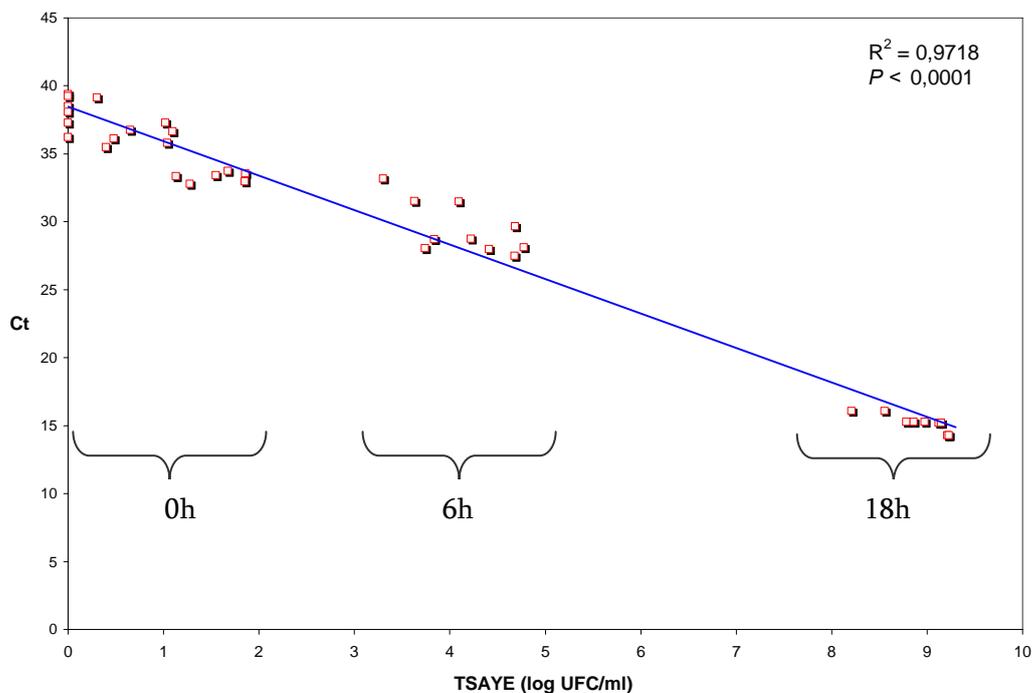
Además, Notzon *et al.* (2006) indicaron que 6 h de pre-enriquecimiento en agua peptona tamponada fueron suficientes para detectar a *Salmonella* en niveles de 10 – 100 UFC/25 g de muestras de carne contaminadas artificialmente usando la combinación de IMS y RTi-PCR.

#### 3.2.4.2. Comparación de RTi-PCR y cultivo convencional para *S. Typhimurium*

Como se muestra en la **Tabla 23**, la RTi-PCR para la detección de salmonela fue más sensible que el método de cultivo convencional. Debido a que los resultados obtenidos por el método

de cultivo convencional fueron inconsistentemente positivos en muestras sin pre-enriquecimiento para todos los niveles de contaminación y fue necesario un periodo de enriquecimiento mínimo de 6 h para que todas las muestras con 300 UFC/10 cm<sup>2</sup> dieran resultados positivos. Esta observación concuerda con publicaciones de otros autores, donde describieron que la PCR tiene igual o mayor sensibilidad que el método de cultivo (Uyttendaele *et al.*, 2003; Ellingson *et al.*, 2004; Seo *et al.*, 2004; Fakhr *et al.*, 2006).

En la **Tabla 23** también se observa que el recuento de células viables en todas las muestras alcanzaron más de 4 unidades logarítmicas después de 6 h de pre-enriquecimiento, excepto para el menor nivel; mientras que, después de 18 h de pre-enriquecimiento todos alcanzaron más de 7 unidades logarítmicas. Además, al aplicar el **M1**, se observó que los valores de Ct disminuyeron linealmente con el incremento de los recuentos de las células viables, con un alto coeficiente de determinación (**Figura 25**). Esto indica que la recuperación y desarrollo de *S. Typhimurium* se incrementó con el tiempo de pre-enriquecimiento correctamente, como era de esperarse puesto que a mayor cantidad de ADN diana en la muestra los valores de Ct son inversamente proporcionales (Berrada *et al.*, 2006).



**Figura 25.** Regresión lineal entre los recuentos de células viables en TSAYE y los valores de Ct obtenidos para *S. Typhimurium* CCUG 29478 detectada a partir de superficies no porosas de acero inoxidable.

### 3.2.4.3. Sensibilidad de la RTi-PCR para *L. monocytogenes*

La detección de bajos niveles de *L. monocytogenes* es importante a pesar de tener una aparente alta dosis infectiva ( $10^3$  UFC/g, frecuentemente), porque la contaminación inicial con números bajos puede ser potencialmente peligrosa por su habilidad para crecer a bajas temperaturas (Bhagwat, 2003).

En la **Tabla 24** se muestran los resultados de la comparación del método de cultivo convencional y la RTi-PCR en la detección de *L. monocytogenes* a partir de superficies no porosas de acero inoxidable con diferentes niveles de contaminación a distintos tiempos de pre-enriquecimiento. El límite de detección práctico de la RTi-PCR con el **M1** fue 30 UFC/cm<sup>2</sup> sin pre-enriquecimiento. Por otro lado, con el **M2** se obtuvieron resultados inconsistentemente positivos para todos los niveles de contaminación. Por consiguiente, no se pudo establecer un límite de detección práctico para este método de recuperación.

De la misma manera que para *Salmonella*, no existen investigaciones sobre el límite de detección para *L. monocytogenes* en superficies; sin embargo, si existen numerosos estudios en muestras de alimentos. Los límites de detección reportados por otros autores varían ampliamente de acuerdo al tipo de muestra, indicando valores desde 1 – 1000 UFC por gramo o mililitro de alimento después del pre-enriquecimiento (Bhagwat, 2003; Rossmannith *et al.*, 2006).

Liming *et al.* (2004) indicó un límite de detección de 4 – 7 UFC/25 g de ensalada mixta con un enriquecimiento de 25 h utilizando el protocolo iQ-Check; sin embargo, las células inoculadas no fueron sometidas a ningún proceso de estrés y además, la muestra fue procesada dentro de los diez minutos posteriores a la inoculación. Estudios de Aznar y Alarcón (2003) donde compararon la detección de *L. monocytogenes* por PCR, usando muestras de carne contaminadas artificialmente sin pre-enriquecimiento y con pre-enriquecimiento, observando que los resultados obtenidos a partir de muestras sin enriquecimiento no son reproducibles.

**Tabla 24.** Comparación del método de cultivo convencional (ISO 11290-1) y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RTi-PCR) en la detección de *L. monocytogenes* a partir de superficies no porosas de acero inoxidable con diferentes niveles de contaminación a distintos tiempos de pre-enriquecimiento y por dos métodos de recuperación.

Método de recuperación <sup>α</sup>	Nivel de contaminación <sup>β</sup> (UFC/10 cm <sup>2</sup> )	Tiempo de pre-enriquecimiento (h)	TSAYE <sup>γ</sup> (log <sub>10</sub> UFC/ml)	Ct <sup>δ</sup> (Threshold cycle)	Frecuencia de detección <sup>ε</sup>	
					ISO 11290	RTi-PCR
M1	30	0	< LD <sup>φ</sup>	40,27 ± 1,34	0/6	5/6
		6	< LD <sup>φ</sup>	39,99 ± 0,61	0/6	5/6
		25	< LD <sup>φ</sup>	40,06 ± 0,93	0/6	4/6
	300	0	0,23 ± 0,36	36,24 ± 1,56	0/6	6/6
		6	0,39 ± 0,61	36,96 ± 0,54	1/6	6/6
		25	2,48 ± 2,86	31,42 ± 6,61	3/6	6/6
	3000	0	0,30 ± 0,27	33,52 ± 0,66	0/6	6/6
		6	0,23 ± 0,27	33,82 ± 1,07	0/6	6/6
		25	3,45 ± 2,03	24,58 ± 1,88	5/6	6/6
M2	30	0	---	37,48 ± 1,91	1/6	6/6
		6	---	39,03 ± 1,47	1/6	6/6
		25	---	38,80 ± 0,78	0/6	5/6
	300	0	---	36,47 ± 0,79	0/6	6/6
		6	---	36,18 ± 0,91	0/6	6/6
		25	---	32,02 ± 6,03	2/6	6/6
	30000	0	---	31,89 ± 1,91	2/6	6/6
		6	---	33,27 ± 0,95	1/6	5/6
		25	---	31,69 ± 6,85	4/6	5/6

<sup>α</sup> M1=método sin concentrar y M2= método con concentración.

<sup>β</sup> Nivel contaminación total en la superficie analizada correspondiente a tres discos.

<sup>γ</sup> Valores medios del recuento de células viables ± desviación estándar, n=6.

<sup>δ</sup> Valores medios de Ct ± desviación estándar, n=6.

<sup>ε</sup> No. de muestras positivas/ no. de muestras analizadas.

<sup>φ</sup> Inferior al límite detectado.

#### 3.2.4.4. Comparación de la RTi-PCR y el cultivo convencional para *L. monocytogenes*

Como se muestra en la **Tabla 24**, la RTi-PCR para la detección de *L. monocytogenes* fue más sensible que el método de cultivo convencional. Debido a que el método de cultivo mostró resultados inconsistentemente positivos en todos los tiempos de pre-enriquecimiento. Esta observación concuerda con el estudio de Aznar y Alarcón (2003) donde consiguieron una mayor detección de muestras positivas por PCR que por cultivo.

Por el método de cultivo no fue posible obtener resultados que fueran consistentemente positivos, debido a que posiblemente el caldo de pre-enriquecimiento (DFraser-T80) suprimió la recuperación de las células que fueron lesionadas subletalmente durante el secado (**Tabla 24**). Lo anterior se deduce porque al aplicar el **M1**, los recuentos de células viables en TSAYE no mostraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los diferentes tiempos de pre-enriquecimiento, exceptuando en el nivel de mayor contaminación (3000 UFC/10 cm<sup>2</sup>) con el máximo tiempo de pre-enriquecimiento (25 h). Además, se observó una baja relación lineal entre los valores de Ct y los recuentos de células viables en TSAYE ( $R^2 = 0,5755$ ,  $P < 0,0001$ ). Las muestras con 0 h y 6 h de pre-enriquecimiento mostraron una mayor dispersión con respecto a las muestras de 25 h, donde los valores se observaron mayormente relacionados con los recuentos de células viables. Por lo tanto, se demuestra que el medio de enriquecimiento no selectivo es fundamental, influyendo notablemente en la sensibilidad de los métodos de detección e incrementando la probabilidad de recuperar células lesionadas (Nam *et al.*, 2005).

#### 4. Discusión general

La importancia de que ambos patógenos estudiados puedan permanecer viables sobre las superficies secas de acero inoxidable y presenten un riesgo potencial de recontaminación debe ser resaltada. La capacidad de *Salmonella* spp. para formar biofilms a temperatura ambiente es de interés particular para la industria alimentaria, enfatizando la necesidad de una limpieza regular y adecuada (Stepanovic *et al.*, 2003). *L. monocytogenes* puede introducirse al ambiente alimentario y adherirse a las superficies, multiplicarse a niveles elevados aún a bajas temperaturas, incrementado así el riesgo de contaminación cruzada con los productos alimentarios (Norwood y Gilmour, 2001). Con respecto a *S. Typhimurium*, hay numerosos estudios que demuestran la habilidad de la bacteria para sobrevivir sobre las superficies de contacto alimentarias y la contaminación cruzada al contacto de las mismas, aún después de largos periodos de tiempo sobre superficies secas (Dawson *et al.*, 2007). En el caso de *L. monocytogenes* igualmente existen muchos estudios acerca de la supervivencia sobre equipos de procesado (Ej. máquinas de corte) que actúan como fuentes potenciales de contaminación. Siendo el ambiente de una planta de procesado la mayor fuente de contaminación a productos terminados, aún mas que las materias primas (Samelis y Metaxopoulos, 1999; Lin *et al.*, 2006).

En teoría, actualmente los métodos estándares para la detección de patógenos son capaces de detectar tan sólo una célula viable después de las etapas de pre-enriquecimiento y enriquecimiento selectivo (Patel *et al.*, 2006). Sin embargo, cuando los patógenos son sometidos una condición de estrés, como la sequedad, dependiendo de la temperatura y carga inicial del patógeno, e incluso de la presencia de algún microorganismo alterante, todos esos factores en conjunto pueden interferir en la sensibilidad del método utilizado y a la vez resultar inefectivo para la detección. Aunque la detección de células muertas o lesionadas es una desventaja inherente de los sistemas basados en la amplificación de ADN, así como la PCR y la RTi-PCR, estas tecnologías pueden ser herramientas valiosas para estimar el nivel de contaminación durante el procesado de alimentos, debido a que los resultados son más precisos con respecto a la identificación y cuantificación de patógenos

(Herman, 1997; Seo *et al.*, 2006). No obstante, la RTi-PCR con esta desventaja conlleva un riesgo de presentar resultados falsos positivos. A pesar de ello, es necesario considerar que las señales de PCR falsas positivas, pueden ocurrir dependiendo de la carga inicial del patógeno y del tiempo que transcurre entre la muerte bacteriana y el análisis (Wolffs *et al.*, 2005). Sin embargo, para valorar el riesgo de resultados falsos positivos por células muertas, debe ser considerada la degradación de ADN libre que pudiera ser liberado de las células muertas. Cuando la tasa de degradación de ADN es rápida minimiza el riesgo de un falso positivo; sin embargo, cuando ocurre una liberación parcial de ADN o es protegido por las células muertas, el riesgo es mayor (Wolffs *et al.*, 2005).

En el experimento 2, la RTi-PCR resultó ser más sensible que el sistema VIDAS para la detección de los patógenos estudiados a partir de la formación de los biofilms en condiciones de humedad relativa elevada y sometidos posteriormente a una condición de estrés por sequedad con flujo laminar. La disminución de los recuentos de células viables con valores de Ct constantes durante las 72 h de sequedad, sugieren que no existió degradación del ADN y que la sobreestimación del valor de Ct fue causada por la presencia de las células muertas o lesionadas subletalmente. Sin embargo, para comprobar que no existe una degradación real de ADN, debería realizarse un estudio referente a la degradación de su ADN purificado bajo las mismas condiciones, para descartar algún tipo de protección del ADN por la célula muerta o por la protección de la matriz exopolisacárida del biofilm.

Por otro parte, la aplicación de la RTi-PCR después del enriquecimiento ofrece algunas ventajas: i) el incremento de la cantidad de secuencias diana, ii) la dilución del ADN de la flora acompañante, y iii) la dilución de componentes que interfieren con la RTi-PCR (Seo *et al.*, 2006). Existen estudios que han demostrado que un enriquecimiento de las muestras mejora el límite de detección de la RTi-PCR (Bhagwat, 2003; Nam *et al.*, 2005; Seo *et al.*, 2006).

Sin embargo, cuando las células son expuestas a estrés, un periodo de enriquecimiento corto puede disminuir la sensibilidad del ensayo de PCR (Uyttendaele *et al.*, 2003). A pesar de

ello, la PCR es más sensible que los métodos convencionales debido a que: i) los microorganismos pueden presentar perfiles atípicos no detectados por cultivo, ii) las células muertas o dañadas subletalmente pueden ser no cultivables, y iii) el crecimiento de las células diana puede ser inhibido por la presencia de otras bacterias que puedan competir con el patógeno durante el enriquecimiento (Patel *et al.*, 2006). Por lo tanto, la habilidad de la RTi-PCR para detectar células VBNC sobre una superficie es una consideración significativa, debido a que ciertos microorganismos no cultivables, pero activos, pueden permanecer aún viables y ciertas bacterias patógenas con la capacidad de reparar el daño ocasionado por los factores ambientales pueden mantenerse en estado potencialmente infeccioso (Seo *et al.*, 2006; Buttner *et al.*, 2007).

En el experimento 3, ambos microorganismos con la RTi-PCR presentaron mejores límites de detección prácticos con respecto al método de cultivo convencional (ISO). Resultados similares fueron observados por otros autores cuando evaluaron diferentes tipos de superficies usando PCR cuantitativa y cultivo (Buttner *et al.*, 2001; Buttner *et al.*, 2007). Si consideramos el tiempo de pre-enriquecimiento máximo y el desarrollo del análisis al usar la RTi-PCR, el tiempo requerido para el análisis fue de 21 y 28 h para *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes*, respectivamente. No obstante, si prescindimos del tiempo de pre-enriquecimiento para detectar la presencia de patógenos en superficies, sin importar su estado vital, el tiempo de análisis se reduciría notablemente. Una aplicación podría ser después de la aplicación de un programa de higienización a nivel industrial, donde generalmente los microorganismos pueden permanecer estresados en superficies y no ser detectados mediante métodos de cultivo tradicionales.

En nuestros estudios la detección de los patógenos se realizó sobre superficies limpias; por lo tanto, se necesitarían estudios adicionales para evaluar el límite de detección en superficies con sustancias interferentes que simulen la presencia de residuos alimentarios o desinfectantes, o en su defecto la realización de pruebas de campo.

## VI. Conclusiones



1. En la evaluación de metodologías, el recuento por microscopía de epifluorescencia directa (R-DEM) es la metodología que manifiesta mayores recuentos y la más restrictiva en ambas instalaciones estudiadas.
2. La siembra del disco y la detección de ATP son las metodologías que seguidamente detectan mayores niveles de contaminación en la industria de alimentos deshidratados; mientras que el cultivo convencional y la detección de ATP lo son en el supermercado.
3. La placa de contacto Petrifilm es equivalente al uso del método de cultivo convencional en las superficies de acero inoxidable de la industria de alimentos deshidratados. Por lo tanto, ofrece una buena alternativa para el control microbiológico. La detección de ATP es recomendable para la evaluación de la contaminación total (microbiana, residuos alimentarios y células de origen somático) de las superficies del supermercado.
4. Los límites críticos en función del recuento por cultivo convencional, como método de referencia, permiten estandarizar y establecer límites críticos para otras metodologías cuando son evaluadas en conjunto.
5. La contaminación de las superficies del supermercado, contrariamente a la industria de alimentos deshidratados, es más heterogénea y dependiente de diversos factores, como las secciones de trabajo y la temperatura de conservación de acuerdo al tipo de producto manipulado.
6. En la industria de alimentos deshidratados, los niveles de contaminación encontrados demuestran que el programa de higienización aplicado se lleva a cabo de una forma regular y aceptable, mientras en el supermercado, el programa de higienización es mejorable. El nivel global de contaminación es mayor en el supermercado que en la industria de alimentos deshidratados, siendo dependiente del medio ambiente y del protocolo de higienización utilizado.
7. La ausencia de los patógenos estudiados y el recuento de enterobacterias bajo en el supermercado, indican que el medio ambiente y las superficies de contacto con los productos no implican un riesgo higiénico-sanitario considerable para los consumidores.
8. En la adaptación de la PCR en tiempo real, la sensibilidad y eficacia de los kits iQCheck *Salmonella* e iQCheck *Listeria monocytogenes* no se altera al utilizar caldo de

soja triptona con 6 g/l de extracto de levadura (TSBYE) y Demi-Fraser (DemiF-T80), respectivamente, como medios de pre-enriquecimiento adicionados con 1 g/l de Tween 80 como dispersante bacteriano.

9. La RTi-PCR es más sensible que el método inmunoenzimático VIDAS para la detección de biofilms *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* desarrollados sobre superficies de acero inoxidable a humedad relativa elevada y después de la sequedad con flujo laminar.
10. La RTi-PCR es más sensible que el método de cultivo convencional (ISO) para la detección de un número bajo de *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* a partir de superficies de acero inoxidable. La detección es posible en muestras sin pre-enriquecimiento y a los diferentes tiempos de pre-enriquecimiento evaluados.
11. La adaptación de la PCR en tiempo real para la detección de patógenos (*Salmonella Typhimurium* y *L. monocytogenes*) en superficies no porosas de acero inoxidable con la metodología propuesta, es una alternativa válida al método de cultivo convencional (ISO).
12. El caldo Demi-Fraser adicionado con 1 g/l de Tween 80 (DFraser-T80) no permite una buena recuperación de las células de *L. monocytogenes* expuestas a sequedad, tanto con flujo laminar a  $29 \pm 1^\circ\text{C}$  como a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 minutos, comparado con el caldo triptona soja con 6 g/l de extracto de levadura y 1 g/l de Tween 80 (TSAYE-T80).
13. La concentración por centrifugación incrementa la sensibilidad de la RTi-PCR, sin embargo, es dependiente conjuntamente del microorganismo y del medio de pre-enriquecimiento utilizado para su recuperación.
14. El pre-enriquecimiento en la RTi-PCR es recomendable para evitar los falsos positivos derivados de células muertas y para asegurar la ausencia de falsos negativos debido a una concentración inicial de células muy baja. Sin embargo, la habilidad de la RTi-PCR para detectar células viables pero no cultivables debe examinarse con atención antes de considerar un falso positivo.

## VII. Referencias bibliográficas



- Ackers, M.L., Schoenfeld, S., Markman, J., Geoffrey, M., Nicholson, M.A., DeWitt, W., Cameron, D.N., Griffin, P.M., y Slutsker, L. **2000**. An Outbreak of *Yersinia enterocolitica* O:8 Infections Associated with Pasteurized Milk. *The Journal of Infectious Diseases*. 181:1834-1837.
- Afonina, I.A., Reed, M.W., Lusby, E., Shishkina, I.G., y Belousov, Y.S. **2002**. Minor groove binder-conjugated DNA probes for quantitative DNA detection by hybridization-triggered fluorescence. *BioTechniques*. 32(4):940-949.
- Allmann, M., Hofelein, C., Koppel, E., Luthy, J., Meyer, R., Niederhauser, C., Wegmuller, B., y Candrian, U. **1995**. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of pathogenic microorganisms in bacteriological monitoring of dairy products. *Research in Microbiology*. 146(1):85-97.
- Anónimo. **1989**. *Council Directive 89/437/EEC*. Of 20 June 1989 on hygiene and health problems affecting the production and the placing on the market of egg products. Official Journal of the European Communities, L 122.
- Anónimo. **1997a**. *Antisépticos y desinfectantes químicos*. Actividad bactericida básica. Método de ensayo y requisitos (fase 1). AENOR, UNE-EN 1040, 1-30.
- Anónimo. **1997b**. *Antisépticos y desinfectantes químicos*. Actividad fungicida básica. Método de ensayo y requisitos (fase 1). AENOR, UNE-EN 1275, 1-30.
- Anónimo. **1997c**. *Microbiología de los alimentos para el consumo humano y para animales*. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes*. Parte 1: Método de detección. AENOR, UNE EN-ISO 11290-1, 1-28.
- Anónimo. **1998a**. *Antisépticos y desinfectantes químicos*. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad bactericida de los antisépticos y desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios, en la industria, en el hogar y en colectividad. Método de ensayo y requisitos (fase 2/etapa 1). AENOR, UNE-EN 1276, 1-35.
- Anónimo. **1998b**. *Antisépticos y desinfectantes químicos*. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad fungicida de los antisépticos y desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios, en la industria, en el hogar y en colectividad. Método de ensayo y requisitos (fase 2/etapa 1). AENOR, UNE-EN 1650, 1-35.
- Anónimo. **2002**. *Antisépticos y desinfectantes químicos*. Ensayo cuantitativo de superficie no porosa para la evaluación de la actividad bactericida y/o fungicida de los desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios, en la industria, en el hogar y en colectividad. Método de ensayo sin acción mecánica y requisitos (fase 2/etapa 2). AENOR, UNE-EN 13697, 1-34.

- Anónimo. **2003**. *Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal*. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. AENOR, UNE-EN ISO 6579, 1-34.
- Anónimo. **2005**. *Microbiología de los alimentos para el consumo humano y para animales*. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes*. Parte 1: Método de detección. Modificación 1: Modificación del medio de aislamiento y de la prueba de la hemólisis e inclusión de los datos de precisión. AENOR, UNE EN-ISO 11290-1:1997/A1, 1-18.
- Aznar, R. y Alarcón, B. **2003**. PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. *Journal of Applied Microbiology*. 95(5):958-966.
- Bacon, R.T. y Sofos, J.N. **2003**. Characteristics of Biological Hazards in Foods. En *Food Safety Handbook*, ed. Schmidt y Rodrick. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, pp. 157-195.
- Bagge-Ravn, D., Gardshodn, K., Gram, L., y Vogel, B.F. **2003a**. Comparison of sodium hypochlorite-based foam and peroxyacetic acid-based fog sanitizing procedures in a salmon smokehouse: survival of the general microflora and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 66(4):592-598.
- Bagge-Ravn, D., Ng, Y., Hjelm, M., Christiansen, J.N., Johansen, C., y Gram, L. **2003b**. The microbial ecology of processing equipment in different fish industries--analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *International Journal of Food Microbiology*. 87(3):239-250.
- Beales, N. **2004**. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 3:1-20.
- Beresford, M.R., Andrew, P.W., y Shama, G. **2001**. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. *Journal of Applied Microbiology*. 90:1000-1005.
- Berrada, H., Soriano, J.M., Pico, Y., y Manes, J. **2006**. Quantification of *Listeria monocytogenes* in salads by real time quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 107(2):202-206.
- Beumer, R., Bloomfield, S.F., Exner, M., Fara, G.M., Nath, K.J., y Scott, E., **2000**. Microbial resistance and biocides. A review by the International Scientific Forum on Home Hygiene (IFH). International Scientific Forum on Home.
- BgVV-FAO/WHO. **2000**. WHO Surveillance programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe., Seventh Report 1993-1998. Disponible en: [http://www.bfr.bund.de/internet/7threport/7threp\\_fr.htm](http://www.bfr.bund.de/internet/7threport/7threp_fr.htm)

- BgVV-FAO/WHO. **2003**. WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe., Eighth Report 1999-2000. Disponible en: [http://www.bfr.bund.de/internet/8threport/8threp\\_fr.htm](http://www.bfr.bund.de/internet/8threport/8threp_fr.htm)
- Bhagwat, A.A. **2003**. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 84(2):217-224.
- Bhagwat, A.A. **2004**. Rapid detection of *Salmonella* from vegetable rinse-water using real-time PCR. *Food Microbiology*. 21(1):73-78.
- Bloomfield, S.F. y Scott, E. **1997**. Cross-contamination and infection in the domestic environment and the role of chemical disinfectants. *Journal of Applied Microbiology*. 83(1):1-9.
- Boer, E.d. y Beumer, R.R. **1999**. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. 50(1-2):119-130.
- Bono, J.L., Keen, J.E., Miller, L.C., Fox, J.M., Chitko-McKown, C.G., Heaton, M.P., y Laegreid, W.W. **2004**. Evaluation of a Real-Time PCR Kit for Detecting *Escherichia coli* O157 in Bovine Fecal Samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(3):1855-1857.
- Boulos, L., Prévost, M., Barbeau, B., Coallier, J., y Desjardins, R. **1999**. LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods*. 37(1):77-86.
- Bower, C.K. y Daeschel, M.A. **1999**. Resistance responses of microorganisms in food environments. *International Journal of Food Microbiology*. 50(1-2):33-44.
- Bower, C.K., McGuire, J., y Daeschel, M.A. **1996**. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. *Trends in Food Science and Technology*. 7(5):152-157.
- Bredholt, S., Maukonen, J., Kujanpää, K., Alanko, T., Olofson, U., Husmark, U., y Sjöberg, A.M. **1999**. Microbial methods for assessment of cleaning and disinfection of food-processing surfaces cleaned in a low-pressure system. *European Food Research and Technology*. 209(2):145-152.
- Breeuwer, P. y Abee, T. **2000**. Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *International Journal of Food Microbiology*. 55(1-3):193-200.
- Brennan, M., Wanismail, B., y Ray, B. **1986**. Cellular damage in dried *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Food Protection*. 49:47-53.

- Budu-Amoako, E., Toora, S., Ablett, R.F., y Smith, J. **1992**. Evaluation of the ability of primary selective enrichment to resuscitate heat-injured and freeze-injured *Listeria monocytogenes* cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(9):3177-3179.
- Burgess, F., Little, C.L., Allen, G., Williamson, K., y Mitchell, R.T. **2005**. Prevalence of *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* on the external packaging of raw meat. *Journal of Food Protection*. 68(5):469-475.
- Buttner, M.P., Cruz-Perez, P., y Stetzenbach, L.D. **2001**. Enhanced detection of surface-associated bacteria in indoor environments by quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(6):2564-2570.
- Buttner, M.P., Cruz, P., Stetzenbach, L.D., y Cronin, T. **2007**. Evaluation of two surface sampling methods for detection of *Erwinia herbicola* on a variety of materials by culture and quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(11):3505-3510.
- Calvert, R.M., Hopkins, H.C., Reilly, M.J., y Forsythe, S.J. **2000**. Caged ATP - an internal calibration method for ATP bioluminescence assays. *Letters in Applied Microbiology*. 30(3):223-227.
- Carpentier, B. y Cerf, O. **1993**. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*. 75:499-511.
- Carsberg, H.C. **2003**. Food Plant Sanitation. En *Food Safety Handbook*, ed. Schmidt y Rodrick. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, pp. 383-401.
- Centers for Disease Control and Prevention **2001**. Diagnosis and Management of Foodborne Illnesses: A Primer for Physicians. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*. 50(RR02):1-69.
- Centers for Disease Control and Prevention **2004**. *Salmonella* Serotype Typhimurium Outbreak Associated with Commercially Processed Egg Salad - Oregon, 2003. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*. 53(48):1132-1134.
- Centers for Disease Control and Prevention. **2007a**. Multistate Outbreak of *Salmonella* Serotype Tennessee Infections Associated with Peanut Butter — United States, 2006–2007. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*. 56(21):521-548.
- Centers for Disease Control and Prevention **2007b**. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food-10 States, 2006. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*. 56(14):336-339.
- Chae, M.S. y Schraft, H. **2001**. Cell viability of *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Microbiology*. 18(1):103-112.
- Champiat, D., Matas, N., Monfort, B., y Fraass, H. **2001**. Applications of bioluminescence to HACCP. *Luminescence*. 16:193-198.

- Chang, V.P., Mills, E.W., y Cutter, N. **2003**. Comparison of recovery methods for freeze-injured *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Campylobacter coli* in cell suspensions and associated with pork surfaces. *Journal of Food Protection*. 66(5):798-803.
- Chen, J. **2003**. Contemporary Monitoring Methods. En *Food Safety Handbook*, ed. Schmidt y Rodrick. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, pp. 197-210.
- Chen, W., Martínez, G., y Mulchandani, A. **2000**. Molecular beacons: A real-time polymerase chain reaction assay for detecting *Salmonella*. *Analytical Biochemistry*. 280:166-172.
- Cheng, Z. y Griffiths, M.W. **2003**. Rapid detection of *Campylobacter jejuni* in chicken rinse water by melting-peak analysis of amplicons in real-time polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection*. 66(8):1343-1352.
- Cheung, P.Y., Chan, C.W., Wong, W., Cheung, T.L., y Kam, K.M. **2004**. Evaluation of two real-time polymerase chain reaction pathogen detection kits for *Salmonella* spp. in food. *Letters in Applied Microbiology*. 39(6):509-515.
- Chmielewski, R.A.N. y Frank, J.F. **2003**. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2:22-32.
- Cockerill, F. y Reischl, U. **2002** *Rapid cycle real-time PCR: methods and applications. Microbiology and food analysis*. Berlin: Springer-Verlag. pp. 1-30.
- Codex Alimentarius FAO/WHO. **2003**. Basics Texts Food Hygiene. Recommended International Code of Practice General Principles of Food Hygiene. CAC/RCP 1-1969, Rev. 4-2003, (3):1. Disponible en: [http://ftp.fao.org/codex/Publications/Booklets/Hygiene/FoodHygiene\\_2003e.pdf](http://ftp.fao.org/codex/Publications/Booklets/Hygiene/FoodHygiene_2003e.pdf)
- Cogan, T.A., Slader, J., Bloomfield, S.F., y Humphrey, T.J. **2002**. Achieving hygiene in the domestic kitchen: the effectiveness of commonly used cleaning procedures. *Journal of Applied Microbiology*. 92(5):885-892.
- Corbitt, A.J., Bennion, N., y Forsythe, S.J. **2000**. Adenylate kinase amplification of ATP bioluminescence for hygiene monitoring in the food and beverage industry. *Letters in Applied Microbiology*. 30:443-447.
- Costa, P.D., Andrade, N.J., Brando, S.C.C., Passos, F.J.V., y Soares, N.F.F. **2006**. ATP-bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless steel milk contact surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*. 36:345-349.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., y Greenberg, E.P. **1999**. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*. 284(5418):1318-1322.

- Davey, M.E. y O'toole, G.A. **2000**. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews*:847-867.
- Davidson, C.A., Griffith, C.J., Peters, A.C., y Fielding, L.M. **1999**. Evaluation of two methods for monitoring surface cleanliness-DATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing. *Luminescence*. 14:33-38.
- Davidson, P.M. y Harrison, M.A. **2002**. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Technology-Scientific Status Summary*. 56(11):69-78.
- Dawson, P., Han, I., Cox, M., Black, C., y Simmons, L. **2007**. Residence time and food contact time effects on transfer of *Salmonella* Typhimurium from tile, wood and carpet: testing the five-second rule. *Journal of Applied Microbiology*. 102(4):945-953.
- Denyer, S.P. y Stewart, G.S.A.B. **1998**. Mechanisms of action of disinfectants. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 41(3-4):261-268.
- Ellingson, J.L.E., Anderson, J.L., Carlson, S.A., y Sharma, V.K. **2004**. Twelve hour real-time PCR technique for the sensitive and specific detection of *Salmonella* in raw and ready-to-eat meat products. *Molecular and Cellular Probes*. 18(1):51-57.
- Espié, E., Weill, F., Brouard, C., Capek, I., Delmas, G., Forgues, A., Grimont, F., y De Valk, H. **2005**. E-alert 9 March: Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype Agona infections in infants in France, linked to infant milk formula, investigations ongoing. *Eurosurveillance*. 10(1 - 3):E050310.1.
- Evans, J.A., Russel, S.L., James, C., y Corry, J.E.L. **2004**. Microbial contamination of food refrigeration equipment. *Journal of Food Engineering*. 62(3):225-232.
- Fakhr, M.K., McEvoy, J.M., Sherwood, J.S., y Logue, C.M. **2006**. Adding a selective enrichment step to the iQ-Check™ real-time PCR improves the detection of *Salmonella* in naturally contaminated retail turkey meat products. *Letters in Applied Microbiology*. 43(1):78-83.
- FAO/WHO BfR **2004**. Report 5th World Congress Foodborne Infections and Intoxications 7-11 June 2004, Berlin, Germany Federal Institute for Risk Assessment (Bundesinstitut für Risikobewertung). *Newsletter*. 81/82:1-8.
- Flint, S.H., Brooks, J.D., y Bremer, P.J. **2000**. Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. *Journal of Food Engineering*. 43(4):235-242.
- Foong, S.C.C. y Dickson, J.S. **2004**. Survival and recovery of viable but nonculturable *Listeria monocytogenes* cells in a nutritionally depleted medium. *Journal of Food Protection*. 67(8):1641-1645.

- Foschino, R., Picozzi, C., Civardi, A., Bandini, M., y Faroldi, P. **2003**. Comparison of surface sampling methods and cleanability assessment of stainless steel surfaces subjected or not to shot peening. *Journal of Food Engineering*. 60(4):375-381.
- French multi-agency outbreak investigation team **2005**. Outbreak of *E. coli* O157:H7 infections associated with a brand of beefburgers in France. *Eurosurveillance*. 10(11):E051103.1.
- Fu, Z., Rogelj, S., y Kieft, T.L. **2005**. Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 by immunomagnetic separation and real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 99(1):47-57.
- Fukushima, H., Tsunomori, Y., y Seki, R. **2003**. Duplex real-time SYBR Green PCR assays for detection of 17 species of food- or waterborne pathogens in stools. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(11):5134-5146.
- Fukushima, H., Katsube, K., Hata, Y., Kishi, R., y Fujiwara, S. **2007**. Rapid separation and concentration of food-borne pathogens in food samples prior to quantification by viable-cell counting and real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(1):92-100.
- Fung, D.Y.C. **2002**. Rapid Methods and Automation in Microbiology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 1:3-22.
- Fuster-Valls, N., Hernández-Herrero, M., Marín-de-Mateo, M., and Rodríguez-Jerez, J.J. **2007**. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. *Food Control*. (en prensa).
- Gasanov, U., Hughes, D., y Hansbro, P.M. **2005**. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiology Reviews*. 29(5):851-875.
- Gibson, H., Elton, R., Peters, W., y Holah, J.T. **1995**. Surface and suspension testing: Conflict or complementary. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 36(3-4):375-384.
- Gibson, H., Taylor, J.H., Hall, K.E., y Holah, J.T. **1999**. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*. 87(1):41-48.
- Gilbert, P., McBain, A.J., y Rickard, A.H. **2003**. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 51(4):245-248.
- Gill, C.O., Bryant, J., y Landers, C. **2003**. Identification of critical control points for control of microbiological contamination in processes leading to the production of ground beef at a packing plant. *Food Microbiology*. 20(6):641-650.

- González-Rodríguez, M.N., Sanz, J.J., Santos, J.A., Otero, A., y García-Lopez, M.L. **2002**. Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked freshwater fish at the retail level. *International Journal of Food Microbiology*. 77(1-2):161-168.
- Goto, M., Takahashi, H., Segawa, Y., Hayashidani, H., Takatori, K., y Hara-Kudo, Y. **2007**. Real-time PCR method for quantification of *Staphylococcus aureus* in milk. *Journal of Food Protection*. 70(1):90-96.
- Gracias, K.S. y McKillip, J.L. **2004**. A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food. *Canadian Journal Microbiology*. 50(11):883-890.
- Gran, H.M., Mutukumira, A.N., Wetlesen, A., y Narvhus, J.A. **2002a**. Smallholder dairy processing in Zimbabwe: hygienic practices during milking and the microbiological quality of the milk at the farm and on delivery. *Food Control*. 13(1):41-47.
- Gran, H.M., Mutukumira, A.N., Wetlesen, A., y Narvhus, J.A. **2002b**. Smallholder dairy processing in Zimbabwe: the production of fermented milk products with particular emphasis on sanitation and microbiological quality. *Food Control*. 13(3):161-168.
- Griffiths, M.W. **1996**. The role of ATP bioluminescence in the food Industry: new light on old problems. *Food Technology*. 50(6):7.
- Griffiths, M.W. **1997**. Rapid microbiological methods with hazard analysis critical control point. *Journal of AOAC International*. 80(6):1143-1150.
- Grönholm, L., Wirtanen, G., Ahlgren, K., Nordström, K., y Sjöberg, A.-M. **1999**. Screening of antimicrobial activities of disinfectants and cleaning agents against foodborne spoilage microbes. *Z Lebensm Unters Forsch A*. 208:289-298.
- Guerin, P.J., De Jong, B., Heir, E., Hasseltvedt, G., Kapperud, G., Styrmø, K., Gondrosen, B., Lassen, J., Andersson, Y., y Aavitsland, P. **2004**. Outbreak of *Salmonella* Livingstone infection in Norway and Sweden due to contaminated processed fish products. *Epidemiology and Infection*. 132(5):889-895.
- Hammack, T.S., Valentin-Bon, I.E., Jacobson, A.P., y Andrews, W.H. **2004**. Relative effectiveness of the *Bacteriological Analytical Manual* method for the recovery of *Salmonella* from whole cantaloupes and cantaloupe rinses with selected preenrichment media and rapid methods. *Journal of Food Protection*. 67(5):870-877.
- HaoXuan, Zheng, JiDe, Wang, MingJun, Zhang, Yong, Sun, and Bo, Jiang. **2006**. *Yersinia enterocolitica* identification in stool samples using real-time PCR. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. (en prensa).
- Hassan, A., Birt, D., y Frank, J. **2004**. Behavior of *Listeria monocytogenes* in a *Pseudomonas putida* biofilm on a condensate-forming surface. *Journal of Food Protection*. 67(2):322-327.

- Hein, I., Flekna, G., Krassnig, M., y Wagner, M. **2006**. Real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in food: An alternative approach to a conventional PCR system suggested by the FOOD-PCR project. *Journal of Microbiological Methods*. 66(3):538-547.
- Heir, E., Sundheim, G., y Holck, A.L. **1995**. Resistance to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* spp. isolated from the food industry and nucleotide sequence of the resistance plasmid pST827. *Journal of Applied Bacteriology*. 79:149-156.
- Heller, L.C., Davis, C.R., Peak, K.K., Wingfield, D., Cannons, A.C., Amuso, P.T., y Cattani, J. **2003**. Comparison of methods for DNA isolation from food samples for detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(3):1844-1846.
- Herald, P.J. y Zottola, E.A. **1988**. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. *Journal of Food Science*. 53(5):1549-1562.
- Herman, L. **1997**. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* by PCR. *Food Microbiology*. 14(2):103-110.
- Hermidia, M., Taboada, M., Menéndez, S., y Rodríguez-Otero, J.L. **2000**. Semi-automated direct epifluorescent filter technique for total bacterial count in raw milk. *Journal of AOAC International*. 83(6):1345-1348.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., y Watson, R. **1993**. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nat Biotech*. 11(9):1026-1030.
- Hilbert, L.R., Bagge-Ravn, D., Kold, J., y Gram, L. **2003**. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 52:175-185.
- Holah, J.T., Betts, R.P., y Thorpe, R.H. **1988**. The use of direct epifluorescence microscopy (DEM) and the direct epifluorescent filter technique (DEFT) to assess microbial populations on food contact surfaces. *Journal of Applied and Bacteriology*. 65:215-221.
- Holah, J.T., Higgs, C., Robinson, S., Worthington, D., y Spenceley, H. **1990**. A conductance-based surface disinfection test for food hygiene. *Letters in Applied Microbiology*. 11(5):255-259.
- Holah, J.T., Taylor, J.H., Dawson, D.J., y Hall, K.E. **2002**. Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*. 92(s1):111S-120S.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., y Gelfand, D.H. **1991**. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3' exonuclease activity of

*Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88(16):7276-7280.

Hoorfar, J., Malorny, B., Abdulmawjood, A., Cook, N., Wagner, M., y Fach, P. **2004**. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(5):1863-1868.

Hornes, E., Wasteson, Y., y Olsvik, O. **1991**. Detection of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin genes in pig stool specimens by an immobilized, colorimetric, nested polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 29(11):2375-2379.

Hui, Y.H. **2003**. The FDA's GMP's, HACCP, and the *Food Code*. En *Food Plant Sanitation*, ed. Hui, Bruinsma, Gorham, Nip, Tong y Ventresca. Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 31-50.

Ibekwe, A.M. y Grieve, C.M. **2003**. Detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in environmental samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*. 94(3):421-431.

Ingham, S., Becker, K., y Fanslau, M. **2003**. Comparison of the Baird-Parker agar and 3M Petrifilm Staph Express Count Plate methods for enumeration of *Staphylococcus aureus* in naturally and artificially contaminated foods. *Journal of Food Protection*. 66(11):2151-2155.

Ivanova, E.P., Alexeeva, Y.V., Pham, D.K., Wright, J.P., y Nicolau, D.V. **2006**. ATP level variations in heterotrophic bacteria during attachment on hydrophilic and hydrophobic surfaces. *International Microbiology*. 9(1):37-46.

Jacobsen, N.R., Bogdanovich, T., Skurnik, M., Lubeck, P.S., Ahrens, P., y Hoorfar, J. **2005**. A real-time PCR assay for the specific identification of serotype O:9 of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Microbiological Methods*. 63(2):151-156.

Janning, B., Veld, P.H.i.t., Notermans, S., y Krämer, J. **1994**. Resistance of bacterial strains to dry conditions: use of anhydrous silica gel in a desiccation model system. *Journal of Applied Bacteriology*. 77:319-324.

Joseph, B., Otta, S.K., Karunasagar, I., y Karunasagar, I. **2001**. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*. 64(3):367-372.

Jullien, C., Benezech, T., Carpentier, B., Lebret, V., y Faille, C. **2002**. Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. *Journal of Food Engineering*. 56(1):77-87.

Kandhai, M.C., Reij, M.W., Gorris, L.G.M., Guillaume-Gentil, O., y van Schothorst, M. **2004**. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. *The Lancet*. 363(9402):39-40.

- Keith, M. **1997**. Evaluation of an automated enzyme-linked fluorescent immunoassay system for the detection of Salmonellae in foods. *Journal of Food Protection*. 60(6):682-685.
- Klein, D. **2002**. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*. 8(6):257-260.
- Kumar, C.G. y Anand, S.K. **1998**. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 42(1-2):9-27.
- Kusumaningrum, H.D., Riboldi, G., Hazeleger, W.C., y Beumer, R.R. **2003**. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology*. 85(3):227-236.
- LaGier, M.J., Joseph, L.A., Passaretti, T.V., Musser, K.A., y Cirino, N.M. **2004**. A real-time multiplexed PCR assay for rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Molecular and Cellular Probes*. 18(4):275-282.
- Langsrud, S. y Sundheim, G. **1997**. Factors contributing to the survival of poultry associated *Pseudomonas* spp. exposed to a quaternary ammonium compound. *Journal of Applied Microbiology*. 82(6):705-712.
- Langsrud, S., Sidhu, M.S., Heir, E., y Holck, A.L. **2003**. Bacterial disinfectant resistance a challenge for the food industry. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 51(4):283-290.
- Larson, E.L., Aiello, A.E., Gomez-Duarte, C., Lin, S.X., Lee, L., Della-Latta, P., y Lindhardt, C. **2003**. Bioluminescence ATP monitoring as a surrogate marker for microbial load on hands and surfaces in the home. *Food Microbiology*. 20(6):735-739.
- Lasa, I. **2006**. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *International Microbiology*. 9(1):21-28.
- Legnani, P., Leoni, E., Berveglieri, M., Mirolo, G., y Alvaro, N. **2004**. Hygienic control of mass catering establishments, microbiological monitoring of food and equipment. *Food Control*. 15(3):205-211.
- Lerliche, V. y Carpentier, B. **2000**. Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. *Journal of Applied Microbiology*. 88(4):594-605.
- Lewis, K. **2001**. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45(4):999-1007.
- Li, Y., Dick, W.A., y Tuovinen, O.H. **2004**. Fluorescence microscopy for visualization of soil microorganisms—a review. *Biology and Fertility of Soils*. 39(5):301-311.

- Liming, S.H. y Bhagwat, A.A. **2004**. Application of a molecular beacon--real-time PCR technology to detect *Salmonella* species contaminating fruits and vegetables. *International Journal of Food Microbiology*. 95(2):177-187.
- Liming, S.H., Zhang, Y., Meng, J., y Bhagwat, A.A. **2004**. Detection of *Listeria monocytogenes* in Fresh Produce Using Molecular Beacon—Real-time PCR Technology. *Journal of Food Science*. 69(8):M240-M245.
- Lin, C.-M., Takeuchi, K., Zhang, L., Dohm, C., Meyer, J.D., Hall, P.A., y Doyle, M.P. **2006**. Cross-contamination between processing equipment and deli meats by *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 69(1):71-79.
- Linton, R.H., Eisel, W.G., y Muriana, P.M. **1997**. Comparison of conventional plating methods and Petrifilm for the recovery of microorganisms in a ground beef processing facility. *Journal of Food Protection*. 60(9):1084-1088.
- Lund, M., Nordentoft, S., Pedersen, K., y Madsen, M. **2004**. Detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(11):5125-5132.
- Lundén, J.M., Miettinen, M., Autio, T.J., y Korkeala, H.J. **2000**. Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. *Journal of Food Protection*. 63(9):1204-1207.
- Lundén, J.M., Autio, T.J., y Korkeala, H.J. **2002**. Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants associated with a dicing machine. *Journal of Food Protection*. 65(7):1129-1133.
- Luppens, S.B.I., Reij, M.W., Van der Heijden, R.W.L., Romboust, F.M., y Abee, T. **2002**. Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(9):4194-4200.
- Lyytikäinen, O., Autio, T., Maijala, R., Ruutu, P., Honkanen-Buzalski, T., Miettinen, M., Hatakka, M., Mikkola, J., Anttila, V.-J., Johansson, T., Rantala, L., Aalto, T., Korkeala, H., y Siitonen, A. **2000**. An outbreak of *Listeria Monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland. *The Journal of Infectious Diseases*. 181:1838-1841.
- Mackay, I.M. **2004**. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiological and Infection*. 10(3):190-212.
- Mafu, A.A., Roy, D., Goulet, J., y Magny, P. **1990**. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. *Journal of Food Protection*. 53(9):742-746.
- Maillard, J.Y. **2002**. Bacterial target sites for biocide action. *Journal of Applied Microbiology*. 92(s1):16S-27S.

- Maillard, J.-Y. **2005**. Biocide Use and Antibiotic Resistance. En *Antibiotic policies. Theory and practice*, Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, pp. 465-489.
- Malorny, B., Hoorfar, J., Bunge, C., y Helmuth, R. **2003a**. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(1):290-296.
- Malorny, B., Hoorfar, J., Hugas, M., Heuvelink, A., Fach, P., Ellerbroek, L., Bunge, C., Dorn, C., y Helmuth, R. **2003b**. Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method. *International Journal of Food Microbiology*. 89(2-3):241-249.
- Malorny, B., Tassios, P.T., Radstrom, P., Cook, N., Wagner, M., y Hoorfar, J. **2003c**. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*. 83(1):39-48.
- Malorny, B. y Hoorfar, J. **2005**. Toward standardization of diagnostic PCR testing of fecal samples: lessons from the detection of salmonellae in pigs. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(7):3033-3037.
- Matsui, T., Suzuki, S., Takahashi, H., Oyama, T., Kobayashi, J., Izumiya, H., Watanabe, H., Kasuga, F., Kijima, F., Shibata, K., y Okabe, N. **2004**. *Salmonella* Enteritidis outbreak associated with a school-lunch dessert: cross-contamination and a long incubation period, Japan, 2001. *Epidemiology and Infection*. 132(5):873-879.
- Maukonen, J., Mattila-Sandholm, T., y Wirtanen, G. **2000**. Metabolic indicators for assessing bacterial viability in hygiene sampling using cells in suspension and swabbed biofilm. *Lebensmittel- Wissenschaft und-Technologie*. 33(3):225-233.
- Maukonen, J., Matto, J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T., y Saarela, M. **2003**. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 30(6):327-356.
- McDonnell, G. y Russell, A.D. **1999**. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(1):147-179.
- McLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W.J., y Jewell, K. **2004**. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*. 92(1):15-33.
- Mead, P.S., Finelli, L., Lambert-Fair, M.A., Champ, D., Townes, J., Hutwagner, L., Barret, T., Spitalny, K., y Mintz, E. **1997**. Risk of factors for sporadic infection with *Escherichia coli* O157:H7. *Archives of Internal Medicine*. 157:204-208.
- Medrala, D., Dabrowski, W., Czekajlo-Kolodziej, U., czkowska-Kozon, E., Koronkiewicz, A., Augustynowicz, E., y Manzano, M. **2003**. Persistence of *Listeria monocytogenes* strains isolated from products in a Polish fish-processing plant over a 1-year period. *Food Microbiology*. 20(6):715-724.

- Michaels, B., Ayers, T., y Celis, M. **2002**. P008 Inactivation of refrigerator biofilm bacteria for application in the food service environment. *Journal of Food Protection*. 65(Sup.A):50-150.
- Miettinen, H., Aarnisalo, K., Salo, S., y Sjöberg, A.-M. **2001**. Evaluation of surface contamination and the presence of *Listeria monocytogenes* in fish processing factories. *Journal of Food Protection*. 64(5):635-639.
- Mokgatla, R.M., Brozel, V.S., y Gouws, P.A. **1998**. Isolation of *Salmonella* resistant to hypochlorous acid from a poultry abattoir. *Letters in Applied Microbiology*. 27(6):379-382.
- Molecular Probes **2004**. LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits. Technical sheet. *Molecular Probes, Inc.*
- Moore, J.E., Stanley, T., Smithson, R., O'Malley, H., y Murphy, P.G. **2000**. Outbreak of *Campylobacter* food-poisoning in Northern Ireland. *Clinical Microbiology and Infection*. 6(7):397-398.
- Moore, G. y Griffith, C. **2002a**. A comparison of surface sampling methods for detecting coliforms on food contact surfaces. *Food Microbiology*. 19(1):65-73.
- Moore, G. y Griffith, C. **2002b**. Factors influencing recovery of micro-organisms from surfaces by use of traditional hygiene swabbing. *Dairy, Food and Environment Sanitation*. 22(6):410-421.
- Moretro, T., Midtgaard, E.S., Nesse, L.L., y Langsrud, S. **2003**. Susceptibility of *Salmonella* isolated from fish feed factories to disinfectants and air-drying at surfaces. *Veterinary Microbiology*. 94:207-217.
- Morris, C.E., Monier, J.-M., y Jacques, M.-A. **1997**. Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(4):1570-1576.
- Murphy, S.C., Kozlowski, S.M., Bandler, D.K., y Boor, K.J. **1998**. Evaluation of Adenosine Triphosphate-Bioluminescence hygiene monitoring for trouble-shooting fluid milk Shelf-Life Problems. *Journal of Dairy Science*. 81(3):817-820.
- Myint, M.S., Johnson, Y.J., Tablante, N.L., y Heckert, R.A. **2006**. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. *Food Microbiology*. 23(6):599-604.
- Nam, H.M., Srinivasan, V., Gillespie, B.E., Murinda, S.E., y Oliver, S.P. **2005**. Application of SYBR green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. *International Journal of Food Microbiology*. 102(2):161-171.

- National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). **2007**. Health Science Topics. Foodborne Diseases. Disponible en: <http://www3.niaid.nih.gov/healthscience/healthtopics/foodborne/default.htm>
- Nguyen, L.T., Gillespie, B.E., Nam, H.M., Murinda, S.E., y Oliver, S.P. **2004**. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in beef products by real-time polymerase chain reaction. *Foodborne pathogens and Disease*. 1(4):231-240.
- Nogva, h.K., Bergh, A., Holck, A., y Rudi, K. **2000**. Application of the 5'-Nuclease PCR assay in evaluation and development of methods for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(9):4029-4036.
- Norwood, D.E. y Gilmour, A. **2001**. The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. *Letters in Applied Microbiology*. 33(4):320-324.
- Notzon, A., Helmuth, R., y Bauer, J. **2006**. Evaluation of an immunomagnetic separation-real-time PCR assay for the rapid detection of *Salmonella* in meat. *Journal of Food Protection*. 69(12):2896-2901.
- O'Hanlon, K.A., Catarama, T.M.G., Blair, I.S., McDowell, D.A., y Duffy, G. **2005**. Comparison of a real-time PCR and an IMS/culture method to detect *Escherichia coli* O26 and O111 in minced beef in the Republic of Ireland. *Food Microbiology*. 22(6):553-560.
- Oliveira, T.C., Barbut, S., y Griffiths, M.W. **2005a**. A robotic DNA purification protocol and real-time PCR for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods. *Journal of Food Protection*. 68(10):2131-2135.
- Oliveira, T.C., Barbut, S., y Griffiths, M.W. **2005b**. Detection of *Campylobacter jejuni* in naturally contaminated chicken skin by melting peak analysis of amplicons in real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 104(1):105-111.
- Panisello, P.J., Rooney, R., Quantick, P.C., y Stanwell-Smith, R. **2000**. Application of foodborne disease outbreak data in the development and maintenance of HACCP systems. *International Journal of Food Microbiology*. 59(3):221-234.
- Parenteral Drug Association (PDA). **1998**. Points to consider for cleaning validation. DRAFT, PDA Technical report No. 29:1. Disponible en: <http://www.pharmanet.oi.com.br/pdf/tr29-002.pdf>
- Park, Y.H., Seo, K.S., Ahn, J.S., Yoo, H.S., y Kim, S.P. **2001**. Evaluation of the Petrifilm plate method for the enumeration of aerobic microorganisms and coliforms in retailed meat samples. *Journal of Food Protection*. 64(11):1841-1843.

- Patel, J.R., Bhagwat, A.A., Sanglay, G.C., y Solomon, M.B. **2006**. Rapid detection of *Salmonella* from hydrodynamic pressure-treated poultry using molecular beacon real-time PCR. *Food Microbiology*. 23(1):39-46.
- Payne, D.N., Babb, J.R., y Bradley, C.R. **1999**. An evaluation of the suitability of the European suspension test to reflect in vitro activity of antiseptics against clinically significant organisms. *Letters in Applied Microbiology*. 28(1):7-12.
- Pecorelli, S., Rosmini, M.R., Cabrera, A., Moreyra, E., y Otero, J. **1993**. Comparación de tres procedimientos de muestreos para el análisis microbiológico de superficies. *Fleischwirtsch.español*. 1(36):38.
- Perelle, S., Dilasser, F., Malorny, B., Grout, J., Hoorfar, J., y Fach, P. **2004a**. Comparison of PCR-ELISA and LightCycler real-time PCR assays for detecting *Salmonella* spp. in milk and meat samples. *Molecular and Cellular Probes*. 18(6):409-420.
- Perelle, S., Josefsen, M., Hoorfar, J., Dilasser, F., Grout, J., y Fach, P. **2004b**. A LightCycler real-time PCR hybridization probe assay for detecting food-borne thermophilic *Campylobacter*. *Molecular and Cellular Probes*. 18(5):321-327.
- Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J., y Fach, P. **2005**. Detection of *Escherichia coli* serogroup O103 by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology*. 98(5):1162-1168.
- Pontrefract, R.D. **1991**. Bacterial adherence: its consequences in food processing. *Canadian Institute of Food Science and Technology*. 64(3-4):113-117.
- Ravishankar, S. y Juneja, V.K. **2003**. Adaptation or Resistance responses of Microorganisms to Stresses in the Food Processing Environment. En *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*, ed. Yousef y Juneja. CRC Press LLC. London, pp. 105-158.
- Reij, M.W. y Den Aantrekker, E.D. **2004**. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology*. 91(1):1-11.
- Reynisson, E., Josefsen, M.H., Krause, M., y Hoorfar, J. **2006**. Evaluation of probe chemistries and platforms to improve the detection limit of real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*. 66(2):206-216.
- Robine, E., Derangère, D., y Robin, D. **2000**. Survival of a *Pseudomonas fluorescens* and *Enterococcus faecalis* aerosol on inert surfaces. *International Journal of Food Microbiology*. 55(1-3):229-234.
- Robine, E., Boulangé-Petermann, L., y Derangère, D. **2002**. Assessing bactericidal properties of materials: the case of metallic surfaces in contact with air. *Journal of Microbiological Methods*. 49:225-234.

- Rodríguez, G.G., Phipps, D., Ishiguro, K., y Ridgway, H.F. **1992**. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(6):1801-1808.
- Rodríguez-Lázaro, D., Hernandez, M., Esteve, T., Hoorfar, J., y Pla, M. **2003**. A rapid and direct real time PCR-based method for identification of *Salmonella* spp. *Journal of Microbiological Methods*. 54(3):381-390.
- Rodríguez-Lázaro, D., Jofre, A., Aymerich, T., Hugas, M., y Pla, M. **2004**. Rapid Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* in meat products by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(10):6299-6301.
- Rola, J.G., Korpysa-Dzirba, W., y Wojton, B. **2006**. Detection of *Listeria monocytogenes* in powdered milk by VIDAS LMO2-Collaborative study. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*. 14(4):362-368.
- Rossen, L., Norskov, P., Holmstrom, K., y Rasmussen, O.F. **1992**. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*. 17(1):37-45.
- Rossmannith, P., Krassing, M., Wagner, M., y Hein, I. **2006**. Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment/real-time PCR method targeting the *prfA* gene. *Research in Microbiology*. 157:763-771.
- Rudi, K., Hoidal, H.K., Katla, T., Johansen, B.K., Nordal, J., y Jakobsen, K.S. **2004**. Direct real-time PCR quantification of *Campylobacter jejuni* in chicken fecal and cecal samples by integrated cell concentration and DNA purification. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(2):790-797.
- Russell, S.M. **2000**. Comparison of the traditional three-tube Most Probable Number method with the Petrifilm, SimPlate, BioSys Optical, and Bactometer Conductance methods for enumerating *Escherichia coli* from chicken carcasses and ground beef. *Journal of Food Protection*. 63(9):1179-1183.
- Russell, A.D. **2002a**. Antibiotic and biocide resistance in bacteria: comments and conclusions. *Journal of Applied Microbiology*. 92(s1):171S-173S.
- Russell, A.D. **2002b**. Antibiotic and biocide resistance in bacteria: Introduction. *Journal of Applied Microbiology*. 92(s1):1S-3S.
- Russell, A.D. **2002c**. Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disinfectants: an increasingly important area of investigation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 49(4):597-599.
- Sails, A.D., Fox, A.J., Bolton, F.J., Wareing, D.R.A., y Greenway, D.L.A. **2003**. A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(3):1383-1390.

- Samelis, J. y Metaxopoulos, J. **1999**. Incidence and principal sources of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* contamination in processed meats and a meat processing plant. *Food Microbiology*. 16(5):465-477.
- Seeger, K. y Griffiths, M.W. **1994**. Adenosine triphosphate bioluminescence for hygiene monitoring in health care institutions. *Journal of Food Protection*. 57(6):509-512.
- Sekar, R.B. y Periasamy, A. **2003**. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *The Journal of Cell Biology*. 160(5):629-633.
- Seo, K.H., Valentin-Bon, I.E., Brackett, R.E., y Holt, P.S. **2004**. Rapid, specific detection of *Salmonella* Enteritidis in pooled eggs by real-time PCR. *Journal of Food Protection*. 67(5):864-869.
- Seo, K.H., Valentin-Bon, I.E., y Brackett, R.E. **2006**. Detection and enumeration of *Salmonella* Enteritidis in homemade ice cream associated with an outbreak: comparison of conventional and real-time PCR methods. *Journal of Food Protection*. 69(3):639-643.
- Sewell, A.M., Warburton, D.W., Boville, A., Daley, E.F., y Mullen, K. **2003**. The development of an efficient and rapid enzyme linked fluorescent assay method for the detection of *Listeria* spp. from foods. *International Journal of Food Microbiology*. 81(2):123-129.
- Sharma, M. y Anand, S.K. **2002**. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry - a case. *Food Control*. 13(6-7):469-477.
- Silbernagel, K. y Lindberg, K. **2002**. Evaluation of the 3M Petrifilm Enterobacteriaceae Count Plate method for the enumeration of *Enterobacteriaceae* in foods. *Journal of Food Protection*. 65(9):1452-1456.
- Silk, T.M., Roth, T.M., y Donnelly, C.W. **2002**. Comparison of growth kinetics for healthy and heat-injured *Listeria monocytogenes* in eight enrichment broths. *Journal of Food Protection*. 65(8):1333-1337.
- Stanfield, P. **2003**. Cleaning and Sanitizing a Food Plant. En *Food Plant Sanitation*, ed. Hui, Bruinsma, Gorham, Nip, Tong y Ventresca. Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 101-114.
- Stepanovic, S., Cirkovic, I., Mijac, V., y Svabic-Vlahovic, M. **2003**. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiology*. 20:339-343.
- Stewart, P.S., Rayner, J., Roe, F., y Rees, W.M. **2001**. Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates. *Journal of Applied Microbiology*. 91:525-532.

- Suh, J.-H. y Knabel, S.J. **2001**. Comparison of different enrichment broths and background flora for detection of heat-injured *Listeria monocytogenes* in whole milk. *Journal of Food Protection*. 64(1):30-36.
- Sutherland, I.W. **2001**. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*. 147:3-9.
- Takeuchi, K. y Frank, J.F. **2001**. Confocal microscopy and microbial viability detection for food research. *Journal of Food Protection*. 64(12):2088-2102.
- Taylor, J.H., Rogers, S.J., y Holah, J.T. **1999**. A comparison of the bactericidal efficacy of 18 disinfectants used in the food industry against *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas aeruginosa* at 10 and 20 C. *Journal of Applied Microbiology*. 87(5):718-725.
- Temelli, S., Dokuzlu, C., y Sen, M.K.C. **2006**. Determination of microbiological contamination sources during frozen snail meat processing stages. *Food Control*. 17(1):22-29.
- Thelwell, N., Millington, S., Solinas, A., Booth, J., y own, T. **2000**. Mode of action and application of Scorpions primers to mutation detection. *Nucleic Acids Research*. 29(19):3752-3761.
- Thumberg, R.L., Tran, T.T., Beneth, R.W., Matthews, R.N., y Belay, N. **2002**. Microbial evaluation of selected fresh produce obtained at retail markets. *Journal of Food Protection*. 65(4):677-682.
- Tirado, C. y Schmidt, K. **2001**. WHO Surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications: preliminary results and trends across greater Europe. *Journal of Infection*. 43(1):80-84.
- Trachoo, N. **2003**. Biofilms and the food industry. *Journal Science Technology*. 25(6):807-815.
- Tyagi, S. y Kramer, F.R. **1996**. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology*. 14:303-308.
- Uhl, J.R., Bell, C.A., Sloan, L.M., Espy, M.J., Smith, T.F., Rosenblatt, J.E., y Cockerill, F.R. **2002**. Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for the detection of microbial pathogens: the Mayo-Roche rapid anthrax test. *Mayo Clinic Proceedings*. 77:673-680.
- Uyttendaele, M., Vanwildemeersch, K., y Debevere, J. **2003**. Evaluation of real-time PCR vs. automated ELISA and a conventional culture method using a semi-solid medium for detection of *Salmonella*. *Letters in Applied Microbiology*. 37(5):386-391.

- Van Kessel, J.S., Karns, J.S., Gorski, L., McCluskey, B.J., y Perdue, M.L. **2004**. Prevalence of *Salmonellae*, *Listeria monocytogenes*, and fecal coliforms in bulk tank milk on US dairies. *Journal of Dairy Science*. 87(9):2822-2830.
- Vanderzant, C. y Splittstoesser, D. **1992** *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Association. pp. 79-87.
- Vanne, L., Karwoski, M., Karppinen, S., y Sjoberg, A.-M. **1996**. HACCP-based food quality control and rapid detection methods for microorganisms. *Food Control*. 7(6):263-276.
- Velázquez, M. y Feirtag, J. **1997**. Quenching and enhancement effects of ATP extractants, cleansers, and sanitizers on the detection of the ATP. *Journal of Food Protection*. 60(7):799-803.
- Wang, X., Jothikumar, N., y Griffiths, M.W. **2004**. Enrichment and DNA extraction protocols for the simultaneous detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in raw sausage meat with multiplex real-time PCR. *Journal of Food Protection*. 67(1):189-192.
- Warren, B., Yuk, H.-G., y Schneider, K.R. **2007**. Detection of *Salmonella* by flow-through immunocapture real-time PCR in selected foods within 8 hours. *Journal of Food Protection*. 70(4):1002-1006.
- Weighardt, F., **2003**. Quantitative PCR for the detection of GMO (Session 10) in the analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms. European Commission, DG-JRC and World Health Organization. 1.03.114. Italy, Roma.
- Wilks, S.A., Michels, H., y Keevil, C.W. **2005**. The survival of *Escherichia coli* O157 on a range of metal surfaces. *International Journal of Food Microbiology*. 105(3):445-454.
- Williams, R.C., Isaacs, S., Decou, M.L., Richardson, E.A., Buffett, M.C., Slinger, R.W., Brodsky, M.H., Ciebin, B.W., Ellis, A., Hockin, J., y the E.coli O157:H7 Working Group **2000**. Illness outbreak associated with *Escherichia coli* O157:H7 in Genoa salami. *Canadian Medical Association Journal*. 162(10):1409-1413.
- Wirtanen, G. y Mattila-Sandholm, T. **1993**. Epifluorescence image analysis and cultivation of foodborne biofilm bacteria grown on stainless steel surfaces. *Journal of Food Protection*. 56(8):678-683.
- Wirtanen, G., Husmark, U., y Mattila-Sandholm, T. **1996**. Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. *Journal of Food Protection*. 59(7):727-733.
- Wirtanen, G., Aalto, M., Härkönen, P., Gilbert, P., y Mattila-Sandholm, T. **2001a**. Efficacy testing of commercial disinfectants against foodborne pathogenic and spoilage microbes in biofilm-constructs. *European Food Research and Technology*. 213:409-414.

- Wirtanen, G., Salo, S., Helander, I.M., y Mattila-Sandholm, T. **2001b**. Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 20:37-50.
- Wirtanen, G. y Salo, S. **2003** Disinfection in food processing - efficacy testing of disinfectants. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 2:293-306.
- Wolffs, P., Knutsson, R., Norling, B., y Radstrom, P. **2004**. Rapid quantification of *Yersinia enterocolitica* in pork samples by a novel sample preparation method, flotation, prior to real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(3):1042-1047.
- Wolffs, P., Norling, B., y Radstrom, P. **2005**. Risk assessment of false-positive quantitative real-time PCR results in food, due to detection of DNA originating from dead cells. *Journal of Microbiological Methods*. 60(3):315-323.
- World Health Organization. **2002**. Food diseases, emerging, Fact sheet N° 124. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs124/en/print.html>
- World Health Organization. **2006a**. Consultation to develop a strategy to estimate the global burden of foodborne diseases. Taking stock and charting the way forward,1. Disponible en: [http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne\\_disease/fbd\\_2006.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fbd_2006.pdf)
- World Health Organization, **2006b**. Five keys to safer food manual. WHO Press. Ginebra, Suiza.
- World Health Organization. **2007**. Food safety and foodborne illness, Fact sheet N° 237. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/print.html>
- Yang, C., Jiang, Y., Huang, K., Zhu, C., y Yin, Y. **2003**. Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk and environmental water. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 38(3):265-271.
- Yuk, H.-G., Warren, B., y Schneider, K.R. **2006**. Preliminary evaluation of flow-through immunocapture followed by real-time PCR for the detection of *Salmonella* serovars on tomato surfaces within 8 hours. *Journal of Food Protection*. 69(9):2253-2257.



