



Universitat Autònoma de Barcelona

**Métodos convencionales, rápidos y alternativos para el control
microbiológico de la higiene en superficies**

Vanessa Yelina Montañez Izquierdo

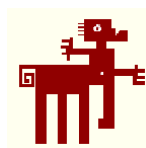
Tesis Doctoral

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

Para optar el grado de doctora en

Ciencia de los Alimentos

Bellaterra, Junio de 2013



FACULTAT DE VETERINÀRIA DE 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 Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona*, y

DORA ISELA SALAS VÁZQUEZ, Responsable Técnico de Investigación y Desarrollo de ITRAM HIGIENE, S.L.

HACEN CONSTAR:

Que la memoria titulada “**Métodos convencionales, rápidos y alternativos para el control microbiológico de la higiene en superficies**”, presentada por Vanessa Yelina Montañez Izquierdo para optar el grado de doctora por la *Universitat Autònoma de Barcelona*, ha sido realizada bajo su dirección y considerándola finalizada, autorizan su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Bellaterra, a 10 de Junio de 2013.

José Juan Rodríguez Jerez

Dora Isela Salas Vázquez

Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado gracias a la financiación aportada por la *Fundació per als Estudis de Prevenció i Seguretat Integral (FEPSI)* adscrita a la *Universitat Autònoma de Barcelona*, dentro del programa de becas pre-doctorales para la formación de investigadores.

Al Dr. José Juan Rodríguez por la confianza depositada en mí y darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación, y sobre todo por su apoyo para continuar con los estudios de doctorado, sin ello el desarrollo de la tesis no hubiera sido posible.

A la Dra. Dora Salas Vázquez por ser mi guía durante mi formación como investigadora, por sus enseñanzas con palabras y el ejemplo, por su apoyo en el aspecto profesional y personal, estoy agradecida de haber contado con ella durante toda esta etapa.

A mis compañeros y amigos: Rita, Jacira, Sonia, Fabio Fontecha, Genaro, Fabio Poliselí, Sasha, Abel, Isabel, Natalia, Kathy, Dora Cecilia, Diana, Oscar, Wilber, José, Angelita, Nelly, Rodrigo, por las conversaciones y comidas compartidas, los viajes realizados, las travesuras, su complicidad y porque siempre estuvieron dispuestos a ayudarme. A Jordi, por su apoyo con la estadística y su ingenio como plomero. A Dolors, por las conversaciones compartidas y por permitirme trabajar acompañada del “bumba bumba” en la radio. Estoy muy contenta de haberles conocido y compartido tanto con todos ellos durante mi estancia por España.

A la Dra. Manuela Hernández por su apoyo académico, por otorgarme unos minutos de su tiempo cuando lo necesité y por supuesto por su carácter desenfadado que hace diferente un día de trabajo normal.

A mi hermana Verónica (con su pequeña Ainhoa) y mi sobrina Meritxell, por apoyarme desde que llegué a Barcelona, por adoptarme en su familia, por su comprensión y su cariño.

A Joel, por todo su apoyo durante esta experiencia, por darme ánimos para seguir adelante, por su comprensión, por los consejos y por su amor.

Un agradecimiento especial para mis padres, por su constante apoyo desde la distancia y hacerme sentir que siempre estaban conmigo, por las fuerzas que me dan para seguir adelante, y sobre todo por su cariño y amor.

Resumen

Las superficies contaminadas representan una de las principales vías de transmisión de microorganismos a lo largo de la cadena alimentaria, y se sitúan como el segundo factor más frecuente de contaminación cruzada de los alimentos. Dentro de la industria alimentaria, además de las superficies duras de trabajo (vidrio, metal y materiales poliméricos), la ropa del personal y otros materiales textiles (sintéticos y naturales) utilizados durante el procesado de los alimentos también son consideradas una fuente potencial para transferir microorganismos patógenos a los alimentos. Por tanto, el proceso de lavado de textiles debe poseer adicionalmente un efecto desinfectante. En este sentido, es necesario aplicar métodos que permitan un control microbiológico adecuado sobre ambos tipos de superficies, mediante el uso de herramientas para evaluar satisfactoriamente la contaminación y la aplicación de tratamientos, convencionales o alternativos, que disminuyan o eliminen de manera eficiente los microorganismos, principalmente cuando estos se encuentran dentro de un biofilm. Un método alternativo interesante para el control de la contaminación microbiana es el uso de bacteriófagos (fagos).

En este estudio se comparó el método de cultivo convencional, la microscopía de epifluorescencia directa (DEM) y la PCR en tiempo real (RTi-PCR) para el recuento de *Staphylococcus aureus* sobre superficies textiles de algodón. El método que mostró mejor sensibilidad fue el cultivo ($0,38 \log_{10}$ UFC cm^{-2}), seguido por la RTi-PCR ($2,13 \log_{10}$ UFC cm^{-2}). Mientras que, la DEM presentó una sensibilidad menor ($4,12 \log_{10}$ UFC cm^{-2}) y además resultó ser laboriosa para el recuento microbiológico en textiles.

También, evaluamos el efecto desinfectante del lavado estándar sobre *S. aureus* y *Candida albicans* en superficies textiles a diferentes temperaturas con ocho agentes desinfectantes resultantes de la combinación de dos detergentes (Polvo y Líquido) y tres agentes blanqueadores. Los agentes desinfectantes base Polvo frente a sus respectivas combinaciones base Líquido, presentaron mejor efecto desinfectante. La adición de hipoclorito de sodio, como agente blanqueador, mejoró eficientemente el efecto bactericida y fungicida de ambos detergentes, incluso a temperatura ambiente. En tanto, la adición de percarbonato de sodio mostró mejor efecto desinfectante con el incremento de temperatura (a 40 °C). Por el contrario, la adición de peróxido de hidrógeno, no mejoró

sustancialmente el grado de desinfección. Así, después del hipoclorito de sodio, el percarbonato de sodio se convierte en la mejor elección, ya que además presenta un menor impacto negativo al medio ambiente.

Por último, se aplicó la DEM para evaluar la efectividad del fago P100 en el control de biofilms de *Listeria monocytogenes* sobre superficies de acero inoxidable. El fago P100 fue capaz de disgregar los biofilms a temperatura ambiente. Las mayores reducciones de *L. monocytogenes* en un menor tiempo se obtuvieron con concentraciones de fago mayores a $7 \log_{10}$ UFP ml^{-1} . El método de cultivo mostró reducciones del patógeno a niveles indetectables; sin embargo la tinción vital reveló la presencia de células viables, que representarían un riesgo de contaminación cruzada. El fago P100 puede proporcionar una medida adyuvante para controlar la contaminación de superficies de acero inoxidable con biofilms de *L. monocytogenes*. La DEM resultó ser una buena herramienta para evaluar rápida y adecuadamente el efecto del fago P100.

Abstract

Contaminated surfaces are one of the main routes of transmission of microorganisms throughout the food chain, and are placed as the second most common factor of cross-contamination. In food industry, besides hard surfaces (glass, metal, and organic polymeric materials), staff clothing and various textile materials (synthetic and natural) used during food processing are also considered a potential source to transfer pathogens to food. Therefore, the textile wash process should possess additionally disinfecting effect. In this regard, it is necessary to implement measures to enable an appropriate microbiological control on both types of surfaces, using tools to assess contamination successfully and applying treatments, conventional or alternative, to reduce or eliminate microorganisms efficiently, especially when these are located within a biofilm. An interesting alternative method for controlling microbial contamination is the use of bacteriophages (phages).

In this study, the count of *Staphylococcus aureus* on cotton fabrics obtained by the conventional culture method, the Direct Epifluorescence Microscopic (DEM), and Real-Time PCR (RTi-PCR) were compared. The conventional culture method showed better sensitivity ($0.38 \log_{10} \text{CFU cm}^{-2}$), followed by RTi-PCR ($2.13 \log_{10} \text{CFU cm}^{-2}$). Whereas, DEM showed the lowest sensitivity ($4.12 \log_{10} \text{UFC cm}^{-2}$), and furthermore proved to be laborious for microbiological count in textile fabrics.

Also, we evaluated the disinfection effect of standard washing on *S. aureus* and *Candida albicans* in textile fabrics at various temperatures with eight disinfectant agents resulting from combination of two detergents (Powder and Liquid) and three bleaching agents. Powder-based disinfectant agents generally showed higher disinfection effect than their respective combinations in Liquid-based. Adding sodium hypochlorite as a bleaching agent enhanced efficiently the bactericidal and fungicidal effect of both detergents even at room temperature. Meanwhile, addition of sodium percarbonate improved the disinfectant effectiveness with increasing temperature (40°C). Conversely, the addition of hydrogen peroxide did not substantially improve the degree of disinfection of detergents. Therefore, after the sodium hypochlorite, sodium percarbonate becomes the best choice, since it also has a less negative impact on the environment.

Finally, DEM was applied to evaluate the effectiveness of phage P100 for controlling *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel surfaces. Phage P100 was able to disaggregate the biofilms at room temperature. Greater reductions of *L. monocytogenes* in less time occurred using phages concentrations higher than $7 \log \text{ PFU ml}^{-1}$. Cultivation method showed pathogen reduction to undetectable levels; however vital staining revealed the presence of viable cells, which represent a risk of cross contamination. Our data suggest that the phage P100 may provide an adjuvant measure to control the contamination of stainless steel surfaces with *L. monocytogenes* biofilms. In this study, DEM was a good tool to quickly and accurately assess the effect of phage P100.

Tabla de contenido

| | | |
|-------------|---|-----------|
| I. | Introducción | 1 |
| II. | Objetivos..... | 7 |
| III. | Revisión bibliográfica..... | 11 |
| 1. | Peligros microbiológicos en la industria alimentaria | 13 |
| 2. | Fuentes de contaminación microbiológica en la industria alimentaria..... | 15 |
| 3. | Superficies contaminadas | 17 |
| 3.1. | <i>Superficies textiles en el procesado de los alimentos</i> | <i>17</i> |
| 3.2. | <i>Superficies duras en el procesado de los alimentos.....</i> | <i>20</i> |
| 4. | Limpieza y desinfección en la industria alimentaria | 22 |
| 4.1. | <i>Limpieza</i> | <i>22</i> |
| 4.2. | <i>Desinfección</i> | <i>29</i> |
| 4.3. | <i>Importancia del secado.....</i> | <i>35</i> |
| 5. | Valoración de la eficacia desinfectante | 36 |
| 6. | Resistencia microbiana a los desinfectantes en la industria alimentaria | 37 |
| 7. | Biofilms como mecanismo de defensa | 39 |
| 7.1. | <i>Etapas de la formación del biofilm</i> | <i>39</i> |
| 7.2. | <i>Mecanismos de resistencia de los biofilms</i> | <i>40</i> |
| 7.3. | <i>Patógenos en biofilms.....</i> | <i>41</i> |
| 8. | Bacteriófagos: Un método alternativo para el control y eliminación de biofilms..... | 44 |
| 8.1. | <i>Replicación de los bacteriófagos.....</i> | <i>45</i> |
| 8.2. | <i>Ventajas y desventajas del uso de bacteriófagos</i> | <i>46</i> |
| 8.3. | <i>Susceptibilidad de los biofilms a los bacteriófagos.....</i> | <i>48</i> |
| 8.4. | <i>Aspecto legal sobre el uso de bacteriófagos.....</i> | <i>48</i> |
| 9. | Control microbiológico en superficies | 50 |
| 9.1. | <i>Métodos convencionales.....</i> | <i>50</i> |

| | |
|--|-----------|
| 9.2. Métodos rápidos | 52 |
| IV. Evaluación del método de cultivo convencional, RTi-PCR y DEM para el control microbiológico de superficies textiles..... | 61 |
| 1. Material y Métodos..... | 63 |
| 1.1. Superficies de prueba..... | 63 |
| 1.2. Ceba bacteriana y preparación del inóculo | 63 |
| 1.3. Inoculación y tratamiento de los textiles de prueba..... | 63 |
| 1.4. Evaluación de la carga microbiana en textiles por método de cultivo convencional | 64 |
| 1.5. Evaluación de la carga microbiana en textiles por RTi-PCR..... | 64 |
| 1.6. Evaluación de la carga microbiana en textiles por DEM | 65 |
| 1.7. Análisis estadístico..... | 66 |
| 2. Resultados | 66 |
| 2.1. Carga microbiana inoculada en textiles..... | 66 |
| 2.2. Evaluación de la carga microbiana en textiles por método de cultivo convencional | 66 |
| 2.3. Evaluación de la carga microbiana en textiles por RTi-PCR..... | 66 |
| 2.4. Evaluación de la carga microbiana en textiles por DEM | 67 |
| 2.5. Comparación de RTi-PCR y DEM con el método de cultivo convencional..... | 68 |
| 3. Discusión | 68 |
| V. Efecto desinfectante del lavado estándar sobre <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Candida albicans</i> en superficies textiles..... | 73 |
| 1. Material y Métodos..... | 75 |
| 1.1. Superficies de prueba..... | 75 |
| 1.2. Ceba microbiana y preparación del inóculo..... | 75 |
| 1.3. Inoculación de los textiles de prueba..... | 75 |
| 1.4. Procedimiento de lavado | 76 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1.5. | <i>Agentes desinfectantes</i> | 76 |
| 1.6. | <i>Evaluación de la carga microbiana en textiles</i> | 77 |
| 1.7. | <i>Evaluación de la carga microbiana en las aguas residuales de lavado</i> | 77 |
| 1.8. | <i>Análisis estadístico</i> | 78 |
| 2. | Resultados..... | 79 |
| 2.1. | <i>Carga microbiana en los textiles antes del lavado</i> | 79 |
| 2.2. | <i>Reducción microbiana en los textiles contaminados después del lavado</i> | 79 |
| 2.3. | <i>Transferencia de microorganismos a los textiles estériles</i> | 83 |
| 2.4. | <i>Transferencia de microorganismos a las aguas residuales</i> | 85 |
| 3. | Discusión..... | 88 |
| VI. | Uso de microscopía de epifluorescencia para evaluar la efectividad del fago P100 en el control de biofilms de <i>Listeria monocytogenes</i> sobre superficies de acero inoxidable .. | 97 |
| 1. | Material y Métodos..... | 99 |
| 1.1. | <i>Superficies de prueba</i> | 99 |
| 1.2. | <i>Cepa bacteriana y preparación del inóculo</i> | 99 |
| 1.3. | <i>Formación del biofilm</i> | 99 |
| 1.4. | <i>Fago y tratamientos</i> | 99 |
| 1.5. | <i>Evaluación del biofilm de <i>L. monocytogenes</i> por DEM</i> | 100 |
| 1.6. | <i>Evaluación del biofilm de <i>L. monocytogenes</i> por el método de cultivo</i> | 101 |
| 1.7. | <i>Control del título del fago por el método de doble capa de agar</i> | 101 |
| 1.8. | <i>Comparación del método de cultivo y DEM para la determinación de células viables de <i>L. monocytogenes</i></i> | 101 |
| 1.9. | <i>Análisis estadístico</i> | 102 |
| 2. | Resultados..... | 102 |
| 2.1. | <i>Evaluación del biofilm de <i>L. monocytogenes</i> por DEM</i> | 102 |
| 2.2. | <i>Evaluación del biofilm de <i>L. monocytogenes</i> por el método de cultivo</i> | 104 |

| | | |
|--------------|--|------------|
| 2.3. | <i>Comparación del recuento de células viables por DEM y el método de cultivo ..</i> | 105 |
| 2.4. | <i>Título del fago</i> | 106 |
| 3. | Discusión | 106 |
| VII. | Conclusiones | 113 |
| VIII. | Bibliografía..... | 117 |
| IX. | Anexo..... | 139 |

Lista de abreviaturas y acrónimos

| | |
|--------|--|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ANOVA | Análisis de la varianza |
| APPCC | Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> (Colección Americana de Cultivos Tipo) |
| ATP | <i>Adenosine Triphosphate</i> (Adenosin Trifosfato) |
| a_w | Actividad de agua |
| BAC | Cloruro de benzalconio |
| BHI | <i>Brain Heart Infusion</i> |
| BPH | Buenas Prácticas Higiénicas |
| BPW | <i>Buffered Peptone Water</i> (Agua de Peptona Tamponada) |
| CDC | <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades) |
| CEN | Comité Europeo de Normalización |
| CIP | <i>Cleaning in place</i> (limpieza <i>in situ</i>) |
| C_t | <i>Threshold cycle</i> (ciclo umbral) |
| DEM | <i>Direct Epifluorescence Microscopic</i> (Microscopía de Epifluorescencia Directa) |
| EB | <i>Ethidium bromide</i> (Bromuro de etidio) |
| EE.UU. | Estados Unidos de América |
| EFSA | <i>European Food Safety Authority</i> (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) |

| | |
|-------|---|
| ELFA | <i>Automated Enzyme-Linked Fluorescent Assay</i> (Ensayo Fluorescente Ligado a Enzimas Automatizado) |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzima) |
| EMM | <i>2X Environmental Master Mix</i> |
| EPS | <i>Extracellular Polymeric Substances</i> (Sustancias Poliméricas Extracelulares) |
| ETA | Enfermedades transmitidas por los alimentos |
| FAM | 6-carboxifluoresceína |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> (Administración de Alimentos y Medicamentos) |
| FRET | <i>Fluorescent Resonance Energy Transfer</i> (Transferencia de Energía de Resonancia fluorescente) |
| FSIS | <i>Food Safety and Inspection Service</i> (Servicio de Seguridad Alimentaria e Inspección) |
| GMP | <i>Good Manufacture Practice</i> (Buenas Prácticas de Fabricación) |
| GRAS | <i>Substances Generally Recognized as Safe</i> (Sustancia Generalmente Reconocida como Segura) |
| HP | <i>Hydrogen peroxide</i> (peróxido de hidrógeno) |
| IAC | <i>Internal Amplification Control</i> (Control Interno de Amplificación) |
| ICMSF | <i>International Commission on Microbiological Specifications for Foods</i> (Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos) |
| IMS | <i>Immunomagnetic Separation</i> (Separación Inmunomagnética) |
| MEA | <i>Malt Extract Agar</i> (Agar Extracto de Malta) |
| MOI | <i>Multiplicity of Infection</i> (Multiplicidad de Infección) |

| | |
|---------|--|
| OA | Oxígeno activo |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en Cadena de la Polimerasa) |
| PI | <i>Propidium Iodide</i> (Yoduro de Propidio) |
| QACs | <i>Quaternary Ammonium Compounds</i> (Compuestos de Amonio Cuaternario) |
| RABC | <i>Risk Analysis and Biocontamination Control</i> (Análisis de Riesgo y Control de Biocontaminación) |
| RED | Eficiencia de Reducción |
| RKI | <i>Robert-Koch Institute</i> (Instituto Robert-Koch) |
| RODAC | <i>Replicate Organism Detection and Counting</i> (Detección y Recuento de Microorganismos) |
| RPE | Recuento en placa estándar |
| RTi-PCR | <i>Real-Time PCR</i> (PCR en Tiempo Real) |
| SH | <i>Sodium Hypochlorite</i> (hipoclorito de sodio) |
| SNK | Student-Newman-Keuls |
| SP | <i>Sodium Percarbonate</i> (percarbonato de sodio) |
| TAM | <i>10X Target Assay Mix</i> |
| TAMRA | 6-carboxi-tetrametil-rodamina |
| TFM | Técnica de filtración de membrana |
| TSA | <i>Tryptic Soy Agar</i> (Agar Tripticasa de Soja) |
| TSAYE | <i>TSA with Yeast Extract</i> (TSA con Extracto de Levadura) |
| TSB | <i>Tryptic Soy Broth</i> (Caldo Tripticasa de soja) |
| TSS | <i>Tryptone Saline Solution</i> (Solución Salina Triptona) |
| UE | Unión Europea |

| | |
|------|--|
| UFC | Unidades Formadoras de Colonias |
| UFP | Unidades Formadoras de Placas |
| URL | Unidades Relativas de Luz |
| USDA | <i>United States Department of Agriculture</i> (Departamento de Agricultura de Estados Unidos) |
| VBNC | <i>Viable But Nonculturable</i> (Viable Pero No Cultivable) |
| VIC | 4,7,2'-tricloro-7'-fenil-6-carboxifluoresceína |
| vs. | <i>versus</i> (frente a) |
| WHO | <i>World Health Organization</i> (Organización Mundial de la Salud) |

Lista de figuras

| | |
|--|-----|
| Figura 1. Componentes comunes en las formulaciones de detergentes | 24 |
| Figura 2. Distintos procesos responsables de la formación de biofilms..... | 40 |
| Figura 3. Ciclo lítico del bacteriófago..... | 46 |
| Figura 4. Funcionamiento de un microscopio de epifluorescencia..... | 55 |
| Figura 5. Principio del sistema TaqMan..... | 57 |
| Figura 6. Curva de amplificación de la fluorescencia emitida en RTi-PCR..... | 58 |
| Figura 7. Comparación del recuento bacteriano determinado por método de cultivo, RTi-PCR y DEM en textiles de algodón..... | 67 |
| Figura 8. Textil de algodón inoculado con <i>S. aureus</i> . Imagen digital de epifluorescencia de la tinción con LIVE/DEAD® BacLight™ L13152..... | 68 |
| Figura 9. Reducción de <i>S. aureus</i> sobre superficies textiles después del lavado con diferentes agentes de desinfección a temperatura ambiente, 30 °C y 40 °C..... | 80 |
| Figura 10. Reducción de <i>C. albicans</i> sobre superficies textiles después del lavado con diferentes agentes de desinfección a temperatura ambiente, 30 °C y 40 °C..... | 82 |
| Figura 11. Transferencia de <i>S. aureus</i> a superficies textiles estériles después del lavado con diferentes agentes de desinfección a temperatura ambiente, 30 °C y 40 °C..... | 84 |
| Figura 12. Transferencia de <i>C. albicans</i> a superficies textiles estériles después del lavado con diferentes agentes de desinfección a temperatura ambiente, 30 °C y 40 °C..... | 86 |
| Figura 13. Reducción de <i>L. monocytogenes</i> en superficies de acero inoxidable con diferentes concentraciones de fago P100 durante 48 h. Panel A: Cálculo de células viables por DEM (límite de detección igual a 2,71 log ₁₀ células cm ⁻²). Panel B: Cálculo por método de cultivo (límite de detección igual a 0,25 log ₁₀ UFC cm ⁻²)..... | 103 |

Figura 14. Evaluación de la estructura de biofilms de *L. monocytogenes* sobre superficies de acero inoxidable tratados con $8 \log_{10}$ UFP ml^{-1} de fago P100, evaluados a 0, 2 y 8 h. Imágenes digitales de epifluorescencia de la tinción con LIVE/DEAD® BacLight™ L13152. 104

Figura 15. Estado vital de *L. monocytogenes* en biofilms tratados con 5, 6, 7 y $8 \log_{10}$ UFP ml^{-1} de fago P100 a las 48 h de exposición. Imágenes digitales de epifluorescencia de la tinción con LIVE/DEAD® BacLight™ L13152 105

Figura 16. Seguimiento del título del fago P100 durante el tratamiento de biofilms de *L. monocytogenes* con concentraciones de 5, 6, 7 y $8 \log_{10}$ UFP ml^{-1} de fago P100, durante 48 h 106

Lista de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Brotes de origen alimentario de etiología bacteriana causados por contaminaciones cruzadas con superficies de trabajo | 18 |
| Tabla 2. Criterios microbiológicos en paños de limpieza | 20 |
| Tabla 3. Efecto del uso de temperatura elevada sobre la eficacia de la limpieza..... | 29 |
| Tabla 4. Valores recomendados para los puntos críticos de control en lavanderías implicadas en la limpieza de textiles de la industria alimentaria, según RAL-GZ 992/3..... | 30 |
| Tabla 5. Criterios microbiológicos de hisopados ambientales | 31 |
| Tabla 6. Mecanismo de acción de los desinfectantes. | 32 |
| Tabla 7. Superficies del ambiente de procesado de los alimentos contaminadas con <i>L. monocytogenes</i> | 43 |
| Tabla 8. Criterios y fluoróforos utilizados para evaluar la viabilidad de los microorganismos. | 54 |
| Tabla 9. Descripción de agentes de lavado comerciales usados como agentes desinfectantes. | 77 |
| Tabla 10. Transferencia de <i>S. aureus</i> y <i>C. albicans</i> a las aguas residuales después del lavado con diferentes agentes desinfectantes a tres temperaturas. Agentes desinfectantes: PW, PW-SH, PW-SP, PW-HP, LQ, LQ-SH, LQ-SP y LQ-HP. | 87 |

I. Introducción

Las superficies contaminadas representan una de las principales vías de transmisión de microorganismos a lo largo de la cadena alimentaria (Mostert *et al.*, 2005) y se sitúa como el segundo factor más frecuente de contaminación cruzada de los alimentos (Tirado y Schmidt, 2001; Reij y Den Aantrekker, 2004). La Organización Mundial de la Salud (WHO, *World Health Organization*) estima que las enfermedades diarreicas transmitidas por alimentos y agua causan la muerte de aproximadamente 2,2 millones de personas anualmente, la mayoría niños (WHO, 2002). Actualmente una de las mayores preocupaciones en la industria alimentaria es la contaminación de los alimentos por patógenos bacterianos debido a sus consecuencias en la salud pública, principalmente por la generación de brotes, los que a su vez afectan el comercio, el turismo y conllevan a demandas legales o a pérdida del empleo (Lequette *et al.*, 2010).

Los microorganismos pueden crecer sobre todo tipo de superficies como los materiales textiles y fibrosos (tejidos poliméricos comunes, tejidos de algodón, poliéster, rayón, nylon, lana y ésteres de celulosa) y superficies duras (vidrio, metal y materiales poliméricos) (Lynn, 2009). El desarrollo de los microorganismos depende de varios factores, entre ellos la temperatura, humedad/actividad de agua (a_w), pH, disponibilidad de nutrientes, etc. En este sentido, los restos que deja el paso de material alimenticio sobre una superficie favorecen el desarrollo de los microorganismos, que con el tiempo pueden afectar la seguridad y calidad del alimento (Lelieveld *et al.*, 2003). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, *European Food Safety Authority*) informó que durante el 2010 ocurrieron 5 262 brotes de enfermedades transmitidos por los alimentos en Europa. Donde el mayor número de casos correspondió a salmonelosis (a pesar del significativo descenso observado en los últimos años), seguido por las siguientes enfermedades de etiología bacteriana: campilobacteriosis, brucelosis y listeriosis (Schmidt y Gervelmeyer, 2003; EFSA y ECDC, 2012).

En la industria alimentaria, además de las superficies duras de trabajo, la ropa del personal y otros materiales textiles utilizados durante el procesado de los alimentos también son considerados una fuente potencial para transferir microorganismos patógenos a los alimentos (Christison *et al.*, 2007; Todd *et al.*, 2010b). Diversos estudios demuestran que los textiles usados en los ambientes de procesado de los alimentos pueden estar altamente contaminados con microorganismos (Rayner *et al.*, 2004; Little y Sagoo, 2009), como es el

caso de los paños de limpieza que pueden actuar como fuente y vehículo de diseminación de microorganismos (Moore y Griffith, 2006).

Debido a que los productos de interés pueden ser fácilmente recontaminados, ya sea bien por las superficies de trabajo, ropa de trabajo o utensilios de limpieza, es necesario adherirse estrictamente a las normas de higiene, buenas prácticas de higiene (BPH), buenas prácticas de fabricación (GMP, *Good Manufacture Practice*) y la aplicación estricta del sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) a lo largo del proceso de elaboración (Reij y Den Aantrekker, 2004). Un prerrequisito fundamental es la aplicación de un programa de limpieza y desinfección que tiene como propósito garantizar la seguridad y la salubridad de los productos alimenticios (Lelieveld *et al.*, 2003).

La limpieza tiene por objetivo eliminar toda suciedad visible y/o invisible que pueda encontrarse sobre una superficie (Leveau y Bouix, 2002), para que la desinfección pueda reducir a un nivel aceptable la cantidad de microorganismos presentes, y/o prevenir el desarrollo microbiano en la superficie durante el periodo de inter-producción (Lelieveld *et al.*, 2003; Mostert *et al.*, 2005). En el proceso de limpieza uno de los factores que debe tenerse en cuenta es la naturaleza de la suciedad a ser eliminada (Sakiyama *et al.*, 1998). De esto depende el tipo y la cantidad de producto a utilizar (Matias *et al.*, 2013). Así, los detergentes alcalinos son eficaces para la eliminación de sustancias orgánicas y los ácidos para remover depósitos inorgánicos (Sakiyama *et al.*, 1998). Para que la posterior etapa de desinfección sea eficaz, se debe asegurar el contacto directo del desinfectante con los microorganismos (Wildbrett, 2000). La elección de un desinfectante debe considerar la actividad contra el patógeno diana, la seguridad del usuario y la compatibilidad con el tipo de superficie; además, del coste (Fraise, 1999).

En el caso de los textiles, debido a que pueden contener toda clase de microorganismos (bacterias, virus y hongos), es importante que los procesos de lavado no sólo tengan un efecto de limpieza, sino también antimicrobiano (Fijan *et al.*, 2008). En los últimos 20 años, con la finalidad de conseguir un ahorro económico y la protección del medio ambiente, se ha optado por lavados con bajas temperatura (Heinzel *et al.*, 2010) utilizando productos químicos no tóxicos (Wieprecht *et al.*, 2007). Sin embargo, la disminución en la temperatura de lavado puede favorecer la posibilidad de sobrevivir a los microorganismos patógenos

(Fijan *et al.*, 2007). Por tanto, se deben evaluar las condiciones de lavado para determinar si son efectivos en la eliminación de microorganismos, especialmente en textiles usados en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética, así como en el sector hospitalario (Anónimo, 2003).

Una herramienta importante en los procesos industriales es el control microbiológico. Los métodos más utilizados para la detección de patógenos son los convencionales basados en el cultivo del microorganismo. En general, estos métodos son muy laboriosos, consumen mucho tiempo y requieren procesos de enriquecimiento, aislamiento en medios selectivos, pruebas bioquímicas y serología (Seo *et al.*, 2004). Además, no permiten el desarrollo de todos los microorganismos (Lignell *et al.*, 2008), especialmente de aquellos que se encuentran en un estado viable pero no cultivable (VBNC, *Viable But Nonculturable*), ya que representan un riesgo importante debido a que pueden recuperarse y ser causantes de infección (Oliver, 2005; Lindback *et al.*, 2009). Así, con el fin de realizar una mejor evaluación de las poblaciones microbianas, se ha incrementado el uso de técnicas rápidas e independientes del cultivo (Hein *et al.*, 2001; Chen y Li, 2005), incluso algunos investigadores proponen el uso de varios métodos indicadores de viabilidad para tener alguna certeza sobre el estado fisiológico de una bacteria (Berney *et al.*, 2006).

Las superficies de contacto con los alimentos pueden permitir la adhesión de microorganismos con el subsecuente desarrollo de biofilms, convirtiéndose en una fuente persistente de contaminación para los alimentos (Wong y Amy, 1998; Yang *et al.*, 2009). Una característica del biofilm es que, una vez que se ha desarrollado sobre el alimento o sobre la superficie, es difícil de eliminar completamente usando procesos clásicos de limpieza y desinfección (Tompkin, 2002; Baumann *et al.*, 2009). En consecuencia, existe la necesidad de mejorar los métodos para el control de la contaminación. Una opción interesante es el uso de bacteriófagos, que se presentan como enemigos naturales de las bacterias, y atacan de forma específica a los patógenos diana sin comprometer la viabilidad de la flora en el hábitat. Estas características los convierten en agentes antimicrobianos atractivos para ser usados en superficies de trabajo o alimentos (Carlton *et al.*, 2005; Guenther *et al.*, 2009; El-Shibiny *et al.*, 2009), además, los animales y las personas no presentan efectos adversos a los bacteriófagos (Sulakvelidze *et al.*, 2001; Bruttin y Brussow, 2005; Carlton *et al.*, 2005; Rozema *et al.*, 2009).

II. Objetivos

Los objetivos del presente trabajo fueron:

1. Objetivo general:

Aplicar métodos de análisis convencionales, rápidos y alternativos para el control microbiológico de la higiene en diferentes tipos de superficies.

2. Objetivos específicos:

- Aplicación y comparación del método de cultivo convencional, la microscopía de epifluorescencia directa y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para evaluar el recuento bacteriano en superficies textiles. Previa puesta a punto de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con el kit TaqMan® *Staphylococcus aureus*.
- Aplicación y evaluación del efecto desinfectante de diferentes procesos de lavado estándar sobre *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* en superficies textiles para determinar la eficiencia de reducción microbiana en los textiles contaminados; además, la evaluación de la transferencia microbiana desde las superficies textiles contaminadas a textiles estériles y a aguas residuales (lavado y enjuague).
- Aplicación de la microscopía de epifluorescencia directa para evaluar la efectividad del bacteriófago P100 en el control de biofilms de *Listeria monocytogenes* sobre superficies de acero inoxidable. Previa implementación de la metodología para la detección y cuantificación de fagos en superficies de acero inoxidable.

III. Revisión bibliográfica

1. Peligros microbiológicos en la industria alimentaria

Los principales tipos de contaminantes en los alimentos suelen ser físicos, químicos y microbiológicos (Lelieveld *et al.*, 2003), siendo estos últimos los causantes de la mayoría de brotes de origen alimentario (Mostert *et al.*, 2005). Cualquier persona está en riesgo de contraer una enfermedad de origen alimentario. Sin embargo, los recién nacidos, niños pequeños, mujeres embarazadas y personas con el sistema inmune debilitado, presentan mayor riesgo de sufrir la enfermedad en su forma más grave o incluso puede resultar mortal (USDA, 2011).

La WHO define a las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) como enfermedades, generalmente de naturaleza infecciosa o tóxica, originadas por agentes que ingresan al cuerpo durante la ingestión de alimentos (WHO, 2007). En los Estados Unidos de América (EE.UU.), la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, *Food and Drug Administration*) y el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, *United States Department of Agriculture*) son las principales agencias del gobierno federal responsables de la regulación frente a los alimentos consumidos, entre otras cosas. Asimismo, en la Unión Europea (UE), la EFSA es la delegada de la evaluación y la comunicación del riesgo en relación a la seguridad de alimentos y piensos (Lelieveld *et al.*, 2003).

En los países industrializados, las bacterias patógenas son la causa más frecuente de enfermedades de origen alimentario (ICMSF, 2004). Y el lugar más común donde se originan los brotes de origen alimentario es el hogar (46,4%), seguido de los restaurantes/café, etc. (19,8%) y escuelas (6,2%) (CDC, 2007). Consecuentemente, la contaminación bacteriana representa la mayor preocupación de la industria alimentaria debido a sus graves consecuencias, tanto de salud pública como económicas (Lequette *et al.*, 2010). En los EE.UU., las enfermedades de origen alimentario, originadas por los principales patógenos, generan un coste de hasta \$35 billones anuales en gastos médicos, además de la pérdida de productividad laboral (WHO, 2007).

La WHO estima que las enfermedades diarreicas transmitidas por los alimentos y el agua causan la muerte de aproximadamente 2,2 millones de personas anualmente, la mayoría niños (WHO, 2002). Sólo en los EE.UU., el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, *Centers for Disease Control and Prevention*) estima que cada año 47,8

millones de personas enferma, 127 839 son hospitalizados y 3 037 muere por microorganismos transmitidos por los alimentos, siendo los causantes de la mayoría de las muertes *Salmonella* no tifoidea, *Toxoplasma*, *Listeria* y norovirus (CDC, 2011). En la UE, la EFSA informó que durante el 2010 ocurrieron 5 262 brotes de enfermedades transmitidos por los alimentos, que causaron 43 473 personas enfermas, 4 695 hospitalizaciones y 25 muertes, con *Salmonella* como la principal causa de los brotes (EFSA y ECDC, 2012).

Las principales bacterias transmitidas por los alimentos son *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Brucella* spp. y *Listeria* spp., siendo la enfermedad más frecuente la salmonelosis, a pesar de observarse en los últimos años un descenso significativo en el número de casos (EFSA y ECDC, 2012). Sin embargo, a medida que los métodos de detección mejoran y a la vez son más accesibles, se está considerando a los virus como la principal causa de gastroenteritis no bacteriana (ICMSF, 2004), ya que representan aproximadamente más de la mitad de las enfermedades de origen alimentario, principalmente en EE.UU. A pesar de ésta situación los virus entéricos normalmente no son evaluados en las muestras ambientales y de alimentos (Hirneisen *et al.*, 2010).

Otros contaminantes microbiológicos de los alimentos que presentan un gran potencial para causar enfermedades son los protozoos, como: *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Giardia*, y *Toxoplasma* (Dawson, 2005). Además, existe evidencia de la interacción entre algunos protozoarios y bacterias patógenas, tales como *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, ya que pueden permanecer viables y multiplicarse en el interior de los protozoarios, y posteriormente ser liberadas al exterior por medio de vesículas (Gourabathini *et al.*, 2008).

Las aminas biógenas producidas por algunos microorganismos también pueden originar problemas en la salud humana y en la calidad de los alimentos. Estas son producidas por cepas bacterianas específicas que tienen la capacidad de descarboxilar aminoácidos (Ladero *et al.*, 2010) y entre las más importantes se encuentran la histamina, putrescina, cadaverina, tiramina, triptamina, fenil etilamina, espermina y espermidina (Onal, 2007). La producción de aminas biógenas dependerá de los microorganismos que predominen en la matriz del alimento, así en los alimentos fermentados las bacterias ácido lácticas son las principales

productoras de histamina (Russo *et al.*, 2010), mientras en productos de pescado lo son las bacterias entéricas gram negativas (Landete *et al.*, 2007).

Otras toxinas de interés en la inocuidad alimentaria son las toxinas naturales como las micotoxinas y biotoxinas marinas (WHO, 2007). Las micotoxinas son metabolitos de los hongos capaces de tener efectos tóxicos agudos, carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, inmunotóxicos y estrogénicos en humanos y animales (Van Egmond *et al.*, 2007). Mientras que las biotoxinas marinas son producidas por varias especies de algas, se acumulan en moluscos como mejillones, ostras y vieiras, y son responsables de aproximadamente 60 000 intoxicaciones anuales a nivel mundial (Gerssen *et al.*, 2010). Los mariscos contaminados con biotoxinas marinas pueden ocasionar una variedad de enfermedades gastrointestinales y neurológicas (Mohd Syaifudin *et al.*, 2009).

No obstante, es importante mencionar que en muchos casos el agente patógeno responsable y/o los alimentos implicados son desconocidos y en el 75% de hospitalizaciones realizadas no se identifica la etiología específica de los casos (Reij y Den Aantrekker, 2004).

2. Fuentes de contaminación microbiológica en la industria alimentaria

Tradicionalmente, la atención de los microbiólogos se ha dirigido hacia la ecología de los microorganismos en las materias primas y en los productos terminados (ICMSF, 2004). No obstante, la relativa falta de asociación específica entre el tipo de alimento y los microorganismos patógenos que originan los brotes de enfermedades de origen alimentario, destacan el papel potencial de la contaminación cruzada, contaminación ambiental y el papel del manipulador infectado a lo largo de la cadena de producción (Greig y Ravel, 2009).

Los alimentos pueden contaminarse durante la recolección de las materias primas, el almacenamiento y el transporte a la fábrica, así como durante la transformación en productos terminados (Lelieveld *et al.*, 2003). Asimismo, el producto final puede ser recontaminado posteriormente durante su transporte y almacenamiento en las tiendas y/o durante su almacenamiento y en la preparación de alimentos por los consumidores (Mostert *et al.*, 2005). En la industria alimentaria, los factores que contribuyen más frecuentemente en la transmisión de microorganismos patógenos son la contaminación por personal (9,2%),

seguido por los equipos contaminados (5,7%) y el uso de salas inadecuadas para el procesamiento o almacenamiento (4,2%) (Tirado y Schmidt, 2001; Reij y Den Aantrekker, 2004).

Personal. De todos los medios viables de exposición de los alimentos a los microorganismos, además del alimento en sí, las personas son la fuente de mayor contaminación (Vasconcellos, 2004). Las personas son portadoras naturales de muchos microorganismos, en el cabello, piel, membranas mucosas, tracto digestivo, heridas, infecciones y ropa (Mostert *et al.*, 2005). Sin embargo, independientemente del origen de la contaminación, es más probable que los patógenos se transmitan a través de las manos tocando una variedad de superficies (Todd *et al.*, 2008), que pueden estar contaminadas con *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes*, coliformes y estafilococos, *E. coli* y *Salmonella* (Todd *et al.*, 2010a). Por tanto, el lavado frecuente de las manos y el secado son necesarios durante todas las fases de preparación del alimento (Michaels *et al.*, 2004).

Aire. En el procesamiento de productos alimenticios a menudo existe la formación de polvo, partículas y gotas de agua (aerosoles) que son liberadas a la atmósfera, y participan en la contaminación cruzada del aire al alimento (Zorman y Jeršek, 2008; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2008). Sin embargo, la distribución de los patógenos a través de aerosoles es probablemente más importante que a través del polvo (Pearce *et al.*, 2006). En general, el papel que puede desempeñar el aire como fuente de contaminación directa del alimento suele sobreestimarse y no es tan importante como otras posibilidades (ICMSF, 2004). No obstante, la calidad del aire es crucial en ocasiones específicas como en el envasado aséptico, el enfriamiento del alimento por aire o en las operaciones de deshidratación por aire o transporte neumático (ICMSF, 2004).

Agua. El agua se usa ampliamente en la industria alimentaria en muchos de los métodos de procesamiento del alimento como en el remojo, lavado, enjuague, escaldado, calentamiento, pasteurización, refrigeración, enfriamiento, producción de vapor, como un ingrediente, además para la limpieza y desinfección (Casani *et al.*, 2005). A pesar de las consideraciones que se tienen para mejorar la calidad del agua antes de su uso, el agua puede contaminarse durante las operaciones en la planta y posteriormente servir como una fuente de contaminación de patógenos si no es controlada (ICMSF, 2004). Una de las vías de

contaminación es por medio del agua en forma de aerosol. Los aerosoles generados pueden dispersar microorganismos en un área extensa y pueden permanecer suspendidos por largos periodos de tiempo (Gibson *et al.*, 1999).

Plagas. Las aves, insectos y roedores son un problema potencial de contaminación, porque estos pueden actuar como vehículos en la transmisión de patógenos. Por este motivo, los edificios deben ser diseñados para mantenerlos fuera (Lelieveld *et al.*, 2003; ICMSF, 2004).

Superficies. Es el segundo factor más frecuente en la contaminación cruzada de los alimentos (Tirado y Schmidt, 2001). La ropa del personal y otras superficies textiles utilizadas durante el procesado de los alimentos también participan en la transferencia de microorganismos patógenos a los alimentos (Christison *et al.*, 2007; Todd *et al.*, 2010b). La **Tabla 1** muestra algunos ejemplos en donde las superficies de las instalaciones, equipos, utensilios, ropa y paños de limpieza han sido identificadas como posibles fuentes de patógenos en brotes de origen alimentario [Modificado de (Reij y Den Aantrekker, 2004)].

3. Superficies contaminadas

Las superficies sólidas utilizadas en la industria alimentaria varían ampliamente en su composición química y en la configuración de la superficie. Sin embargo, con algunas excepciones, se pueden clasificar principalmente en dos grupos: materiales textiles y superficies duras. Dentro de los materiales textiles los más comunes son los tejidos poliméricos: algodón, poliéster, rayón, *nylon*, lana y ésteres de celulosa. Mientras que las superficies duras más importantes son: el vidrio, metal y materiales poliméricos orgánicos como las superficies pintadas, linóleo y azulejos de plástico (Lynn, 2009).

3.1. Superficies textiles en el procesado de los alimentos

En el procesamiento de alimentos, las superficies textiles son utilizadas para la protección del personal (prendas de vestir) y la limpieza del entorno (pañós, toallas, etc.) (Cardinale *et al.*, 2005).

Entre los agentes infecciosos que pueden contaminar la ropa del personal se encuentran las bacterias entéricas, como *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *E. coli* (incluyendo *E. coli*

Tabla 1. Brotes de origen alimentario de etiología bacteriana causados por contaminaciones cruzadas con superficies de trabajo [Modificado de (Reij y Den Aantrekker, 2004)].

| Patógeno | Alimento implicado | Probable fuente de contaminación | Referencia |
|-----------------------------------|------------------------------|---|------------------------------------|
| <i>Bacillus cereus</i> | Ningún alimento específico | Platos, cucharas, palillos y paños de cocina contaminados con agua subterránea | (Choi <i>et al.</i> , 2011) |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | Lechuga o lasaña | Contaminación de manos, utensilios de cocina y encimera con pollo crudo | (Graves <i>et al.</i> , 1998) |
| <i>E. coli</i> O157:H7 | Yogur aromatizado | Bomba utilizada anteriormente para leche sin pasteurizar, con zonificación insuficiente | (Morgan <i>et al.</i> , 1993) |
| | Diferentes alimentos | Manejo inadecuado de utensilios | (Banatvala <i>et al.</i> , 1996) |
| <i>L. monocytogenes</i> | Carne | Uso de la misma ropa de trabajo, tanto para manipular alimentos crudos como cocidos | (Todd <i>et al.</i> , 2010b) |
| | Mantequilla | Ambiente de procesado | (Lyytikäinen <i>et al.</i> , 2000) |
| | Salchichas | Máquina de envasado y embalaje | (Goulet <i>et al.</i> , 1998) |
| <i>Salmonella</i> | Carne cocida | Máquina de cortado | (Lunden <i>et al.</i> , 2002) |
| | Sándwich de pavo | Ropa del personal contaminada | (Todd <i>et al.</i> , 2009) |
| <i>Salmonella agona</i> | Cereales para el desayuno | Ambiente de las líneas de procesamiento y equipos | (Breuer, 1999) |
| <i>Salmonella berta</i> | Queso de pasta blanda | Cubos de maduración del queso usados anteriormente para canales de pollo | (Ellis <i>et al.</i> , 1998) |
| <i>Salmonella ealing</i> | Formulaciones infantiles | Ambiente de las líneas de procesamiento y equipos | (Rowe <i>et al.</i> , 1987) |
| <i>Salmonella enteritidis</i> | Helado | Cisterna para transportar helados, usada anteriormente para huevos crudos | (Hennessy <i>et al.</i> , 1996) |
| <i>Salmonella enteritidis</i> PT4 | Pasteles | Recipientes de mezcla, bolsa para crema y boquillas sin limpiar | (Evans <i>et al.</i> , 1996) |
| <i>Salmonella</i> Typhimurium | Jamón cocido en rodajas | Recipientes usados anteriormente para el curado de carne de cerdo cruda | (Llewellyn <i>et al.</i> , 1998) |
| <i>Vibrio cholerae</i> | Pudín de chocolate | Paños de cocina lavados en agua de río contaminado | (Hankin, 1896) |
| Virus Norwalk | Sándwich de ensalada de pavo | Ropa de personal contaminada con vómito | (Lo <i>et al.</i> , 1994) |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | Leche pasteurizada | Contaminación post-procesado del medio ambiente | (Ackers <i>et al.</i> , 2000) |

O157) y *Clostridium difficile*, además, de cepas virales respiratorias y entéricas, como norovirus, rotavirus, adenovirus y astrovirus (Bloomfield *et al.*, 2011). Existen evidencias que revelan que durante las actividades de trabajo, los delantales de los manipuladores llegan a contaminarse con un elevado número de coliformes totales y *S. aureus* (Lues y Van Tonder,

2007). Además, de la ropa de trabajadores de plantas procesadoras de carne también se han aislado patógenos como *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* (Kahraman *et al.*, 2010).

En general, los patógenos que se encuentran en la ropa pueden ser fácilmente transferidos a los alimentos (Todd *et al.*, 2010b). Existen casos publicados que confirman que la ropa de los manipuladores de alimentos ha sido la fuente de infección y modo de propagación en diversos brotes bacterianos, así como también virales (Todd *et al.*, 2009; Todd *et al.*, 2010b), debido principalmente a la falta de sustitución por ropa limpia, previo a o durante la jornada laboral (Lo *et al.*, 1994; Cardinale *et al.*, 2005).

Por tanto, se debe establecer la frecuencia del cambio de ropa y el grado de descontaminación durante el lavado teniendo en cuenta el tipo de alimento que se produce (Lelieveld *et al.*, 2003). En las plantas procesadoras de alimentos, una de las herramientas más exitosas de las GMP, es el control de material contaminado a través de la prohibición del uso de prendas de vestir de calle (Giambrone, 2010).

Los paños de tela, toallas y esponjas utilizados para manipular objetos calientes, limpiar manos y superficies de contacto alimentarias, también son fácilmente contaminados con diversos microorganismos, y asimismo, son fuente y vehículos diseminadores de microorganismos (Hilton y Austin, 2000; Sattar *et al.*, 2001; Christison *et al.*, 2007; Little y Sagoo, 2009; Todd *et al.*, 2010b). Incluso la carga microbiana en este tipo de superficies puede ser similar a la encontrada en los utensilios usados para limpiar suelos (Christison *et al.*, 2007).

Entre la carga microbiana que contamina las bayetas, paños de limpieza y toallas de mano se han encontrado microorganismos potencialmente patógenos de origen alimentario, como *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus* spp., *B. cereus*, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* (Christison *et al.*, 2007; Redmond y Griffith, 2009; Little y Sagoo, 2009). Por lo anterior, es recomendable que las esponjas y paños, al estar frecuentemente contaminados, deberían ser limpiados y desinfectados regularmente (Scott, 2000). La **Tabla 2** muestra los criterios microbiológicos para calificar la calidad microbiológica de los paños de limpieza (Little y Sagoo, 2009).

Tabla 2. Criterios microbiológicos en paños de limpieza (Little y Sagoo, 2009).

| Muestra | Microorganismos | Calidad microbiológica | |
|-------------------|----------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| | | Satisfactorio | Insatisfactorio |
| Paños de limpieza | Recuento de aerobios | $< 10^5$ CFU cm ⁻² | $\geq 10^5$ CFU cm ⁻² |
| | Enterobacteriaceae | $< 10^4$ CFU cm ⁻² | $\geq 10^4$ CFU cm ⁻² |
| | <i>E. coli</i> | No detectado | Detectado |
| | <i>S. aureus</i> | No detectado | Detectado |

3.2. Superficies duras en el procesado de los alimentos

Entre las superficies duras se encuentran las superficies de contacto alimentarias, como equipos, mesas y utensilios usados en el procesado de los alimentos.

La contaminación de los equipos puede ocurrir durante la producción, cuando el paso de material alimenticio sobre una superficie deja residuos que favorecen el desarrollo de los microorganismos, que con el tiempo pueden alcanzar una cantidad suficiente para afectar la seguridad y la calidad del alimento (Lelieveld *et al.*, 2003; Vasconcellos, 2004). Esta situación representa un riesgo, debido a que pueden actuar como fuente potencial de transmisión de patógenos (Oliveira *et al.*, 2007). Asimismo, es importante destacar que las superficies duras que no están en contacto directo con el alimento, como los pisos, paredes, techos, vigas y estructuras de apoyo, también se pueden comportar como reservorios potenciales de contaminación microbiana y representar un riesgo en la transmisión de patógenos (Mostert *et al.*, 2005).

Existe evidencia, que las superficies contaminadas de equipos, como máquinas de corte o utensilios, contaminan los alimentos mediante la transferencia de microorganismos patógenos, como ha sido el caso de *L. monocytogenes* transferida a embutidos o *Salmonella enterica* a lechuga (Lin *et al.*, 2006; Ravishankar *et al.*, 2010). Además, se han encontrado recuentos microbiológicos similares entre una superficie contaminada y el producto final después de una contaminación cruzada (Naidoo y Lindsay, 2010).

Un buen diseño higiénico y un mantenimiento adecuado son factores cruciales para evitar la contaminación de los equipos utilizados para el procesado de los alimentos. Es importante evitar errores en el diseño o en la instalación de los equipos (Reij y Den Aantrekker, 2004). Además, estos deben ser mantenidos en buenas condiciones para prevenir ralladuras que

puedan albergar microorganismos (Scott, 2000). En general, las superficies lisas se limpian y desinfectan mejor que las rugosas y agrietadas (Wildbrett, 2000). La UE exige el cumplimiento de la norma EN 1672-2, referente al diseño de maquinarias para alimentos, como medida para prevenir la proliferación de microorganismos patógenos y alterantes en la industria alimentaria (Lelieveld *et al.*, 2003).

Uno de los factores que intervienen en la contaminación cruzada es la viabilidad de los microorganismos. Debido a que estos pueden permanecer viables en las superficies por largos periodos de tiempo y representar un peligro de contaminación durante este periodo (Kusumaningrum *et al.*, 2003; Dawson *et al.*, 2007). El tiempo de supervivencia varía entre microorganismos, mientras algunos pueden sobrevivir días, otros pueden permanecer viables por meses. Algunas especies de *Candida* pueden permanecer viables hasta por 14 días en superficies secas de acero inoxidable (Traoré *et al.*, 2002). *Salmonella* Typhimurium puede sobrevivir hasta 4 semanas en superficies secas (Dawson *et al.*, 2007). Muchas especies de bacterias gram negativas, como *Acinetobacter* spp., *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* o *Shigella* spp., también pueden sobrevivir por meses en superficies secas (Kramer *et al.*, 2006).

La supervivencia de los microorganismos depende de las condiciones del entorno, como temperatura, a_w , pH, disponibilidad de nutrientes, presencia o ausencia de oxígeno y componentes inhibitorios como los conservantes (Todd *et al.*, 2009; Møretrø *et al.*, 2010). Así como del tipo de material de los equipos, utensilios y superficies, porque esta característica es esencial en el proceso de adhesión de los microorganismos y en la formación de biofilms (Oulahal *et al.*, 2008; Careli *et al.*, 2009). En este sentido la matriz del alimento residual sobre una superficie también favorece la supervivencia de los microorganismos, por ejemplo un alto contenido proteico (Oulahal *et al.*, 2008; Takahashi *et al.*, 2010).

Otro punto a considerar, es la adaptación de los microorganismos a condiciones físicas extremas, haciéndolos más tolerantes, lo que les permite sobrevivir por más tiempo sobre las superficies (Beales, 2004). Por ejemplo, ciertos microorganismos pueden adaptarse a la supervivencia en ambientes ácidos o a la desecación, este último mediante la síntesis de

disacáridos de sacarosa, especialmente, la trehalosa que actúa como un osmoprotector (Ramos *et al.*, 2001; Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2009).

La experiencia indica que la aplicación óptima de un plan de APPCC o un programa de GMP no garantiza definitivamente que el alimento no se contaminará, que es posible reducir, pero no impedir o eliminar la posibilidad de que un alimento se contamine cuando queda expuesto al entorno donde se está procesando (ICMSF, 2004).

4. Limpieza y desinfección en la industria alimentaria

La higiene de los alimentos se define como todas las condiciones y medidas necesarias para asegurar la inocuidad y la aptitud de los alimentos en todas las fases de la cadena alimentaria (Codex Alimentarius Commission, 2003). Los procesos de limpieza y desinfección en la industria alimentaria tienen como objetivo la remoción de microorganismos y materiales que favorecen el desarrollo microbiano. Esto conduce al incremento de la vida útil del producto, y a su vez mantener los equipos y superficies en buen estado. Finalmente, proporciona un ambiente de trabajo seguro y limpio para los empleados (Lelieveld *et al.*, 2003).

Una higiene alimentaria deficiente contribuye a las enfermedades de origen alimentario, hasta en un 39% de las infecciones (Scott, 2000). Por este motivo, en un intento por reducir la morbilidad de las ETA, se ha alentado a todos los sectores de la cadena de producción a la mejora de la higiene y a la incorporación activa de enfoques sobre inocuidad alimentaria (Newell *et al.*, 2010). Basándose en la implementación y aplicación de medidas preventivas generales tales como BPH y GMP en la higiene básica de la elaboración de alimentos (Reij y Den Aantrekker, 2004).

4.1. Limpieza

La limpieza consiste en eliminar de una superficie dada, toda suciedad visible o invisible que pueda encontrarse sobre la misma. Esta es realizada por la “detergencia”, acción donde las suciedades son separadas de su sustrato y puestas en solución o en dispersión (Leveau y Bouix, 2002). Además, la limpieza es necesaria para hacer eficaz la desinfección subsiguiente (Wildbrett, 2000).

En el proceso de limpieza uno de los factores que debe tenerse en cuenta para la elección del producto a usar, es la naturaleza de la suciedad a ser eliminada. Así, los detergentes alcalinos son eficaces para la eliminación de sustancias orgánicas y los ácidos para remover depósitos inorgánicos (Sakiyama *et al.*, 1998; Matias *et al.*, 2013).

Todos los sistemas de limpieza dependen de una o de la combinación de tres acciones básicas (Durkee, 2006):

- Acción *mecánica*, como la limpieza abrasiva de superficies.
- Acción *térmica*, cuando se usa calor.
- Acción *química*, como los detergentes, álcalis o ácidos.

4.1.1. Limpieza de superficies textiles

La dureza de la superficie de la fibra, varía no sólo con la fibra base, sino también con el acabado de la superficie, que afecta tanto al grado con que se ensucia la superficie como a la remoción de la misma. En general, los acabados suaves, recogen y retienen la suciedad más fácilmente que los acabados duros, ya que las superficies suaves permiten una mayor superficie de contacto con la suciedad (Lynn, 2009).

Para la limpieza de los textiles se utilizan detergentes de lavandería, que son combinaciones de compuestos químicos que asociados a los factores: tiempo, temperatura, y acción mecánica, permiten liberar a una superficie de su suciedad (Leveau y Bouix, 2002; Altmajer-Vaz, 2004). Los detergentes de uso general son detergentes de alta potencia que se pueden utilizar con muchos tipos de telas/textiles (Lynn, 2009). La composición del detergente para textiles, en general, contiene: tensioactivos, coadyuvantes de formulación (*builders*), enzimas, agentes blanqueadores y otros aditivos menores, tales como agentes de dispersión, suavizantes de tejidos y abrillantadores ópticos (Yu *et al.*, 2008). Los tensioactivos y los coadyuvantes de formulación son los dos ingredientes más importantes en los productos de limpieza (Yu *et al.*, 2008; Lynn, 2009).

La **Figura 1** muestra los componentes típicos presentes en las formulaciones de detergentes (Altmajer-Vaz, 2004). La tendencia actual para la innovación de productos para la limpieza de textiles se basa en la necesidad de minimizar el impacto negativo ambiental. Para ello se

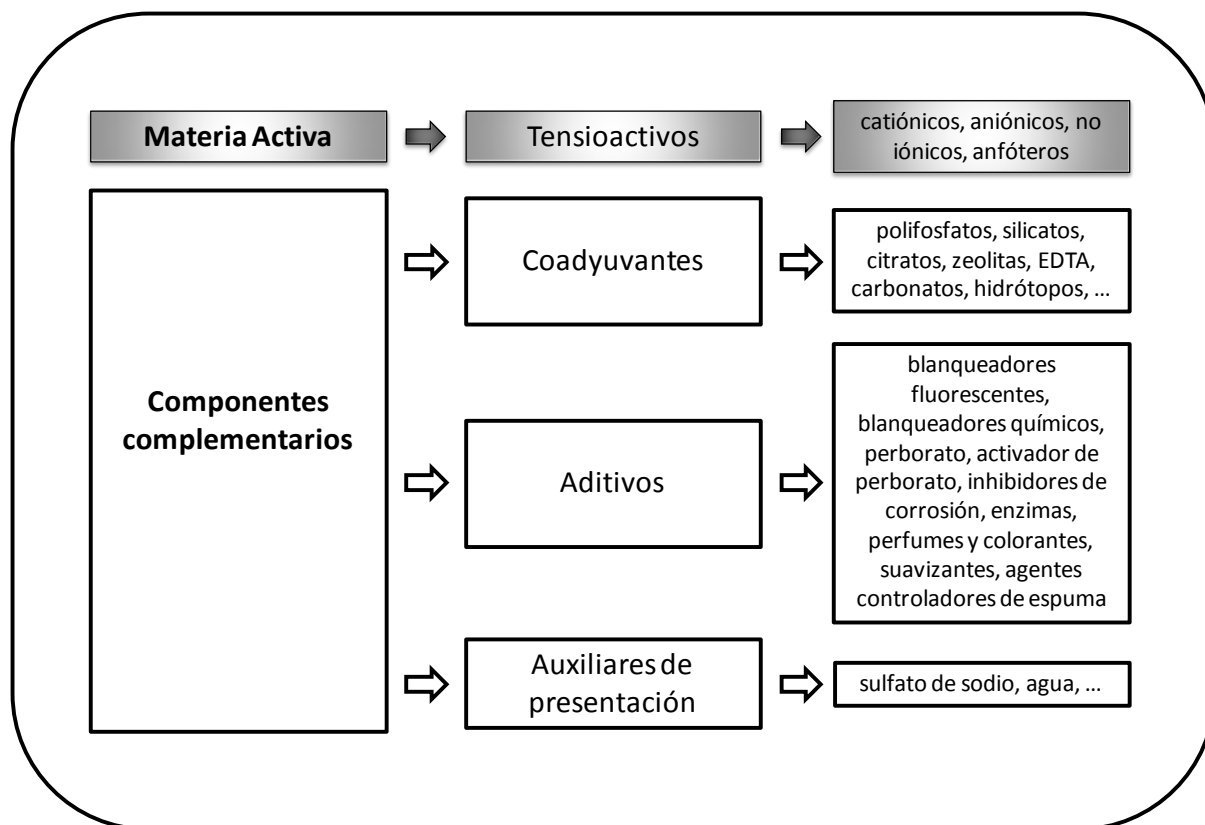


Figura 1. Componentes comunes en las formulaciones de detergentes (Altmajer-Vaz, 2004).

han desarrollado productos tensioactivos fácilmente biodegradables, nuevos coadyuvantes que sustituyen a los fosfatos, un sistema blanqueador optimizado junto con enzimas, que tienen un papel más central en la limpieza de los textiles (Johansson y Somasundaran, 2007).

4.1.2. Limpieza de superficies duras

La composición de los detergentes para el lavado de superficies duras difiere de los textiles, debido a que las características requeridas para estos productos son dependientes en gran medida del tipo de superficie y del espacio en que se encuentran (abiertas o en sistemas cerrados). Por ejemplo, los detergentes en un sistema de limpieza *in situ* (CIP, *Cleaning in place*) y en presencia de residuos alimentarios, especialmente residuos de tipo proteico, generan espumas que causan una disminución en la presión de lavado y en la energía cinética de los chorros, para evitar este efecto, se formula una composición en gran parte inorgánica, formada principalmente por coadyuvantes y tensioactivos con poder espumante reducido, tales como los no iónicos (Altmajer-Vaz, 2004). Mientras que, los detergentes de

aplicados en superficies abiertas, generalmente contienen altas composiciones de espuma y tensioactivos orgánicos como ingrediente principal (Lynn, 2009).

4.1.3. Agentes de limpieza

En general, los agentes de limpieza o detergentes se presentan en forma de sustancias simples o mezclas que elabora el fabricante a partir de diversas sustancias químicas (Wildbrett, 2000).

A continuación se describe el papel de los diferentes compuestos químicos básicos de los detergentes:

a) Tensioactivos

El tensioactivo o agente de superficie activo es quizá el ingrediente más importante presente en todas las formulaciones de detergentes (Bajpai y Tyagi, 2007). Comprende entre 15% y 40% de la formulación total (Yu *et al.*, 2008). Los tensioactivos disminuyen la tensión superficial del agua, o la tensión interfacial entre el agua y las otras fases (como aceites). Aportan propiedades humectantes, espumantes, detergentes, dispersantes, solubilizantes y anti-espumantes en función de su estructura (Leveau y Bouix, 2002; Johansson y Somasundaran, 2007). Están compuestos por una cadena larga de carbonos (por lo general de C12-C18), lipofílica e hidrofóbica y una porción hidrófila, correspondiente a un grupo con carga o sin carga eléctrica, tal como un grupo sulfato, sulfonato o polietoxilado (Johansson y Somasundaran, 2007).

Los tensioactivos en disolución acuosa presentan un comportamiento característico para producir iones. Por tanto, son clasificados por sus propiedades iónicas (carga eléctrica) en cuatro grupos: aniónicos, no iónicos, catiónicos y anfóteros (Yu *et al.*, 2008):

Tensioactivos aniónicos: Son los más utilizados debido a su relativo bajo coste de fabricación. En el agua, la parte hidrófila lleva una carga negativa, que puede reaccionar en el agua de lavado con los iones de carga positiva [calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+})] de la dureza del agua, que tienden a desactivar al tensioactivo aniónico. Estos tensioactivos son especialmente eficaces en la limpieza de suelos aceitosos y suspensiones de suciedad arcillosa (Bajpai y Tyagi, 2007). Entre los tensioactivos aniónicos, se destaca el ácido dodecilsulfónico

lineal (LAS), que comprende más del 40% de todos los tensioactivos utilizados (Altmajer-Vaz, 2004).

Tensioactivos no iónicos: No reaccionan con el Ca^{2+} o Mg^{2+} y por tanto son tolerantes a la dureza del agua (Johansson y Somasundaran, 2007). Son especialmente buenos en la eliminación de suciedad aceitosa por solubilización y emulsificación. Los tensioactivos no iónicos se utilizan con frecuencia en algunos detergentes en polvo con poder espumante reducido y en detergentes líquidos. Además, se pueden mezclar con los tensioactivos aniónicos. Los tensioactivos no iónicos más comunes son aquellos a base de óxido de etileno, conocido como tensioactivos etoxilados. Otra clase importante son los productos polihidroxi tales como ésteres de glicol, ésteres de glicerol (y poliglicerol), glucósidos (y poliglucósidos) y ésteres de sacarosa (Bajpai y Tyagi, 2007).

Tensioactivos catiónicos: Poseen una carga positiva en la parte hidrófila, se adsorben fácilmente en la mayoría de las superficies sólidas, generalmente con carga negativa (Altmajer-Vaz, 2004). Entre los más comunes están los compuestos de amonio cuaternario, el cloruro de dialquil dimetil amonio (DADMAC) y el cloruro de benzalconio (BAC) (Bajpai y Tyagi, 2007).

Tensioactivos anfóteros: Presentan baja sensibilidad a la dureza del agua, buena compatibilidad con electrolitos y otros tensioactivos (Altmajer-Vaz, 2004). Estos tensioactivos contienen tanto grupos catiónicos como aniónicos. Su comportamiento en solución es dependiente del pH, en soluciones de pH ácido, adquieren carácter tipo catiónico; mientras que a pH alcalinos adquieren carácter tipo aniónico. Los tensioactivos anfóteros más comunes son la N-alkilo betaínas (Bajpai y Tyagi, 2007).

b) *Coadyuvantes de formulación*

Los coadyuvantes de formulación, también llamados *builders*, son el segundo ingrediente más importante de un detergente. Los iones de Ca^{2+} y Mg^{2+} existentes en el agua dura y en la suciedad, reducen considerablemente la eficiencia de los tensioactivos. Por tanto, se utilizan en combinación con los tensioactivos para eliminar la presencia de estos iones, y mejorar la eficacia de la limpieza (Bajpai y Tyagi, 2007; Yu *et al.*, 2008). Dentro de los coadyuvantes más utilizados están: fosfatos, carbonatos, silicatos, aluminosilicatos (zeolitas) y citrato de sodio (Leveau y Bouix, 2002).

c) Ácidos

Son requeridos en algunas zonas de la industria alimentaria, como en superficies abiertas o sistemas CIP, donde se originan residuos específicos dependientes del tipo de producto. Los depósitos más típicos son la piedra de cerveza (oxalato cálcico), costras de proteínas, resinas de lúpulo o las incrustaciones lácticas que se forman sobre todo a partir del fosfato tricálcico (Wildbrett, 2000). Los ácidos orgánicos, como los ácidos glucónicos o cítrico, tienen interés porque no son peligrosos, ni corrosivos y poseen un poder secuestrante adicional (Leveau y Bouix, 2002). Además, los ácidos presentan actividad desinfectante debido a los efectos de alteración en los ácidos nucleicos y proteínas (Johansson y Somasundaran, 2007).

d) Bases o álcalis

Los álcalis son muy usados debido que a rompen proteínas por la acción de los iones hidroxilos, saponifican grasas, ejercen un efecto bactericida a concentraciones altas y por su bajo coste (Lelieveld *et al.*, 2003). Los álcalis actúan como detergentes primarios en la limpieza de cerámica, vidrio y superficies de metal, incluso en ausencia de tensioactivos (Kirk *et al.*, 2002). La sosa [hidróxido de sodio (NaOH)] es el principal componente de los detergentes alcalinos fuertes. Los detergentes alcalinos pueden ser clorados para ayudar la remoción de depósitos proteínicos, pero el cloro a pH alcalino no es un agente biocida efectivo (Leveau y Bouix, 2002).

Las bases son efectivas en la remoción de biofilms, un pH alcalino sobre un biofilm induce a la solubilidad de las Sustancias Poliméricas Extracelulares (EPS, *Extracellular Polymeric Substances*) y a la congestión de la red de EPS, que en consecuencia, reduce la cohesión del biofilm y facilita su eliminación (Lequette *et al.*, 2010).

e) Blanqueadores oxigenados

Los blanqueadores oxigenados proporcionan al detergente una acción blanqueadora con la eliminación de manchas y suciedad para todo tipo de tejidos. Los blanqueadores oxigenados en polvo (Bajpai y Tyagi, 2007) contienen compuestos inorgánicos de peroxígeno, como el tetrahidrato de perborato de sodio y el percarbonato de sodio. Estos cuando se disuelven se convierten en peróxido de hidrógeno (agente oxidante) y en sales residuales del compuesto (por ejemplo, borato de sodio o carbonato) (Johansson y Somasundaran, 2007). Los

blanqueadores oxigenados en su forma líquida contienen peróxido de hidrógeno que suministra directamente el agente oxidante (Bajpai y Tyagi, 2007).

Los blanqueadores oxigenados presentan la ventaja de ser productos seguros para el medio ambiente, no obstante necesitan de temperatura adecuadamente elevada para ser efectivos (Johansson y Somasundaran, 2007).

f) Enzimas

En los últimos años se ha incrementado el uso de la tecnología enzimática para la eliminación de la suciedad y para superar los problemas de eficiencia en la limpieza cuando, con la finalidad de ahorrar energía, la temperatura utilizada en el lavado es reducida (Kirk *et al.*, 2002). Las enzimas en los detergentes actúan de manera óptima a intervalos de temperatura entre 20 – 60 ° C y de pH entre 7 – 10,5. Sin embargo, cada enzima presenta una temperatura y pH específicos de trabajo (Johansson y Somasundaran, 2007). Las hidrolasas son una clase de enzimas que catalizan reacciones de hidrólisis de moléculas complejas (proteínas, lípidos, almidones, etc.), generando estructuras de menor tamaño y de más fácil eliminación (Altmajer-Vaz, 2004). Las enzimas más utilizadas en detergencia para eliminar la suciedad debida a proteínas, lípidos y almidón son las proteasas, lipasas y amilasas, respectivamente (Kirk *et al.*, 2002).

El uso de enzimas como alternativa para la eliminación de biofilms formados en las superficies de la industria alimentaria, se perfila como una medida preventiva, para evitar el establecimiento de biofilms o para erradicar una contaminación por biofilm ya existente (Lequette *et al.*, 2010; Craigen *et al.*, 2011).

g) Otros aditivos en detergentes

Diversos agentes son añadidos al detergente para mejorar el rendimiento, dar individualidad o resaltar una característica en especial. Entre ellos tenemos a los agentes anti-redeposición, agentes secuestrantes, coadyuvantes de elaboración, colorantes, fragancias, inhibidores de corrosión, agentes antiespumantes y abrillantadores ópticos ((Altmajer-Vaz, 2004; Bajpai y Tyagi, 2007).

4.1.4. Efecto de la temperatura sobre la detergencia

En general, el aumento de la temperatura mejora el lavado como resultado del aumento de la velocidad de las reacciones químicas y enzimáticas, la disminución de la viscosidad, de las fuerzas de adhesión entre el sustrato y la suciedad, etc. (Altmajer-Vaz, 2004). Asimismo, se consigue la reducción de la carga microbiana (Lelieveld *et al.*, 2003). El efecto es importante a dos temperaturas críticas, una donde la suciedad grasa se licua y otra es el punto de ebullición, en ambas la detergencia aumenta notablemente (Lynn, 2009).

La temperatura elevada puede afectar el desempeño de los diversos componentes de los detergentes y, a su vez, ocasionar efectos positivos y negativos sobre el proceso de limpieza (**Tabla 3**) (Wildbrett, 2000; Altmajer-Vaz, 2004). Por ejemplo, los tensioactivos no iónicos disminuyen su solubilidad a partir de cierta temperatura (punto de turbidez) y enturbian la solución de limpieza (Leveau y Bouix, 2002). Si la temperatura de lavado es superior al punto de turbidez, se obtiene una detergencia pobre (Altmajer-Vaz, 2004).

Tabla 3. Efecto del uso de temperatura elevada sobre la eficacia de la limpieza.

| Efectos positivos | Efectos negativos |
|--|--|
| Menor capacidad adhesiva | Mala eliminación de suciedades proteicas |
| Disminuye viscosidad de suciedad | Altera térmicamente las enzimas |
| Funde la suciedad grasa | Menor capacidad captadora de suciedad de las sustancias lípidas |
| Aceleran la dispersión | Menor solubilidad de sustancias responsables de la dureza del agua |
| Aceleran la imbibición | Disminuye la solubilidad de los tensioactivos no iónicos al superar el punto de turbidez |
| Aceleran las reacciones químicas y enzimáticas | |
| Mayor solubilidad de componentes solubles de la suciedad | |

4.2. Desinfección

La desinfección es definida como la reducción del número de microorganismos presentes en el medio ambiente, por medio de agentes químicos y/o métodos físicos, a un nivel que no comprometa la calidad y seguridad del producto (Taylor *et al.*, 1999). Para ello debe asegurarse el contacto directo de la solución desinfectante con los microorganismos (Wildbrett, 2000). La eficacia de un agente antimicrobiano se ve afectada por seis factores principalmente: i) el *tamaño de la población microbiana*, ii) la *composición de la población*

microbiana, iii) la concentración o intensidad del antimicrobiano, iv) la duración de la exposición, v) la temperatura, y vi) los diversos factores ambientales (Willey *et al.*, 2009).

4.2.1. Desinfección de superficies textiles

Los programas de un lavado estándar son aceptables para la mayoría de textiles, donde la limpieza visual es el objetivo. Sin embargo, debido al alto riesgo que conllevan los textiles usados en la industria alimentaria, estos requieren mayores estándares de lavado, suficientes para reducir la carga microbiana (Lelieveld *et al.*, 2003).

En 1998, el Instituto Alemán de Aseguramiento de la Calidad y Certificación, RAL, presentó la guía para emitir Certificados de Calidad de lavado e higiene de los textiles en la industria alimentaria (RAL-GZ 992/3). Esta se basa en los principios del sistema de Análisis de Riesgo y Control de Biocontaminación (RABC, *Risk Analysis and Biocontamination Control*) y de APPCC. El mantenimiento de las certificaciones depende de inspecciones anuales no anunciadas de las lavanderías (**Tabla 4**) (Fijan *et al.*, 2008).

Tabla 4. Valores recomendados para los puntos críticos de control en lavanderías implicadas en la limpieza de textiles de la industria alimentaria, según RAL-GZ 992/3 (Fijan *et al.*, 2008).

| Punto crítico de control | Estándar |
|---|---|
| Textiles planchados y doblados ^b | 9 de cada 10 muestras no deben contener más de 50 UFC dm ^{-2a} |
| Procedimiento de lavado | Sin crecimiento de indicadores biológicos ^a |
| Textiles húmedos | < 100 UFC dm ⁻² |
| El agua del grifo para lavar, agua blanda, el agua de enjuague | < 100 UFC ml ⁻¹ |
| Equipo técnico (máquinas de lavado, de selección y cintas transportadoras) | < 100 UFC dm ⁻² |
| Estantes de almacenamiento/transporte (estanterías planchadora-secadora, estanterías de ropa doblada, pared lateral de los vehículos de transporte) | < 100 UFC dm ⁻² |
| Higiene de manos (antes y después de la limpieza y desinfección) | < 100 UFC dm ⁻² |

^a Valores límites: fijados por el Instituto Alemán Robert-Koch.

^b Placas RODAC usadas para el muestreo de textiles planchados y doblados no deberían contener microorganismos patógenos o potencialmente patógenos como: *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, etc.

El 23 de Septiembre del 2002, el Comité Europeo de Normalización (CEN) aprobó la Norma Europea EN 14065:2002, basándose en los principios del sistema RABC, para asegurar de forma continua la calidad microbiológica de los textiles lavados que se utilizan en la industria farmacéutica, hospitalaria, alimentaria y cosmética (Anónimo, 2003).

4.2.2. Desinfección de superficies duras

Para las superficies duras abiertas, los desinfectantes son aplicados directamente al equipo, superficie o utensilio a desinfectar durante un período prolongado. Para las superficies duras de sistemas "cerrados", se utilizan desinfectantes dentro del sistema llamado CIP, donde los desinfectantes son distribuidos por gravedad o por bombas dentro del equipo (Holah, 1995). La **Tabla 5** muestra los criterios microbiológicos de muestras ambientales recomendados por el Servicio de Salud Pública de EE.UU. y por Little y Sagoo (2009).

Tabla 5. Criterios microbiológicos de hisopados ambientales (Little y Sagoo, 2009).

| Muestra | Microorganismos | Calidad microbiológica | |
|--|----------------------|--|--|
| | | Satisfactorio | Insatisfactorio |
| Hisopado de superficies de alimentos listos para el consumo: limpiado y listo para usar | Recuento de aerobios | < 10 CFU cm ⁻² | ≥ 10 CFU cm ⁻² |
| | Enterobacteriaceae | < 1 CFU cm ⁻² | ≥ 1 CFU cm ⁻² |
| | <i>E. coli</i> | No detectado | Detectado |
| Hisopado de superficies recién limpiadas que están en uso | Recuento de aerobios | < 10 ³ CFU cm ⁻² | ≥ 10 ³ CFU cm ⁻² |
| | Enterobacteriaceae | < 10 ² CFU cm ⁻² | ≥ 10 ² CFU cm ⁻² |
| | <i>E. coli</i> | No detectado | Detectado |

4.2.3. Desinfectantes

En la elección de un desinfectante se debe considerar la actividad contra el patógeno diana, la seguridad del usuario y la compatibilidad con el tipo de superficie, además del coste (Fraise, 1999). La **Tabla 6** muestra los desinfectantes más comunes y sus respectivos mecanismos de acción (Denyer y Stewart, 1998; Leveau y Bouix, 2002; Mostert *et al.*, 2005).

a) Compuestos de amonio cuaternario (QACs)

Son compuestos catiónicos y no deben mezclarse con sustancias anionactivas (Wildbrett, 2000). Uno de los compuestos más utilizados es el BAC, sus propiedades son explotadas en la desinfección estática de materiales, en desinfección de equipamiento y de superficies por

Tabla 6. Mecanismo de acción de los desinfectantes.

| Biocida | Mecanismo de acción | Objetivo |
|--|--|---|
| Compuestos de amonio cuaternario (QACs) | Interacción electrostática (iónica) con fosfolípidos | Integridad de membrana celular |
| Anfóteros | Síntesis proteicas con falsos aminoácidos | Proteínas |
| Halógenos | Halogenación/oxidación | Ácido nucleico, proteínas, enzimas |
| Compuestos de yodo (Yodóforos) | Oxidación | Grupos de proteínas, enzimas, nucleótidos y ácidos grasos |
| Peroxygens | Oxidación | Proteínas y enzimas de los grupos tiol, lípidos, DNA |
| Alcoholes | Desnaturalización de proteínas | Membrana plasmática |
| Aldehídos | Reacción alquilación | Pared celular. Biomoléculas (por ejemplo, proteínas, ARN, ADN) con grupos amino, imino, amida, carboxilo y tiol (nucleófilos). Entrecruzamientos intermoleculares |
| (bis) Fenol | Penetración/partición de la bicapa fosfolipídica | Gradiente de pH transmembrana, integridad de membrana |
| Biguanidas | Interacción electrostática (iónica) | Membrana citoplasmática (bacterias)/ membrana plasmática (levaduras) |

pulverización, así como en desinfección de circuitos de tuberías (Leveau y Bouix, 2002; Kuda *et al.*, 2011). Los QACs son efectivos en un rango de pH entre 6 y 10, lo que limita su aplicación en ambientes ácidos (Mostert *et al.*, 2005). En general, son considerados desinfectantes de nivel bajo; sin embargo, son efectivos contra la mayoría de bacterias vegetativas, virus encapsulados y algunos hongos (Johansson y Somasundaran, 2007). Los gérmenes gram negativos son menos sensibles, particularmente *P. aeruginosa*, que, espontáneamente o tras el contacto con dosis subletales, puede mostrar una resistencia muy elevada (Leveau y Bouix, 2002). Las condiciones necesarias para lograr una desinfección efectiva con QACs dependen de la concentración y el tiempo de contacto (Johansson y Somasundaran, 2007).

b) Anfóteros

A diferencia de los QACs, los anfóteros pueden existir en su forma aniónica, catiónica o neutra dependiendo del pH de la solución (Johansson y Somasundaran, 2007). No son compatibles con agentes oxidantes y concretamente con los generadores de cloro, porque inhiben, parcialmente o totalmente, estos compuestos. Los anfóteros presentan actividad bactericida y fungicida con concentraciones de principio activo extremadamente débiles.

También muestran actividad virucida y esporicida. Entre ellos se encuentran las N-alquilo betaínas y los N-alquilo amino propionatos (Bajpai y Tyagi, 2007), sus principales usos son: la desinfección de circuitos de tuberías, la desinfección por pulverización o por inundación de los equipos y la desinfección de los pediluvios (Leveau y Bouix, 2002).

c) Halógenos

Existen dos tipos de productos: a) los que se hidrolizan en solución para dar ácido hipocloroso, como el cloro gaseoso, hipocloritos y cloraminas, y b) los que no se hidrolizan y son activos tal cual, como el dióxido de cloro (Leveau y Bouix, 2002).

Los compuestos clorados se encuentran dentro del grupo de los desinfectantes de nivel intermedio (Johansson y Somasundaran, 2007). El cloro, hipoclorito y cloraminas presentan un amplio espectro de actividad: bacterias en su forma vegetativa, mohos, algas y protozoos. La destrucción de esporas de bacterias y de virus es más lenta (Leveau y Bouix, 2002). Sin embargo, estos compuestos presentan como desventaja que son rápidamente inactivados por la materia orgánica y que pueden generar compuestos perjudiciales para el medio ambiente (Lelieveld *et al.*, 2003).

El cloro gaseoso, el hipoclorito de sodio y los derivados clorados en presencia de agua dan ácido hipocloroso (HClO) (Leveau y Bouix, 2002), que es considerado el biocida más potente en mezcla acuosa (Johansson y Somasundaran, 2007). Sin embargo, su estabilidad es dependiente principalmente del pH (entre 4 y 6). En medio alcalino, la actividad antimicrobiana decrece (formación de hipoclorito), y en presencia de ácido, el ácido hipocloroso da cloro gaseoso que es un producto altamente tóxico (Leveau y Bouix, 2002).

d) Compuestos de yodo (Yodóforos)

En general, el yodo se utiliza como desinfectante en solución acuosa o alcohólica (Wildbrett, 2000). Los yodóforos son complejos que resultan de la combinación del yodo y de un agente solubilizante o de un agente transportador, que libera lentamente el yodo cuando son diluidos en agua (Leveau y Bouix, 2002). Los yodóforos son desinfectantes de nivel intermedio, efectivos contra células vegetativas gram negativas y positivas, levaduras, mohos, virus encapsulados y algunas microbacterias (Mostert *et al.*, 2005; Johansson y Somasundaran, 2007). Sin embargo, presentan algunas desventajas como la tinción de la

piel, de las partes plásticas de equipos y un coste relativamente elevado comparado con el cloro (Mostert *et al.*, 2005).

e) Agentes oxidantes productores de oxígeno (Peroxygens)

El peróxido de hidrógeno y ácido peracético son los principales representantes del grupo de los generadores de peróxido (*Peroxygens*) (Mostert *et al.*, 2005). Son desinfectantes de nivel alto (Johansson y Somasundaran, 2007). El peróxido de hidrógeno tiene actividad, particularmente frente a esporas. Es más activo sobre las bacterias gram positivas que sobre las gram negativas y más activo aun sobre las bacterias anaerobias, que no están provistas de catalasa, que sobre las bacterias aerobias (Leveau y Bouix, 2002; Mostert *et al.*, 2005). Algunos mohos como por ejemplo los *Trichophyton*, pobres en catalasa, son más sensibles. Otros como *Candida albicans*, que poseen una actividad catalasa más elevada, son más resistentes (Leveau y Bouix, 2002). También son efectivos contra virus encapsulados y desnudos (Johansson y Somasundaran, 2007). Mientras, el ácido peracético tiene excelente actividad bactericida, esporicida y fungicida. A diferencia del peróxido de hidrógeno no es afectado por la presencia de catalasa ni por la materia orgánica (Leveau y Bouix, 2002).

f) Alcoholes

Los alcoholes, como el alcohol isopropílico o etílico, son considerados desinfectantes de nivel intermedio y son muy eficaces a concentraciones entre 60 – 70% (Johansson y Somasundaran, 2007). Tienen un amplio espectro de actividad antimicrobiana e inhibe el crecimiento de bacterias vegetativas y virus encapsulados. Sin embargo, son ineficaces sobre las esporas bacterianas y su actividad fungicida es despreciable (Leveau y Bouix, 2002; Mostert *et al.*, 2005).

g) Aldehídos

Los compuestos más utilizados son el glutaraldehído y formaldehído (Mostert *et al.*, 2005). Los aldehídos poseen un amplio espectro de actividad que abarca las bacterias, levaduras, mohos y formas esporuladas de bacterias. Se distinguen sobre todo por su actividad frente a los virus encapsulados y desnudos. Son utilizados en la desinfección de tuberías, depósitos y equipos (Leveau y Bouix, 2002). El formaldehído se emplea en combinación con otros principios activos, sobre todo con tensioactivos y otros aldehídos (Wildbrett, 2000).

h) Bisfenoles

El triclosán y el hexaclorofenol son los más utilizados. El triclosán se aplica como capa antimicrobiana en material de embalaje y cintas transportadoras. Los bisfenoles son activos contra bacterias, hongos y algas (Mostert *et al.*, 2005). Son considerados desinfectantes de nivel intermedio. Las concentraciones de uso final pueden variar ampliamente, desde 0,05 a más de 1%, dependiendo del ingrediente activo y la aplicación (Johansson y Somasundaran, 2007).

i) Biguanidas

El grupo de las biguanidas está representado por clorhexidina, alexidina y biguanidas poliméricas (Mostert *et al.*, 2005). La clorhexidina presenta buena actividad frente a bacterias y levaduras, reducida actividad frente a virus, y los mohos son la clase más resistente (Leveau y Bouix, 2002). Además, su eficacia se reduce en gran medida con la presencia de materia orgánica (Mostert *et al.*, 2005). El clorhidrato de polihexametileno biguanida, que no es espumante, es utilizado en para la desinfección de los circuitos de forma dinámica, pero debido a su estrecho espectro antimicrobiano necesita de la asociación con otros principios activos (Leveau y Bouix, 2002).

4.3. Importancia del secado

Una de las medidas para asegurar el éxito de la desinfección consiste en el secado de las superficies (Wildbrett, 2000). La eliminación de agua y/o secado de los equipos, reduce el desarrollo y supervivencia microbiana, y por tanto, reduce la tasa de transferencia de microorganismos (Lelieveld *et al.*, 2003; Mostert *et al.*, 2005). El secado es fácil de conseguir en superficies abiertas y con baja humedad ambiental, obteniéndose una máxima rapidez en el secado cuando el enjuagado final es realizado con agua caliente. Sin embargo, en sistemas cerrados es difícil de alcanzar una completa desecación. Debido a que no siempre es posible hacer circular el aire, aparte del peligro de contaminación que esto supondría (Wildbrett, 2000).

Cada microorganismo presenta diferente grado de tolerancia a la desecación, pero cuando se realizan secados rápidos, todos los microorganismos presentan una reducción de su viabilidad más efectiva (Fuster-Valls *et al.*, 2008; Takahashi *et al.*, 2010). Además, se ha observado que la presencia de materia orgánica ejerce un efecto protector contra la

deseccación (Takahashi *et al.*, 2010) y en algunos casos, este efecto protector es más pronunciado con la presencia de sal (Vogel *et al.*, 2010).

5. Valoración de la eficacia desinfectante

Las pruebas microbiológicas para valorar la eficacia de los desinfectantes incluyen diferentes parámetros en sus diseños, como la concentración del antimicrobiano, el tiempo de contacto, la temperatura, la presencia o no de suciedad, el tipo y número de microorganismos (Mostert *et al.*, 2005). Actualmente, en Europa, se disponen de algunos métodos oficiales aprobados por el CEN para evaluar las propiedades antimicrobianas de los biocidas, que incluyen cuatro etapas (Anónimo, 2002; Hernández-Rodríguez, 2006):

- fase 1 ensayos de suspensión para la actividad básica del producto, mediante ensayos *in vitro*;

- fase 2 etapa 1 ensayos de suspensión en condiciones representativas de la utilización del producto en la práctica (concentración y tiempo de contacto compatibles con el material);

- fase 2 etapa 2 otros ensayos de laboratorio, por ejemplo: ensayos de lavado, de impregnación de manos y ensayos de superficie que simulen las condiciones de utilización del producto en la práctica (contaminando artificialmente y estudiando la reducción del número de microorganismos por la acción del desinfectante);

- fase 3 ensayos de campo en condiciones de utilización en la práctica, controlando el resultado de la desinfección.

Así, por ejemplo, para determinar la aceptabilidad de un producto como desinfectante químico sobre superficies no porosas, este tiene que pasar primero por pruebas de la fase 1 (en suspensión), y demostrar que el producto posee actividad bactericida (UNE-EN 1040:1997) y/o fungicida (EN 1275:1997) básica, al alcanzar una reducción de la viabilidad igual o superior de 10^5 antes de 60 s y de 10^4 antes de 60 min, respectivamente. Posteriormente, superar la fase 2 etapa 2, sobre superficies no porosas en las condiciones

específicas de su utilización prevista (concentración del producto, temperatura, tiempo de contacto, condiciones limpias o sucias), una actividad bactericida y fungicida (EN 13697:2001) al alcanzar un factor de reducción logarítmica igual o superior a $4 \log_{10}$ en 5 min y $3 \log_{10}$ en 15 min, respectivamente (Anónimo, 2002).

La evaluación de los antimicrobianos utilizados para desinfectar textiles en sectores específicos, como farmacia, alimentación, salud y cosméticos, es realizada mediante un proceso de lavado. Se determina la acción químico-térmica, mecánica, así como el tiempo de contacto y la concentración del producto, sobre el efecto de la desinfección (Fijan *et al.*, 2005; Fijan *et al.*, 2007). El Instituto Robert-Koch (RKI, *Robert-Koch Institute*) recomienda la evaluación del lavado utilizando bio-controles, que consisten en piezas de algodón (1 cm^2) contaminadas con microorganismos de prueba, como *S. aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecium* ATCC 6057 entre otros, más sangre, seguidos de un proceso de secado (Anónimo, 1996). Después del lavado de los bio-controles, el objetivo de la eficacia bactericida y fungicida es conseguir una reducción de 10^5 y de 10^4 , respectivamente, como lo señala el ensayo en suspensión modificado de la norma de la Asociación Alemana de Higiene y Microbiología (Fijan *et al.*, 2005; Fijan *et al.*, 2007).

6. Resistencia microbiana a los desinfectantes en la industria alimentaria

Los microorganismos resistentes se describen como una especie o cepa que tiene más capacidad para sobrevivir a repetidas operaciones de limpieza y desinfección, de tal manera que dominan la flora microbiana del medio ambiente (Holah *et al.*, 2002). Los mecanismos implicados en la adaptación y resistencia de las bacterias a los biocidas no son totalmente conocidos; sin embargo, es importante conocer la respuesta de los microorganismos/patógenos cuando se aplican los desinfectantes de contacto en superficies y equipos de un proceso (Russell, 2004; Mostert *et al.*, 2005).

Cada tipo de microorganismo (bacterias, hongos, virus, protozoarios, priones) presenta diferentes respuestas frente a los antisépticos y desinfectantes, debido a sus diferencias en estructura celular, composición y fisiología (McDonnell y Russell, 1999). La industria alimentaria reconoce que algunas especies son más resistentes a los biocidas que otras, por ejemplo, las *Pseudomonas* y especies de estafilococos, e insiste que estos deberían formar

parte del portafolio de microorganismos que los fabricantes de desinfectantes usen cuando lleven a cabo las pruebas en suspensión y superficie del desinfectante (Holah *et al.*, 2002).

La resistencia a los antimicrobianos puede presentarse como:

- a) una propiedad natural del microorganismo (intrínseca): habilidad de esporular, adaptación de las *Pseudomonas*, efecto protector de los biofilms, carencia en el microorganismo de la estructura diana del antimicrobiano, o impermeabilidad del microorganismo al antimicrobiano (McDonnell y Russell, 1999; Mostert *et al.*, 2005; Madigan *et al.*, 2009).
- b) adquirida por material genético. A través de plásmidos, transposones e integrones. Los mecanismos de resistencia pueden estar codificados genéticamente en el cromosoma o en los plásmidos (Madigan *et al.*, 2009). Cuando la resistencia se encuentra en secuencias genéticas móviles, estas diseminan por conjugación, transformación o transducción la resistencia hacia otras células de la misma o diferente especie (Willey *et al.*, 2009). Generalmente, la resistencia adquirida por plásmidos, es aquella presentada por los antimicrobianos basados en metales (plata, cobre o mercurio), clorhexidina y QACs, así como también para acridinas, diamidas y bromidio de etidio en cepas de *Staphylococcus* resistentes a antibióticos (Russell, 1997; Mostert *et al.*, 2005).
- c) por mutación. Este tipo no es frecuente, aparece de forma espontánea y las bacterias resistentes son seleccionadas en presencia del antimicrobiano. En general, se produce un cambio en la diana del antimicrobiano, de modo que no puede unirse y producir la inhibición (Willey *et al.*, 2009).

Dentro de los factores que contribuyen a la resistencia a los antimicrobianos se encuentran:

- i) el uso de concentraciones inadecuadas del antimicrobiano, por ejemplo cuando los microorganismos son expuestos a concentraciones sub-letales de biocidas
- ii) el tiempo de contacto insuficiente y
- iii) el uso indiscriminado (sin control) de antimicrobianos (Willey *et al.*, 2009).

7. Biofilms como mecanismo de defensa

La generación de un biofilm es un mecanismo intrínseco que se encuentra dentro de las adaptaciones fisiológicas (fenotípicas) como es la asociación de microorganismos en superficies sólidas (McDonnell y Russell, 1999). Un biofilm es una agrupación de células microbianas adheridas a una superficie y encerradas dentro de una matriz excretada por las células, compuesta de EPS (Madigan *et al.*, 2009).

Los biofilms en la industria alimentaria son importantes porque originan problemas como la biocorrosión, disminución de la calidad del agua y porque pueden actuar como una fuente persistente de contaminación microbiana (McDonnell y Russell, 1999). Este último es de especial importancia porque conduce a la descomposición de los alimentos o a la transmisión de enfermedades (Van Houdt y Michiels, 2010).

El biofilm puede ser producido por cualquier microorganismo bajo condiciones adecuadas de humedad y nutrientes. Sin embargo, cabe destacar que algunos microorganismos de forma natural tienen mayor tendencia que otros para producir biofilms (Mostert *et al.*, 2005). El biofilm es formado como: defensa frente a condiciones adversas, para la colonización de un nicho favorable y para el uso de los potenciales beneficios de la comunidad (Brooks y Flint, 2008). Dentro de la formación de los biofilms, el término biofouling es utilizado para definir la formación indeseable de una capa de microorganismos con sus productos de descomposición sobre superficies que se encuentran en contacto con líquidos. En la industria de los alimentos esta formación puede conducir a la reducción de la transferencia de calor, el incremento de la resistencia en fluidos y a la corrosión (Blaschek *et al.*, 2007).

7.1. Etapas de la formación del biofilm

La formación del biofilm comprende una secuencia de pasos (**Figura 2**). Inicialmente se producen dos etapas de adhesión, una primera etapa que es reversible y una segunda etapa irreversible (ICMSF, 2004). Durante la primera etapa ocurre una adhesión inicial rápida a través de fuerzas electrostáticas débiles, fuerzas estéricas y fuerzas de Van der Waals (Brooks y Flint, 2008; Van Houdt y Michiels, 2010). Pero, en poco tiempo, la expresión del gen es modificada y comienza el crecimiento del biofilm, con la unión física de las células a la superficie por polisacáridos complejos, que fijan firmemente la célula a la superficie (ICMSF, 2004; Brooks y Flint, 2008).

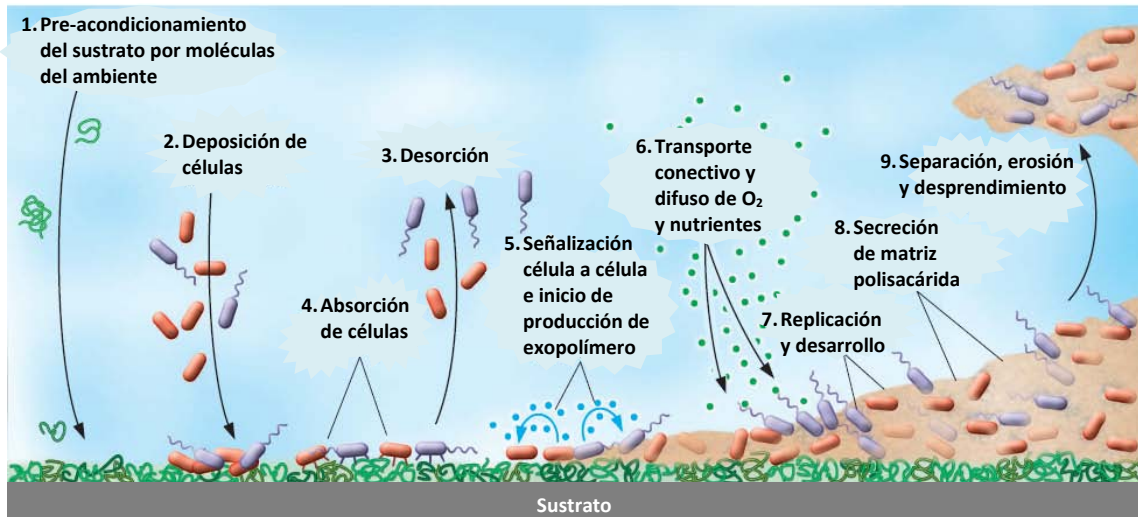


Figura 2. Distintos procesos responsables de la formación de biofilms (Bryers y Ratner, 2004).

La adhesión a la superficie es dependiente del tipo de material (hidrófobo o hidrófilo) y de la cepa (Silva *et al.*, 2008). Otro factor que también interviene en la adhesión y colonización, es la presencia de apéndices filamentosos extracelulares como los flagelos, el pili y las fimbrias. El primero participa en el transporte de la célula hacia la primera interacción con la superficie, mientras que el resto son importantes para la adhesión y colonización de las superficies (Simões *et al.*, 2010).

7.2. Mecanismos de resistencia de los biofilms

Naturalmente un biofilm está formado por especies mixtas, tiene un espesor de varios micrómetros o varios milímetros y el 90 – 97% está constituido por agua (Brooks y Flint, 2008). La matriz de las EPS en un biofilm bacteriano se constituye principalmente de polisacáridos y proteínas (representan el 75 – 89%); además, de ácidos nucleicos, lípidos, fosfolípidos y sustancias húmicas. Las EPS brindan a los microorganismos del biofilm un efecto protector porque retrasa o impide a los antimicrobianos alcanzar los microorganismos diana en el biofilm (Brooks y Flint, 2008; Simões *et al.*, 2010).

En general, las células dentro de un biofilm son más resistentes que las células planctónicas a condiciones de deshidratación, calor y a los efectos de los agentes de limpieza y desinfección (ICMSF, 2004; Blaschek *et al.*, 2007; Van Houdt y Michiels, 2010). Lo anterior, sobre todo en un biofilm mixto, debido a la estructura más compleja de las EPS (Brooks y Flint, 2008). Sin embargo, la resistencia a los desinfectantes adquirida por la formación de

biofilms, es considerada como una pseudo-resistencia, ya que cuando las células se desprenden del biofilm, rápidamente son susceptibles a los antimicrobianos (McDonnell y Russell, 1999; Mostert *et al.*, 2005; Blaschek *et al.*, 2007).

Existen otros mecanismos que pueden explicar la resistencia de las bacterias dentro de un biofilm, son: el estado casi durmiente de las células, debido a que en el interior del biofilm las células muestran una disminución en la tasa de crecimiento por los gradientes de oxígeno y nutrientes (Van Houdt y Michiels, 2010), la forma esporulada de hasta el 10% de células en algunos biofilms de bacilos termófilos (Brooks y Flint, 2008) y la capacidad de detectar los cambios del biocida y responder activamente desplegando la respuesta de protección al estrés más efectivamente que las células platónicas (Van Houdt y Michiels, 2010).

Todos estos mecanismos de resistencia hacen que su eliminación dentro de las plantas procesadoras de alimentos se convierta en un gran reto (Brooks y Flint, 2008). La adhesión microbiana a las superficies es un proceso bastante rápido, por tanto, es necesaria una adecuada frecuencia de desinfección para evitar la maduración del biofilm y la acumulación de materia orgánica (residuos del producto), que pueden influir en las condiciones de higiene de los materiales y en la disponibilidad de nutrientes (Van Houdt y Michiels, 2010). Asimismo, el diseño de los equipos, una buena elección del material y su tratamiento superficial así como la rugosidad y su fácil limpieza, son factores importantes para combatir la formación del biofilm (Mostert *et al.*, 2005).

7.3. Patógenos en biofilms

En la industria alimentaria la principal fuente de contaminación de los alimentos y de las superficies de contacto con los alimentos son los patógenos en biofilms, como *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium*, *C. jejuni*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Yersinia enterocolitica* entre otros (Shi y Zhu, 2009). Los patógenos son capaces de formar biofilms cuando se encuentran bajo condiciones apropiadas para su desarrollo (Mostert *et al.*, 2005; Shi y Zhu, 2009). Pero, incluso también cuando las condiciones son hostiles, como es, la presencia de desinfectantes (Lelieveld *et al.*, 2003).

7.3.1. Patógenos en biofilms: *L. monocytogenes*

L. monocytogenes es una bacteria transmitida al hombre principalmente a través de alimentos (Carpentier y Cerf, 2011). Una variedad de productos alimenticios, como productos cárnicos, aves de corral, productos lácteos y vegetales, se han visto implicados como vehículos de listeriosis (Conter *et al.*, 2009). La listeriosis, a pesar de su incidencia relativamente baja, está colocada entre las infecciones transmitidas por los alimentos más graves debido a la severidad de la enfermedad y a la elevada tasa de mortalidad con que está relacionada. En la UE, la EFSA informó que en el 2010 el número de casos de listeriosis disminuyó ligeramente y se confirmaron 1 601 casos. Pero como en años anteriores, se notificó una alta tasa de mortalidad (17%) (EFSA y ECDC, 2012). La listeriosis invasiva se presenta principalmente en personas en los extremos de edad (ancianos y bebés), personas con enfermedades de inmunodepresión y personas que reciben terapia inmunosupresora (Swaminathan y Gerner-Smidt, 2007). Los síntomas clínicos asociados con la listeriosis en adultos son principalmente las infecciones del sistema nervioso central y bacteriemia, pero también puede incluir endocarditis (Farber y Peterkin, 1991).

L. monocytogenes está ampliamente distribuida en las plantas de procesamiento. Los alimentos implicados de mayor preocupación son aquellos en donde puede multiplicarse (**Tabla 7**). En general, los alimentos relacionados en casos de listeriosis contienen $\geq 1\ 000$ UFC g^{-1} (Tompkin, 2002; Lin *et al.*, 2006). Actualmente, la FDA y USDA tienen una regla de tolerancia cero para *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo (Nugen y Baeumner, 2008). Asimismo, la UE estableció un límite de 100 UFC g^{-1} durante la vida útil del producto (Unión Europea, 2005).

Es importante destacar que *L. monocytogenes* puede establecerse en una instalación de procesamiento de alimentos y permanecer como miembro de la flora residente durante meses o años (Tompkin, 2002; Latorre *et al.*, 2010; Cruz y Fletcher, 2011). Un factor muy importante que determina la particular persistencia de la contaminación por *L. monocytogenes* en los ambientes de procesado de alimentos, es su habilidad para adherirse a las superficies (Mostert *et al.*, 2005; Kushwaha y Muriana, 2009). Este microorganismo tiene el potencial de formar biofilms sobre diversos materiales como el acero inoxidable, caucho o plástico (Latorre *et al.*, 2010). Además, de sobrevivir a las tecnologías aplicadas en

Tabla 7. Superficies del ambiente de procesamiento de los alimentos contaminadas con *L. monocytogenes*.

| Producto | Equipo y/o superficie | Origen de la contaminación |
|---|--|--|
| Piezas de aves de corral | Superficies de contacto con los alimentos (tabla de cortar, cuchillos). Superficies que no están de contacto con los alimentos (afiladores de cuchillo) | Superficies no sometidas a adecuados procesos de higiene (Chiarini <i>et al.</i> , 2009) |
| Carne de cerdo ahumado en frío | Máquina de salmuera (dientes de alimentación, superficies lisas, y espacios de la máquina) | Diseño de higiene deficiente (Berzins <i>et al.</i> , 2010) |
| Encurtidos japoneses, "Asazuke" | Instalaciones de la fábrica (zona de inmersión de botas), pisos, piso del refrigerador, tabla de cortar, cuchillo, contenedor, plataforma, barril de maduración, mesa de trabajo, entre otros) | Posible inicio de la contaminación por medio de la materia prima o por contaminación cruzada con los manipuladores de alimentos (Maklon <i>et al.</i> , 2010) |
| Filetes de bagre | Máquina de descabezado, tabla de corte, agua de refrigeración, cintas transportadoras en las diferentes etapas, mesa de pesar filetes, pared del congelador | Agua de refrigeración y personal (Chen <i>et al.</i> , 2010) |
| Queso | Maquinaria y equipos de procesamiento y envasado | _ * (Alessandria <i>et al.</i> , 2010) |
| Requesón de leche ácida, "Quargel" | Ambiente de la planta de procesamiento | _ (Fretz <i>et al.</i> , 2010) |
| Leche | Pisos (de sala y área de almacenamiento). Medidores de leche, pezonera de línea, y salida del tanque de leche | Temperaturas inadecuadas durante el ciclo de limpieza. Presencia de grietas en las superficies (Latorre <i>et al.</i> , 2010) |
| Leche | Colector de leche cruda, silos de leche, mezclador de suero | _ (Doijad <i>et al.</i> , 2011) |
| Salchichas fermentadas | Máquina de picar carne, máquinas de rellenar, cubiertas, bateadores de carne | _ (Martin <i>et al.</i> , 2011) |
| Queso | Cuchillos, tablas de cortar, platos de queso, empacadores, mesas, manija del refrigerador, etc. de comercio minoristas | Ingreso de queso contaminado en los comercios minoristas seguido de aplicación de prácticas inadecuadas durante el proceso de corte o de envase, que contaminaron otros quesos (Gaulin <i>et al.</i> , 2012) |
| Cangrejo azul | Drenajes del piso, refrigerador de producto crudo, plataformas de recepción, mesas y guantes | Posibles procesos de limpieza y desinfección deficientes (Pagadala <i>et al.</i> , 2012) |

* no se informó

el procesamiento de alimentos. Por ejemplo, tolera altas concentraciones de sal y pH relativamente bajos, y sobre todo porque son capaces de multiplicarse a temperaturas de refrigeración (Vazquez-Boland *et al.*, 2001). Consecuentemente, la vigilancia de *L. monocytogenes* es importante en la industria alimentaria por su habilidad para colonizar y formar biofilms que posteriormente son difíciles de erradicar (Oliver *et al.*, 2005; Mostert *et al.*, 2005).

Un programa de control de *Listeria* en ambientes de procesado de alimentos incluye las siguientes estrategias: (i) prevención del establecimiento y crecimiento de *Listeriae* en nichos u otros sitios que pueden provocar la contaminación de los alimentos listos para el consumo; (ii) la implementación de un programa de muestreo para evaluar en forma oportuna si el entorno donde los alimentos están expuestos se encuentra bajo control; (iii) una respuesta rápida y eficaz frente a resultados positivos de *Listeria*; (iv) verificación por medio de muestreo de seguimiento que la fuente ha sido detectada y corregida; (v) una evaluación a corto plazo para facilitar la detección de problemas y tendencias; y (vi) una evaluación a largo plazo para detectar zonas positivas dispersas en líneas de envasado, y para medir el progreso general hacia la mejora continua (Tompkin, 2002).

8. Bacteriófagos: Un método alternativo para el control y eliminación de biofilms

La aparición de bacterias resistentes a los antimicrobianos, así como la difícil eliminación de los biofilms formados en las superficies de procesamiento de alimentos, muestran claramente la necesidad de nuevas estrategias para el control de biofilms (Simões *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2011). En este sentido, los bacteriófagos (fagos) se presentan como una buena alternativa porque se tratan de virus que sólo infectan bacterias, es un tratamiento natural y son inocuos para las personas y animales (Carlton, 1999; Azeredo y Sutherland, 2008; Rozema *et al.*, 2009).

Los fagos son organismos simples y abundantes, se estima que existen 10 fagos por cada célula bacteriana (Azeredo y Sutherland, 2008). Son fácilmente aislados del suelo, agua, aguas residuales y de la mayoría de ambientes colonizados por bacterias (Marks y Sharp, 2000). Además, se encuentran presentes sobre la superficie de los alimentos, si la bacteria huésped está o estuvo presente (EFSA, 2009b).

Inicialmente se exploró la habilidad de los fagos como agentes terapéuticos, pero, fueron desplazados rápidamente con la introducción de los antibióticos (Carlton, 1999). Sin embargo, actualmente su aplicación en la industria alimentaria va en aumento y una variedad de estudios sobre queso, frutas, verduras, pescado entre otros alimentos respaldan su efectividad en el control de la contaminación por microorganismos patógenos

manteniendo la calidad del producto (Leverentz *et al.*, 2001; Leverentz *et al.*, 2003; Carlton *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2009).

8.1. Replicación de los bacteriófagos

Como todos los virus, los fagos sólo son capaces de replicarse dentro de una célula huésped. Existen dos tipos principales de fagos: virulentos (líticos) y temperados. Los fagos líticos son la mejor opción para la descontaminación de patógenos porque, bajo condiciones específicas, causan la lisis celular de la bacteria y no integran su ácido desoxirribonucleico (ADN) a la bacteria huésped (Azeredo y Sutherland, 2008). Mientras que, los fagos temperados integran su ADN al material genético del huésped y se dividen con el ciclo normal de la bacteria (Abedon, 2008). Por tanto, el uso de fagos líticos puede evitar la posible transferencia horizontal de genes de resistencia bacteriana, producción de toxinas, etc. que ocurriría con el uso de fagos temperados (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

El proceso de multiplicación de los fagos líticos consta de varias fases (**Figura 3**). La primera etapa es de fijación, cuando el virus se une a la potencial célula huésped (Dimmock *et al.*, 2007). La mayoría de bacteriófagos tienen cola, la punta de los cuales se unen a receptores específicos (carbohidratos, proteínas y lipopolisacáridos) sobre la superficie del huésped bacteriano (Marks y Sharp, 2000). Esta especificidad implica que un fago sólo puede infectar ciertas bacterias que tienen el receptor, así se determina la gama de huéspedes del fago (Azeredo y Sutherland, 2008). La fijación mayormente es en la pared celular, pero existen otros receptores celulares en el pili, flagelo o cápsulas de la célula huésped (Dimmock *et al.*, 2007). Una vez fijado a la superficie de la célula, los bacteriófagos inyectan su ácido nucleico dentro del huésped (Marks y Sharp, 2000). Esta acción es probablemente ayudada por la acción de la lisosima que está incorporada en la cola del fago (Dimmock *et al.*, 2007). Teniendo el genoma viral disponible, es utilizado en la fase de biosíntesis donde se dirige la expresión de los genes y proteínas para ensamblar las nuevas partículas virales. Finalmente, la liberación de las partículas virales del huésped es posible por la lisis celular a través de la producción de enzimas inducidas por los fagos (Azeredo y Sutherland, 2008). Después, las nuevas partículas virales, buscan células para iniciar de nuevo el proceso (Dimmock *et al.*, 2007). Dependiendo de las especies y condiciones, cada fago “padre” puede producir aproximadamente un promedio de 200 “hijos” por ciclo lítico (Carlton, 1999).

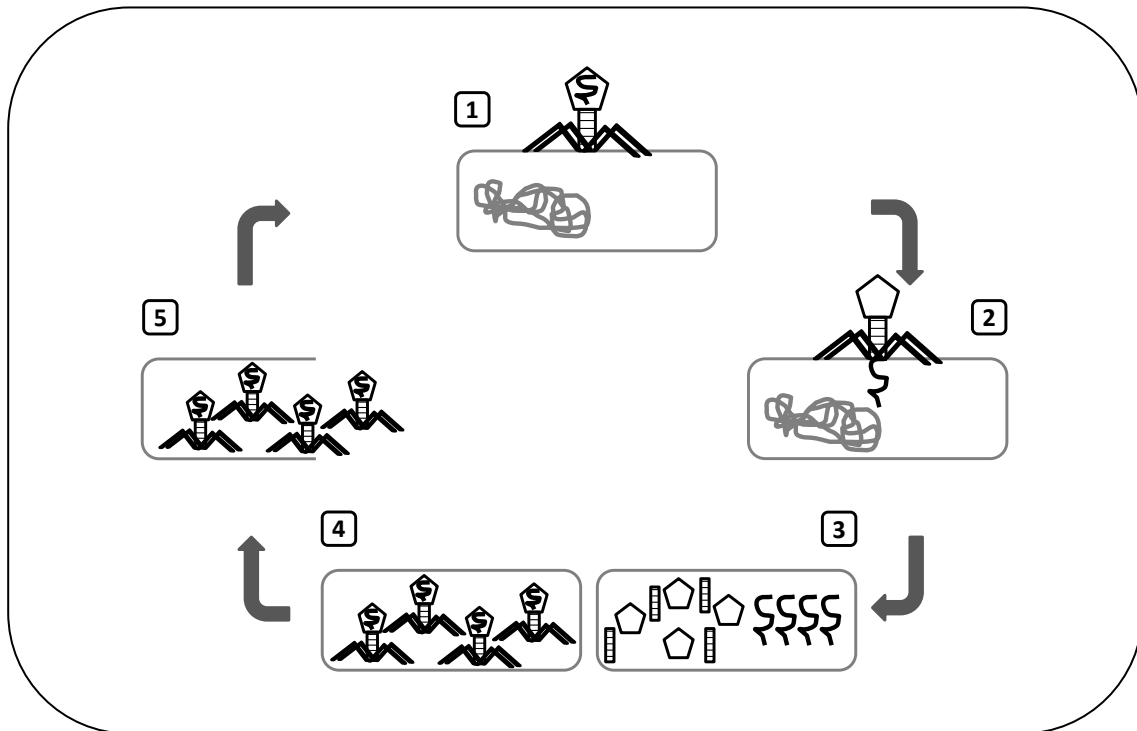


Figura 3. Ciclo lítico del bacteriófago. 1) Fijación del bacteriófago a bacteria huésped; 2) Inserción de ácido nucleico; 3 y 4) Biosíntesis y ensamblaje de partículas virales; y 5) Liberación de partículas virales.

En la lisis bacteriana están involucrados dos fenómenos, “lisis desde dentro” y “lisis desde fuera”. El tipo de lisis depende de la proporción entre fagos y bacterias, multiplicidad de infección (MOI, *Multiplicity Of Infection*). Con un MOI bajo, los fagos infectan las células, se multiplican y lisan las células desde dentro. Sin embargo, cuando el MOI es alto, un gran número de fagos se fijan a la célula y ocurre un debilitamiento de la pared celular, por tanto, las células son lisadas directamente sin multiplicación del fago y, en lugar de un incremento en el título del fago, se produce una disminución (Dimmock *et al.*, 2007).

8.2. Ventajas y desventajas del uso de bacteriófagos

Los fagos cuentan con algunas características que los convierten en buenos candidatos en el biocontrol de bacterias patógenas:

- Son altamente específicos (Sulakvelidze *et al.*, 2001) y por tanto se pueden usar para el control de especies diana sin afectar otros constituyentes deseables de la flora bacteriana (Greer, 2005).

- Puesto que los fagos están compuestos, generalmente, de proteínas y ácidos nucleicos, sus eventuales productos de degradación consisten exclusivamente de aminoácidos y ácidos nucleicos. Por tanto, no son xenobióticos y, a diferencia de los antibióticos y antisépticos, su introducción y distribución dentro de un ambiente dado puede ser visto como un proceso natural (Carlton *et al.*, 2005).
- En presencia de un número suficiente del huésped, los fagos se replican y continúan con la reinfección de otras bacterias huésped (Greer, 2005).
- Otra cualidad es la notable estabilidad de los fagos. Son tan variados y versátiles como sus huéspedes, algunos son capaces de sobrevivir en condiciones extremas de temperatura (hasta 95 °C) y pH muy bajos (pH 1) (Marks y Sharp, 2000; Greer, 2005).

A pesar de estas ventajas existen algunos argumentos que cuestionan la eficacia de los fagos como antimicrobianos:

- Los fagos pueden mutar de su estado lítico a temperado. Aunque este fenómeno se ha observado sólo en patógenos de plantas y animales, no existe evidencia que ocurra en alimentos (Greer, 2005).
- Una de las preocupaciones genéticas más críticas es la aparición de bacterias mutantes resistentes al fago. Sin embargo, las bacterias resistentes permanecen susceptibles a otros fagos con un diana similar. Además, el uso de mezclas de fagos de distintas familias también puede ayudar a resolver problemas con la resistencia bacteriana (Sulakvelidze *et al.*, 2001; Greer, 2005).
- Un impedimento importante del biocontrol por fagos es la necesidad de una densidad umbral de bacteria huésped, que sería de importancia en el control de patógenos donde el número es normalmente bajo (Greer, 2005).
- Tal vez el obstáculo más grave es la reducida gama de huéspedes diana de un fago. Para hacer frente a este problema se propone el uso de una mezcla con diferentes fagos que puedan lisar a la mayoría de cepas del agente etiológico (Sulakvelidze *et al.*, 2001). Otra alternativa es la identificación de fagos que se unan a receptores celulares compartidos por varias cepas bacterianas (Greer, 2005).

8.3. Susceptibilidad de los biofilms a los bacteriófagos

Teóricamente, un biofilm debería ser rápidamente infectado porque las células están más cerca unas de otras y este hecho podría favorecer la replicación del fago. Sin embargo, la estructura y composición del biofilm, así como la fisiología de las células del biofilm, pueden imponer algunas limitaciones a su infección (Sharma *et al.*, 2005; Azeredo y Sutherland, 2008). Esto se debe a que la matriz del biofilm puede plantear un serio obstáculo para la penetración del fago, limitando la difusión del fago hacia el interior del biofilm. Además el biofilm es un reservorio de enzimas proteolíticas como las endoglucanasas que pueden llevar a la inactivación del fago (Azeredo y Sutherland, 2008). Sin embargo, algunos fagos poseen enzimas que degradan las EPS, por tanto, son capaces de romper la estructura del biofilm y facilitar el acceso de los fagos al biofilm (Azeredo y Sutherland, 2008; Hudson *et al.*, 2010). Así los fagos que expresan enzimas capaces de degradar las EPS, son más eficaces removiendo los biofilms bacterianos que los fagos no enzimáticos (Lu y Collins, 2007). Además, existe evidencia del incremento de la susceptibilidad a los desinfectantes cuando los biofilms son previamente tratados con la enzima polisacárido depolimerasa de fagos. En consecuencia, se obtiene una mejor remoción y eliminación del biofilm (Tait *et al.*, 2002).

Sin embargo, la oportunidad de conseguir un fago específico con una alta capacidad lítica y, preferiblemente, que exprese una enzima que degrade las EPS, es de baja probabilidad. La ingeniería de los fagos puede jugar un papel importante en este proceso, ya que puede modificarlos genéticamente para alterar su gama de huéspedes e inducir la producción de depolimerasas (Azeredo y Sutherland, 2008).

La presencia de células muertas y la reducida actividad metabólica de las células del biofilm, también son consideradas una dificultad en la progresión de la infección. Debido a que la infección de los fagos y su ciclo vital, en general, dependen fuertemente de la etapa de crecimiento de su huésped bacteriano y las células muertas pueden servir sólo como receptoras de partículas virales pero no como huéspedes para su multiplicación (Azeredo y Sutherland, 2008).

8.4. Aspecto legal sobre el uso de bacteriófagos

El uso de fagos ha sido aceptado a nivel industrial desde hace algunos años. En 2006, la FDA aprobó, en su listado de aditivos de alimentos, el uso de una mezcla de seis fagos (21 CFR

172, Intralytix, Inc.) como agente antimicrobiano contra *L. monocytogenes* en productos de carne y ave listos para el consumo (FDA, 2011). En este mismo año, se designó al preparado de bacteriófagos P100 (Listex™ P100, EBI *Food Safety*) como una sustancia generalmente reconocida como segura (GRAS, *Substances Generally Recognized as Safe*), para ser usado como antimicrobiano contra *L. monocytogenes* inicialmente sobre quesos brie, cheddar, suizo y otros quesos envejecidos y madurados (FDA, 2012a). Posteriormente, se aceptó su uso sobre alimentos en general, incluidos los productos de carne y ave (FDA, 2007). En 2011, la FDA incorporó al listado de sustancias en contacto con los alimentos, un preparado de fagos que consiste en una mezcla de tres cepas de fagos (EcoShield™, Intralytix, Inc.), que actúa reduciendo el nivel de contaminación de *E. coli* O157:H7 en superficies de carnes rojas (FDA, 2012b). Asimismo, el Servicio de Seguridad Alimentaria e Inspección (FSIS, *Food Safety and Inspection Service*), incluye la aplicación de fagos como agentes antimicrobianos, para el control de *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, en la tabla de ingredientes inocuos y adecuados en productos de carne, ave y huevo. Dentro de ellos considera a los fagos aprobados por la FDA, así como otros fagos con aceptabilidad aún por determinar (FSIS, 2012).

En la UE, en el 2009, la EFSA emitió su opinión científica y determinó que no se puede concluir si los bacteriófagos son capaces o no de proteger a los alimentos contra la recontaminación por bacterias patógenas. Enfatizó que el tratamiento puede variar con cada fago, matriz de alimento y con las condiciones de aplicación, incluyendo los factores ambientales (EFSA, 2009b). Así que en este mismo año, decidió no incluir a los bacteriófagos en su listado de microorganismos con “presunción cualificada de seguridad” agregados a los alimentos o piensos. Argumentó que cada fago debe ser evaluado, caso por caso, para demostrar la imposibilidad de un ciclo temperado y ausencia de cualquier gen de factor de virulencia o resistencia antimicrobiana. Además, de la imposibilidad que existe para ser asignados dentro de unidades taxonómicas precisas (géneros y especies) (EFSA, 2009a). En 2012, la EFSA evaluó el informe sobre el uso de Listex™ P100 en superficies contaminadas de pescado crudo. Concluyó que el producto es toxicológicamente seguro y, por tanto, no nocivo para los consumidores, pero que falta reforzar las evidencias de su eficacia como agente descontaminante de *L. monocytogenes* en pescado crudo. Esto debido a que no se emitieron conclusiones definitivas de la eficacia de los fagos en la reducción de recuentos

bajos de *L. monocytogenes*, concentración que normalmente se encuentra en el pescado crudo, y que no fueron validados bajo las condiciones de una planta piloto o industrial (EFSA, 2012).

9. Control microbiológico en superficies

Las superficies son evaluadas para determinar si la población microbiana existente o residual se encuentra en un nivel aceptable y si ha ocurrido la destrucción de las variedades de microorganismos indeseados (Leveau y Bouix, 2002). Sin embargo, a pesar que el análisis microbiológico puede ser muy útil en la gestión de la seguridad alimentaria, los análisis deben seleccionarse y aplicarse conociendo tanto sus limitaciones como sus ventajas (ICMSF, 2004).

A continuación se describen los métodos, tanto convencionales como rápidos, utilizados para el control microbiológico de la higiene en las superficies de las industrias, principalmente en la alimentaria.

9.1. Métodos convencionales

Las técnicas de microbiología convencional involucran la extracción o toma de muestra de microorganismos de las superficies, y su posterior cultivo con métodos estándar en agar (Teufel y Redl, 2006).

9.1.1. Hisopos o esponjas

Son los métodos no destructivos más usados para valorar la efectividad de los procesos de limpieza y desinfección aplicados en la industria alimentaria (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2008). La superficie a evaluar se frota y los microorganismos se transfieren con el hisopo o esponja dentro de un diluyente. Posteriormente, ésta solución puede ser cultivada en placas de agar o analizada por otra metodología (Salo *et al.*, 2000). A diferencia de las placas de contacto, estos dispositivos permiten evaluar cualquier forma o área de superficie y son relativamente económicos (Mostert *et al.*, 2005). Sin embargo, al igual que las placas de contacto, presentan la incapacidad de recuperar con eficacia todos los microorganismos de la superficie, valor que puede ser tan sólo de un 20% (Salo *et al.*, 2000). Adicionalmente, para el hisopo o esponja, la detección y el recuento dependen también de la liberación eficaz de

los microorganismos del material para su posterior recuperación, por ejemplo para las células que forman parte de un biofilm que presentan resistencia al desprendimiento (Salo *et al.*, 2000; Moore y Griffith, 2002; Moore y Griffith, 2007).

En superficies textiles, no se aplica comúnmente, debido a que el arrastre en superficies muy porosas hace que la recuperación se torne más difícil (Scott *et al.*, 2008; Valentine *et al.*, 2008).

9.1.2. Placas de contacto

Utilizando un soporte con agar, los microorganismos adheridos a las superficies de estudio se transfieren presionando el agar sobre la superficie (Salo *et al.*, 2000). Dependiendo del estudio a realizar, se puede emplear un agar neutro o uno selectivo para determinar la presencia de un tipo de microorganismo en particular (Bergen *et al.*, 2009). Presentan una mejor reproducibilidad y relativamente un bajo coste frente al hisopado. Sin embargo, sólo pueden ser usadas en superficies planas y lisas [*dipslide* y placas de detección y recuento de microorganismos (RODAC, *Replicate Organism Detection and Counting*)], los microorganismos móviles pueden cubrir la superficie del agar, suelen dejar residuos de agar sobre la superficie muestreada y, dependiendo del número de microorganismos en la superficie, sólo puede ser semi-cuantitativa (Mostert *et al.*, 2005). Este método se ha usado para el estudio microbiológico tanto de superficies duras como de superficies textiles (Lues y Van Tonder, 2007; Teufel *et al.*, 2008; Fijan *et al.*, 2008; Bergen *et al.*, 2009).

9.1.3. Extracción de microorganismos de fracciones de superficies

Consiste en transferir un segmento de la superficie de trabajo a un medio líquido que puede ser solución salina normal, enriquecida o una solución neutralizante para prevenir la actividad inhibidora de agentes antimicrobianos (Anónimo, 2002; Traoré *et al.*, 2002; Gerba y Kennedy, 2007; Christison *et al.*, 2007). Posteriormente, se lleva a cabo el desprendimiento de los microorganismos de la superficie por agitación con/sin perlas de vidrio o por sonicación (Anónimo, 2002; Christison *et al.*, 2007; Sivakumar *et al.*, 2010; Fijan y Šostar-Turk, 2010). La agitación con perlas de vidrio permite remover con mayor eficacia las bacterias que se encuentran dentro de un biofilm (Lindsay y Von Holy, 1997). Finalmente la detección de los microorganismos se realiza por siembra en un medio de cultivo o por otro método de detección. Este método es más sensible comparado con la placa de contacto

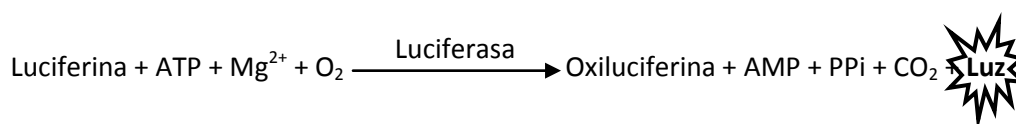
(Patel *et al.*, 2006). Es el método más usado para la recuperación de microorganismos a partir de superficies textiles (Patel *et al.*, 2006; Christison *et al.*, 2007; Little y Sagoo, 2009; Kangwansupamonkon *et al.*, 2009; Sivakumar *et al.*, 2010).

9.2. Métodos rápidos

En general, los métodos rápidos son métodos independientes del cultivo y representan una alternativa para superar la dificultad de cultivar comunidades microbianas complejas (Teufel y Redl, 2006). A continuación se describen los más importantes.

9.2.1. Bioluminiscencia o prueba de ATP

El adenosin trifosfato (ATP, *Adenosine Triphosphate*) está presente en todas las células vivas y su cantidad por célula es bastante constante (Ishida *et al.*, 2002). La prueba de ATP se basa en la bioluminiscencia, que es la propiedad que tienen algunos organismos de producir luz, específicamente en la reacción que produce de forma natural la luciérnaga de América del Norte, *Photinus pyralis*. En este caso, la enzima luciferasa utiliza la energía química contenida en la molécula de ATP para catalizar la reacción oxidativa de la luciferina, que genera un producto inestable que se descompone y produce luz (Aycicek *et al.*, 2006). La emisión de luz se mide utilizando un luminómetro y se expresa en unidades relativas de luz (URL), así la lectura es proporcional al contenido de ATP (Aycicek *et al.*, 2006).



Es una técnica rápida, simple, que facilita su uso como prueba de campo (Vilar *et al.*, 2008). Sin embargo, los resultados positivos pueden indicar la presencia de ATP proveniente tanto de microorganismos así como de materia que contiene ATP, por ejemplo, residuos de alimentos (Poulis *et al.*, 1993; Vilar *et al.*, 2008). Por tanto, el resultado se refiere al estado de “higiene” de una superficie (Lelieveld *et al.*, 2003). Además, la técnica no es muy sensible y por consiguiente no es adecuada para medir la higiene de equipos donde se necesita esterilidad absoluta (Mostert *et al.*, 2005).

9.2.2. Técnicas microscópicas

Existen varias técnicas microscópicas para estudiar la adhesión celular y formación de biofilms en superficies: microscopía de epifluorescencia, microscopía electrónica de barrido y transmisión, espectrofotómetro infrarrojo transformada de Fourier, láser confocal de barrido y técnicas de microscopía de fuerza atómica (Mostert *et al.*, 2005).

La microscopía de epifluorescencia directa (DEM, *Direct Epifluorescence Microscopic*) se ha convertido en la técnica de microscopía ideal para examinar especímenes biológicos, fijados o vivos, porque permite la detección selectiva y específica de moléculas en concentraciones pequeñas (Yuste, 2005). Donde los objetos de interés fluorescen en un fondo negro por medio de sondas fluorescentes, que permiten marcar virtualmente cualquier aspecto de los sistemas biológicos (Lichtman y Conchello, 2005).

La fluorescencia es la propiedad que exhiben algunas moléculas, denominadas fluoróforos, que absorben energía a una longitud de onda menor y específica que provoca alteraciones en el estado electrónico, vibracional y rotacional, y después de cierto periodo de tiempo, emiten una porción de esta energía a una longitud de onda mayor y específica (Herman, 1998; Lichtman y Conchello, 2005; Petty, 2007). En la **Tabla 8** se encuentran las características de los fluoróforos utilizados para evaluar la actividad celular o viabilidad de los microorganismos.

Los microscopios de fluorescencia deben cumplir cuatro funciones: (1) proporcionar una luz de excitación con longitudes de onda adecuadas al espécimen; (2) separar la luz de excitación de la luz de fluorescencia emitida; (3) coleccionar la mayor cantidad posible de fluorescencia emitida por los fluoróforos; y (4) permitir la observación de los detalles finos de la muestra (Herman, 1998). En el microscopio de epifluorescencia el objetivo no sólo tiene como función enfocar y amplificar la muestra, sino que sirve como un condensador que ilumina la muestra. Por este motivo, el microscopio posee tres elementos: filtro de excitación, espejo dicróico y filtro de emisión, que conjuntamente permiten la separación de buena calidad entre la luz de excitación y de emisión (Lichtman y Conchello, 2005) (**Figura 4**).

Tabla 8. Criterios y fluoróforos utilizados para evaluar la viabilidad de los microorganismos.

| Criterio | Fluoróforo | Característica |
|--|--|--|
| Permeabilidad de la membrana | PO-PRO-3 | Se une al ADN intracelular de células con membrana lesionada, es decir permeables (Votyakova <i>et al.</i> , 1994) |
| | SYBR green | Se utiliza en combinación con yoduro de propidio para medir la permeabilidad de la membrana citoplasmática (Berney <i>et al.</i> , 2007) |
| | SYTO [®] 9 | Se une al ADN de todas las células (verde), con membrana citoplasmática intacta y lesionada (Baena-Ruano <i>et al.</i> , 2006). Atraviesa la membrana plasmática intacta debido a su bajo peso molecular. Se utiliza en combinación con yoduro de propidio (Sachidanandham <i>et al.</i> , 2005) |
| | SYTOX Green | SYTOX Green se une al ADN (Breeuwer y Abee, 2000). Ingresa en organismos con membrana plasmática lesionada (Suller y Lloyd, 1999; Créach <i>et al.</i> , 2003) |
| | Yoduro de propidio (PI) | Sonda de ADN (Breeuwer y Abee, 2000) que penetra sólo células con membrana lesionada (rojo) (Baena-Ruano <i>et al.</i> , 2006). No pasa a través de la membrana plasmática intacta debido a su gran peso molecular (Sachidanandham <i>et al.</i> , 2005) |
| Respiración celular | Cloruro de 5-ciano-2,3-ditolil tetrazolio | Produce un precipitado rojo fluorescente cuando es reducido por el sistema transportador de electrones de las células bacterianas (Créach <i>et al.</i> , 2003) |
| Membranas intactas y actividad esterasa | Diacetato de fluoresceína / Bromuro de etidio (EB) | El diacetato de fluoresceína es absorbido por las células y escindida por enzimas intracelulares para dar el producto fluorescente fluoresceína (verde) (Breeuwer y Abee, 2000). Las células muertas no metabolizan FDA y son permeables al contraste EB (naranja) (Hannig <i>et al.</i> , 2007) |
| Potencial de membrana | DiBAC ₄ | Ingresa en organismos con membrana plasmática lesionada. Por tanto, mide la despolarización de la membrana (Suller y Lloyd, 1999) |
| | Oxonol | Su acumulación dentro de la célula es favorecida por la reducción en el potencial de membrana (Joux y Lebaron, 2000). Por tanto, mide la despolarización de la membrana (López-Amorós <i>et al.</i> , 1995) |
| | Rodamina y cianinas | Las células con potencial de membrana (interior con carga negativa) acumulan rodamina y cianina (Breeuwer y Abee, 2000) |
| pH intracelular | Fluoresceína, BCECF, piranina y cSNARF-1 | Miden el pH intracelular de las células (Breeuwer y Abee, 2000). Las células viables mantienen el pH interno y no son afectadas por el pH externo, mientras que las lesionadas varían su pH interno (McFeters <i>et al.</i> , 1995) |
| Recuento total | 4,6-diamino-2-fenilindol | Tinción de contraste. Tiñe el ADN de todas las células (azul) (Boulos <i>et al.</i> , 1999). Pasa a través de la membrana celular de células viables y muertas (Hannig <i>et al.</i> , 2007) |
| | Naranja de acridina | Se une al ADN y ARN (Whitehead <i>et al.</i> , 2009). Los ácidos nucleicos monocatenarios se tiñen de rojo y los de cadena doble verde. No se puede distinguir entre células vivas y muertas. Sin embargo, con la interpretación clásica las bacterias verdes son consideradas inactivas, mientras que las rojas se cree que son activas (McFeters <i>et al.</i> , 1995) |

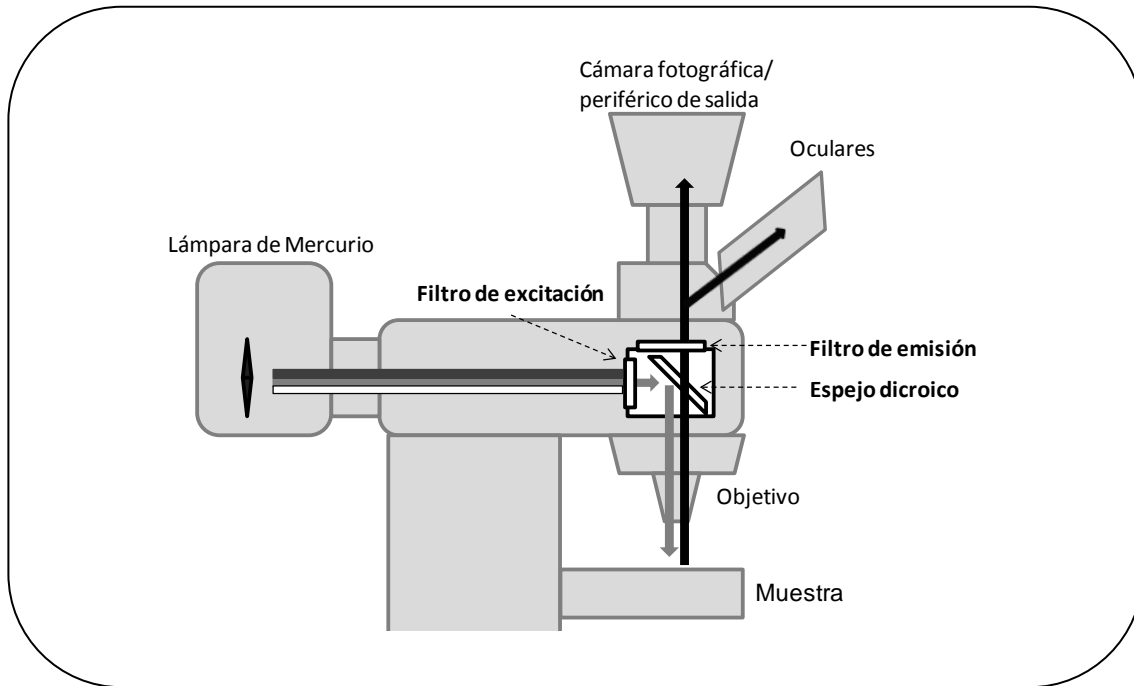


Figura 4. Funcionamiento de un microscopio de epifluorescencia. Flecha gris: Luz de excitación; Flecha negra: Luz de emisión.

La ventaja de esta técnica es que nos brinda la posibilidad de observar a los microorganismos en interacción con el sustrato y la forma en que se encuentran distribuidos y/o agrupados, por tanto puede ser útil para una evaluación rápida de la higiene de una superficie (Holah *et al.*, 1989). Sin embargo, presenta como desventaja el bajo límite de detección que posee, y por tanto resulta muy tedioso detectar menos de 10^3 células cm^{-2} en una muestra (Joux y Lebaron, 2000).

9.2.1. Citometría de flujo

Es un proceso que realiza medidas de las características físicas o químicas de una sola célula u otras partículas biológicas, o no biológicas, de aproximadamente el mismo tamaño, mientras estas pasan en una corriente de flujo (Shapiro, 2005). Con esta técnica las células son forzadas a moverse rápidamente en una sola fila a través de una fuente de luz con alto poder, midiendo la viabilidad de un número de organismos estadísticamente significativo (5 000 – 25 000 células por muestra) (Mostert *et al.*, 2005).

La citometría de flujo usada con sondas fluorescentes permite medir propiedades funcionales y estructurales de células individuales en una población. Las células son

marcadas con fluorocromos específicos o con conjugados fluorescentes que se unen con alta especificidad a un constituyente celular particular, es posible medir una amplia variedad de constituyentes celulares como proteínas, carbohidratos, ADN, ácido ribonucleico (ARN) y enzimas (Ivnitski *et al.*, 1999). Las ventajas de la citometría de flujo son la exactitud, velocidad, sensibilidad y reproducibilidad (Mostert *et al.*, 2005).

9.2.2. Métodos inmunológicos

El Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzima (ELISA, *Enzyme-linked immunosorbent assay*) es la fuente de inspiración para muchas aplicaciones de biosensores. El tipo más común es ELISA tipo sándwich (Lazcka *et al.*, 2007). En este sistema el anticuerpo primario es inmovilizado sobre un soporte sólido, la muestra con el antígeno es adicionada a este soporte. Posterior a un paso de incubación, el material no unido se enjuaga y se agrega el anticuerpo secundario conjugado con una enzima para formar un “sándwich” del antígeno entre las dos moléculas de anticuerpos (de Boer y Beumer, 1999; Gracias y McKillip, 2004). La cantidad de señal emitida se relaciona con la cantidad de antígeno diana en la muestra. Si la enzima está presente, el sustrato apropiado será modificado, dando lugar a un producto que puede ser detectado por colorimetría o técnicas fluorométricas (de Boer y Beumer, 1999). Los métodos ELISA tienen un límite de detección típico de 10^4 UFC ml⁻¹, por consiguiente la detección directa de los microorganismos no es posible y necesita de un enriquecimiento previo con un mínimo de 16 – 24 h de incubación (de Boer y Beumer, 1999; Gracias y McKillip, 2004).

Las técnicas de anticuerpos son fácilmente automatizadas y rentables. Un ejemplo es el sistema de Ensayo de Inmuno Diagnóstico Vitek (VIDAS, *Vitek Immuno Diagnostic Assay System*) basado en el ensayo fluorescente ligado a enzimas automatizado (ELFA, *automated Enzyme-Linked Fluorescent Assay*) (Lazcka *et al.*, 2007). Otro ejemplo es la técnica de separación inmunomagnética (IMS, *Inmunomagnetic Separation*), que utiliza perlas de hierro recubiertas de anticuerpos, así el microorganismo en suspensión se une a las perlas inmunomagnéticas, a continuación, el material es expuesto a un campo magnético que básicamente extrae las bacterias de la suspensión, concentrando la cantidad de microorganismos de la muestra para su posterior detección o cuantificación (de Boer y Beumer, 1999; Nugen y Baeumner, 2008). La IMS puede ser combinada con casi cualquier

método de detección como el cultivo o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) (Gracias y McKillip, 2004; Nugen y Baeumner, 2008).

9.2.3. PCR en tiempo real

Los formatos de las sondas de detección adaptados a los instrumentos de tiempo real, ha sido gracias a la construcción de sondas de oligonucleótidos con doble marcado, basadas en el principio de Transferencia de Energía de Resonancia fluorescente (FRET, *Fluorescent Resonance Energy Transfer*), es decir, que emiten una señal de fluorescencia sólo cuando están separadas (Giulietti *et al.*, 2001). Estas sondas incluyen los sistemas TaqMan y otros más sofisticados como *Molecular Beacons*, *scorpions* y sondas de hibridación que no necesitan hidrólisis por la actividad nucleasa de la *Taq* (Giulietti *et al.*, 2001; Reischl *et al.*, 2002). Por otro lado, el uso de colorantes de ADN bicatenario como SYBR Green, también resulta muy útil en la detección de productos de PCR, sin la necesidad de usar una sonda cara y selectiva (Giulietti *et al.*, 2001).

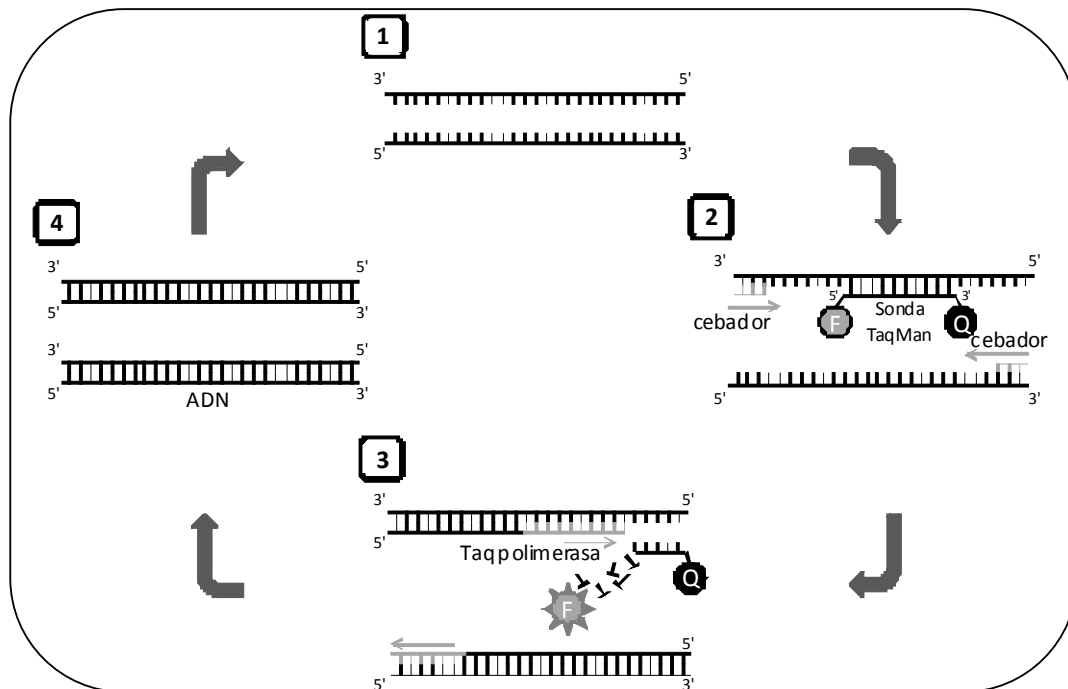


Figura 5. Principio del sistema TaqMan. 1) Desnaturalización; 2) Hibridación; 3) Amplificación y emisión de fluorescencia; 4) Dos cadenas nuevas de ADN. Sonda TaqMan: emisor de fluorescencia (F, *reporter*) y extintor de fluorescencia (Q, *quencher*).

El sistema de PCR TaqMan utiliza una sonda no amplificable por su extremo 3' para asegurar que no actúe como cebador (Arya *et al.*, 2005). La sonda contiene un emisor de fluorescencia (F, *reporter*) en su extremo 5' y un extintor de fluorescencia (Q, *quencher*) en su extremo 3' (Reischl *et al.*, 2002). Si la secuencia diana está presente, después de la desnaturalización de la doble hebra de ADN, la sonda TaqMan y los cebadores se hibridan a una de las hebras simples de ADN (Wilhelm y Pingoud, 2003; Arya *et al.*, 2005). En esta fase con la sonda aún intacta, la fluorescencia de emisión es absorbida por el *quencher*, principio FRET (Heid *et al.*, 1996). Posteriormente, ocurre la extensión de los cebadores hibridados por medio de la Taq polimerasa (Saiki *et al.*, 1988). La Taq polimerasa hidroliza la sonda y separa el *reporter* del *quencher*, dando como resultado un aumento de la fluorescencia (Giulietti *et al.*, 2001) (**Figura 5**).

El aumento de la fluorescencia de emisión durante la reacción de PCR es detectada en tiempo real por el termociclador y con los datos de fluorescencia obtenidos el programa construye el gráfico de amplificación (**Figura 6**) (Arya *et al.*, 2005). La curva de amplificación consta de tres fases distintas: 1) una fase inicial lag en donde la acumulación de producto no puede ser medida, 2) una fase exponencial y 3) una fase estacionaria (Wilhelm y Pingoud, 2003). El punto en donde ocurre el primer incremento significativo de fluorescencia que

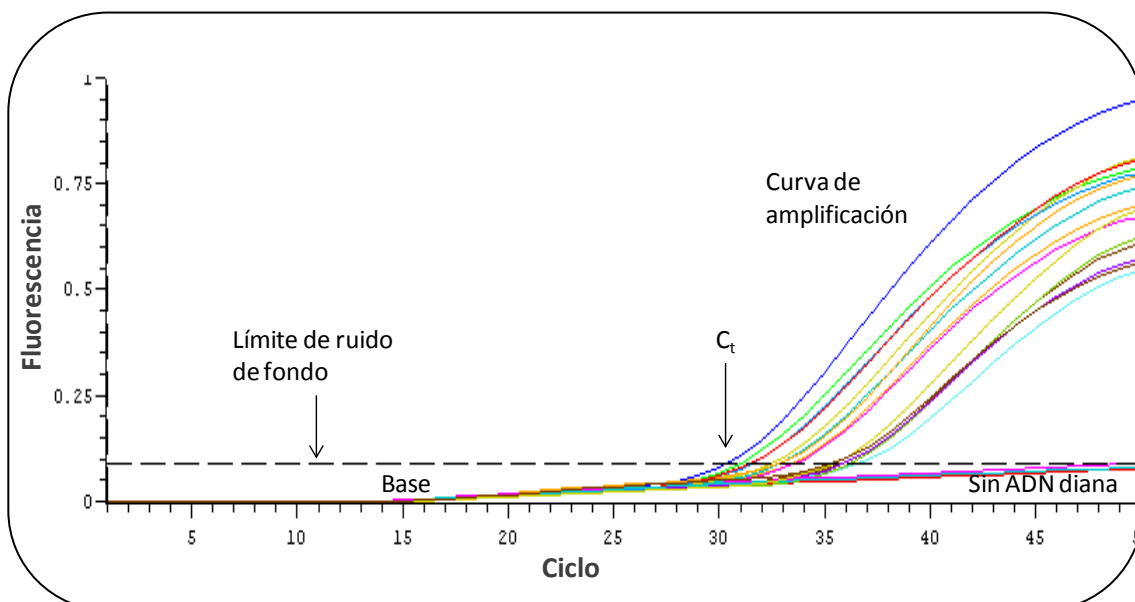


Figura 6. Curva de amplificación de la fluorescencia emitida en RTi-PCR.

excede el ruido de fondo, se define como ciclo umbral (C_t , *threshold cycle*) (Heid *et al.*, 1996). El valor de C_t sirve para determinar la presencia del ADN diana así como para estimar con gran precisión su cantidad inicial (Wilhelm y Pingoud, 2003). A mayor presencia de ADN diana al inicio de la reacción, menor número de ciclos serán necesarios para alcanzar el C_t (Arya *et al.*, 2005). Además, la PCR en tiempo real (RTi-PCR, *Real-Time PCR*) incluye un control interno de amplificación (IAC, *Internal Amplification Control*) que permite detectar la presencia de inhibición durante la amplificación previendo resultados falsos negativos. El IAC es amplificado al mismo tiempo que el gen diana pero es detectado por un segundo fluoróforo. Si el IAC y ADN diana tienen valores de C_t igual a cero, indica que un inhibidor estuvo presente y el ensayo de PCR necesita ser repetido (Uyttendaele *et al.*, 2003).

La RTi-PCR permite la obtención de resultados en pocas horas, manteniendo un alto nivel de sensibilidad y especificidad (Lazcka *et al.*, 2007; Nugen y Baeumner, 2008). No obstante, una desventaja principal es que puede producir inhibición de la enzima polimerasa por contaminantes de la muestra, y se pueden obtener falsos positivos como resultado de la detección de ácidos nucleicos libres o microorganismos no viables. Para superar este inconveniente se incorpora un paso de enriquecimiento para reducir los contaminantes. La PCR se puede acoplar con otros métodos, por ejemplo PCR unido a biosensor o IMS (Nugen y Baeumner, 2008; Nayak *et al.*, 2009).

9.2.4. Biosensores

El uso de biosensores nos proporciona una herramienta portátil, rápida, sensible y con inmediata interpretación de los resultados “sobre el terreno”. Además, de la posibilidad de detectar la presencia y cantidad de microorganismos en cualquier ambiente (Ivnitski *et al.*, 1999; Nayak *et al.*, 2009).

Un biosensor básico incluye un sustrato (silicio, vidrio o polímeros) recubierto por una capa conductora (polisilicio, dióxido de silicio, nitrito de silicio, metal y óxidos metálicos) (Nayak *et al.*, 2009). Generalmente, para la detección bacteriana, incluye un componente de reconocimiento biológico como enzimas, ácidos nucleicos o anticuerpos que están íntimamente asociados o integrados a un transductor fisicoquímico o microsistema de transducción, que puede ser óptico, electroquímico, termoquímico, piezoeléctrico, magnético o micromecánico (Ivnitski *et al.*, 1999; Lazcka *et al.*, 2007). Cuando se usan

enzimas, tienden a funcionar como marcadores en lugar de elementos reales de reconocimiento bacteriano. Pueden ser usadas para marcar anticuerpos o sondas de ADN, de la misma manera como en la prueba de ELISA. Sin embargo, el uso de anticuerpos está más difundido que el uso de sondas de ADN. Los anticuerpos pueden ser policlonales, monoclonales o recombinantes, dependiendo de sus propiedades selectivas y la forma en que son sintetizados (Lazcka *et al.*, 2007). Para la detección de patógenos de origen alimentario, se han desarrollado diversos biosensores con un rango y límite de detección alrededor de $1,0 \times 10^3$ células ml^{-1} para *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *S. Typhimurium*, *Legionella pneumophila*, *C. jejuni* y *Listeria*. Sin embargo, también se ha logrado conseguir una sensibilidad de 30 UFC de *E. coli* ml^{-1} de agua. El tiempo de detección de los biosensores es variable, por ejemplo desde 15 minutos para la detección *Listeria*, o menos de una hora en la detección de *E. coli* (Nugen y Baeumner, 2008; Nayak *et al.*, 2009).

IV. Evaluación del método de cultivo convencional, RTi-PCR y DEM para el control microbiológico de superficies textiles

1. Material y Métodos

1.1. Superficies de prueba

Se utilizaron textiles 100% algodón en color blanco. Previo a su uso, los textiles se sometieron a un tratamiento para eliminar posibles sustancias inhibidoras: un lavado a 90 °C con un detergente de lavandería líquido sin blanqueador, tres enjuagues y un secado (Traoré *et al.*, 2002; O'Toole *et al.*, 2009). Posteriormente, se cortaron en piezas rectangulares (área 10 cm²), se esterilizaron a 121 °C durante 15 min y se secaron.

1.2. Cepa bacteriana y preparación del inóculo

Se utilizó la cepa de referencia de *S. aureus* ATCC 6538 perteneciente a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, *American Type Culture Collection*; Manassas, EE.UU.). La cepa liofilizada fue rehidratada en agua de peptona tamponada (BPW, *Buffered Peptone Water*; bioMérieux®, Marcy l'Etoile, Francia) a 37 °C durante 18 – 24 h. Después se sembró por el método de estría en Agar Tripticosa de Soja (TSA, *Tryptic Soy Agar*; Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia). Se seleccionaron colonias aisladas para preparar cultivos stock en tubos de TSA inclinado, se incubaron a 37 °C durante 24 h y se almacenaron a 4 °C por un máximo de un mes. A partir del cultivo en tubo inclinado, se preparó el inóculo bacteriano, subcultivando en 9 ml de BPW e incubando a 37 °C durante 18 a 20 h para obtener un cultivo en fase estacionaria. A partir del cultivo obtenido, se realizaron diluciones decimales (10⁻¹ a 10⁻⁷) en Solución Salina Triptona [TSS, *Tryptone Saline Solution*; 1 g de triptona (Becton Dickinson and Co.) y 8,5 g de cloruro de sodio (Panreac Química S.A., Castellar del Vallès, España) por litro; pH 7,0 ± 0,2].

1.3. Inoculación y tratamiento de los textiles de prueba

Los textiles de prueba se colocaron en placas de Petri y se inocularon en la parte central con 150 µl de cada una de las diluciones realizadas anteriormente. Paralelamente, se realizó el recuento de la carga microbiana inoculada, sembrando el inóculo por triplicado en TSA. Para favorecer la adhesión y el secado del inóculo sobre los textiles, se introdujeron las placas de Petri, con las tapas ligeramente abiertas, en una estufa a 37 °C durante 60 min (Anónimo, 2002). Posteriormente, se evaluó el recuento de microorganismos mediante el método de cultivo convencional, RTi-PCR y DEM.

1.4. Evaluación de la carga microbiana en textiles por método de cultivo convencional

Para extraer los microorganismos adheridos a las superficies, los textiles se colocaron en frascos con 5 ml de Caldo Tripticasa de Soja (TSB, *Tryptic Soy Broth*; Becton Dickinson and Co.) conteniendo 1 g por litro de Tween 80 (Panreac Química S.A.) y 3 g de perlas de vidrio (diámetro 2 mm). Los frascos se homogeneizaron con un agitador mecánico a alta velocidad durante 1 min (Anónimo, 2002), se dejaron en reposo 5 min y se agitaron de nuevo durante 15 s. Seguidamente, a partir de la suspensión obtenida se realizaron diluciones decimales en TSS y, a partir de las diluciones adecuadas, se sembró por duplicado 1 ml en medio TSA conteniendo 6 g por litro de extracto de levadura (TSAYE, *TSA with Yeast Extract*; Becton Dickinson and Co.). Finalmente se incubaron a 37 °C durante 24 h. Se realizó el recuento en las placas que presentaron entre 30 y 300 unidades formadoras de colonia (UFC). Los datos se expresaron como UFC por centímetro cuadrado.

1.5. Evaluación de la carga microbiana en textiles por RTi-PCR

Para extraer y purificar el ADN, se utilizó el kit TaqMan® *Staphylococcus aureus* (Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. A partir de las suspensiones obtenidas de los textiles en la sección 1.4. de este capítulo, se tomaron alícuotas de 1 ml y se transfirieron a tubos Eppendorf de 1,5 ml (SUDELAB S.L., Barcelona, España). Cada suspensión se centrifugó a 11 700 x *g* durante 3 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 100 µl de reactivo de preparación de muestra PrepMan Ultra. Después se calentó a 100 °C durante 10 min, se homogeneizó en un agitador mecánico durante 1 min y se centrifugó nuevamente a 11 700 x *g* durante 3 min. Inmediatamente se tomó una alícuota de 50 µl del sobrenadante con el ADN extraído y se almacenó a -20 °C para su posterior amplificación por PCR.

Para la amplificación del ADN, se realizó una dilución del sobrenadante en agua (1:10). A continuación, se tomó una alícuota de 12 µl de la dilución y se añadieron 15 µl de reactivo 2X *Environmental Master Mix* (EMM) más 3 µl de reactivo 10X *Target Assay Mix* (TAM), alcanzando un volumen total de reacción de 30 µl. La mezcla EMM y TAM contiene entre otros componentes, un IAC que permite confirmar una correcta amplificación del ADN. Se trata de un ADN sintético que es amplificado al mismo tiempo que la secuencia diana del microorganismo, pero es detectado con un segundo fluoróforo. La sonda marcada en el

extremo 5' con 4,7,2'-tricloro-7'-fenil-6-carboxifluoresceína (VIC) detecta IAC y con 6-carboxifluoresceína (FAM) detecta *S. aureus*. Ambas sondas marcadas por su extremo 3' con 6-carboxi-tetrametil-rodamina (TAMRA), como *quencher*.

El protocolo de PCR fue: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, y series de 45 ciclos a 95 °C durante 15 s (desnaturalización) y 60 °C durante 1 min (hibridación, amplificación). Para realizar el protocolo térmico se usó el equipo Chromo4™ Real Time System (Bio-Rad, Hercules, California, EE.UU.). La visualización y el análisis de la amplificación se realizó mediante el software Opticon Monitor versión 3.1 (Bio-Rad Laboratories, California, EE.UU.). La medición de la fluorescencia se realizó automáticamente al final de cada paso de amplificación. Para determinar el número de microorganismos recuperados de los textiles, se usaron los valores de C_t correspondientes para estimar el número de *S. aureus* por centímetro cuadrado, de acuerdo a la curva estándar de calibración.

Para construir la curva estándar de calibración se utilizaron los valores de C_t obtenidos a partir de diluciones decimales del cultivo puro de *S. aureus*. Estos se graficaron frente a sus respectivos recuentos de células obtenidos por el método de cultivo convencional.

1.6. Evaluación de la carga microbiana en textiles por DEM

Los textiles inoculados se colocaron sobre portaobjetos y se humedecieron con 350 µl de solución salina (8,5 g de cloruro de sodio por litro; pH 6,5 – 7,2). Inmediatamente después se realizó la tinción vital utilizando el kit de viabilidad LIVE/DEAD® BacLight™ (L13152; Molecular Probes Inc., Oregon, EE.UU.) Este kit está compuesto por dos colorantes fluorescentes de ácidos nucleicos: SYTO®9 y PI. SYTO®9 penetra tanto células con membranas intactas como lesionadas. En contraste, PI penetra sólo células con la membrana lesionada y reduce el colorante SYTO®9. Por tanto, con la aplicación simultánea de estos colorantes en una proporción adecuada, las células viables con membrana intacta fluorescen en verde y las células muertas o lesionadas en rojo. La tinción se realizó agregando 30 µl de la mezcla de colorantes sobre los textiles a evaluar y se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 min, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La evaluación de las tinciones se realizó con el microscopio de epifluorescencia directa Olympus BX51/BX52 (Olympus, Tokio, Japón), equipado con una lámpara de mercurio de 100 W (USH-103OL,

Olympus), un filtro de doble paso (U-M51004 F/R – V2, Olympus) y una cámara digital DP50-CU (Olympus) acoplada.

Para enumerar las células bacterianas, las muestras se observaron con un objetivo de 20X. Se realizó el recuento de las células en diez campos elegidos al azar, el resultado se expresó por centímetro cuadrado. Las imágenes se analizaron con el programa analySIS Auto 3.2 (Soft Imaging System GMBH, Münster, Alemania) (Fuster-Valls *et al.*, 2008).

1.7. Análisis estadístico

Cada experimento se repitió tres veces en distintos días y los análisis se realizaron por duplicado. Los recuentos microbiológicos se transformaron en unidades logarítmicas [$\log_{10}(x + 1)$]. El valor de uno fue agregado al recuento para usar el valor cero en el análisis. Se realizó el análisis de regresión y la prueba de t-Student apareado con la finalidad de conocer la relación y las diferencias entre los métodos de cuantificación ($\alpha = 0,05$). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SAS para Windows versión 9.1 (SAS Institute, Inc., Cary, EE.UU.).

2. Resultados

2.1. Carga microbiana inoculada en textiles

La carga microbiana inoculada en los textiles se encontró entre 0,38 y 7,12 \log_{10} UFC cm^{-2} de *S. aureus*, correspondientes a las diluciones del cultivo puro determinados por el método de cultivo.

2.2. Evaluación de la carga microbiana en textiles por método de cultivo convencional

Los recuentos determinados por el método de cultivo convencional, de los microorganismos inoculados frente a los recuperados a partir de los textiles, mostraron una relación lineal en el intervalo de 0,38 a 7,12 \log_{10} UFC cm^{-2} (**Figura 7**) con un coeficiente de correlación muy elevado ($R = 0,99$) y no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre ellos.

2.3. Evaluación de la carga microbiana en textiles por RTi-PCR

Los valores de C_t de las diluciones decimales del cultivo puro de *S. aureus*, y sus correspondientes recuentos de células obtenidos por el método de cultivo convencional, mostraron una relación lineal en el intervalo entre 3×10 y 3×10^7 UFC ml^{-1} con un elevado

coeficiente de correlación ($R = 0,98$), lo que permitió construir una curva estándar de calibración adecuada.

A partir de la curva de calibración, los recuentos estimados por RTi-PCR de los microorganismos inoculados frente a los recuperados de los textiles, presentaron una relación lineal entre 2,13 y 7,12 \log_{10} UFC cm^{-2} con un elevado coeficiente de correlación ($R = 0,96$) y no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre ellos (**Figura 7**).

2.4. Evaluación de la carga microbiana en textiles por DEM

El recuento de los microorganismos inoculados frente a los recuentos determinados sobre los textiles por DEM presentaron una relación lineal entre 4,12 y 7,12 \log_{10} UFC cm^{-2} con un elevado coeficiente de correlación ($R = 0,99$). No obstante, se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre ellos. Los recuentos por DEM fueron menores en 1,5 unidades logarítmicas respecto a los recuentos de los microorganismos inicialmente inoculados en los textiles (**Figura 7**). La **Figura 8** muestra una imagen digital de un textil inoculado con *S. aureus*.

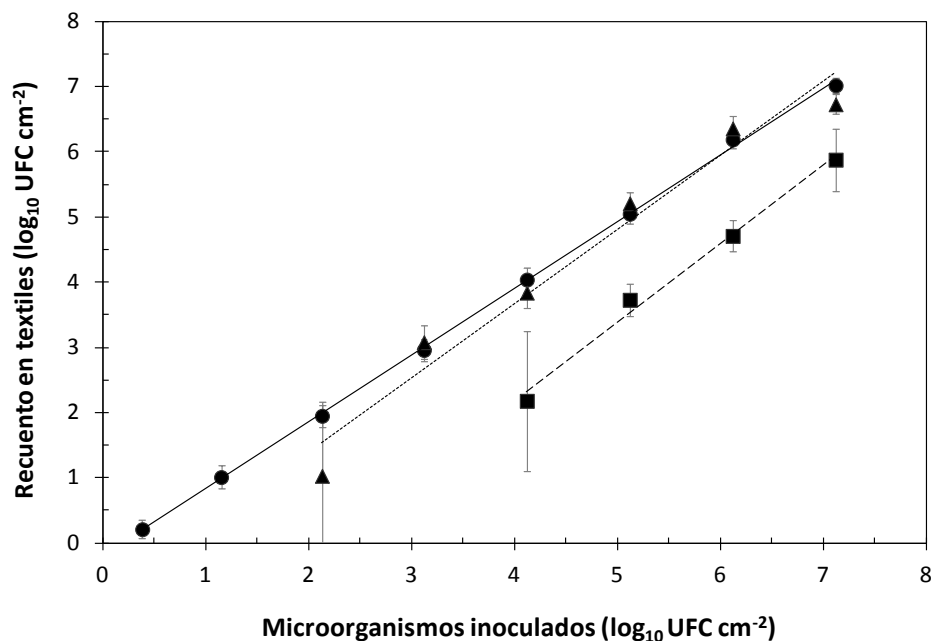


Figura 7. Comparación del recuento bacteriano determinado por ●, método de cultivo; ▲, RTi-PCR; y ■, DEM en textiles de algodón. Las barras de error representan la desviación estándar de la media ($n = 6$).

2.5. Comparación de RTi-PCR y DEM con el método de cultivo convencional

De los métodos evaluados, el método de cultivo convencional presentó el mejor límite de detección (**Figura 7**). Asimismo, se observó que los recuentos obtenidos por RTi-PCR, dentro del intervalo de cuantificación, no fueron significativamente diferentes ($P > 0,05$) de los obtenidos por método de cultivo convencional. Sin embargo, los recuentos obtenidos por DEM se observaron significativamente inferiores ($P < 0,001$) a los obtenidos por el método de cultivo convencional.

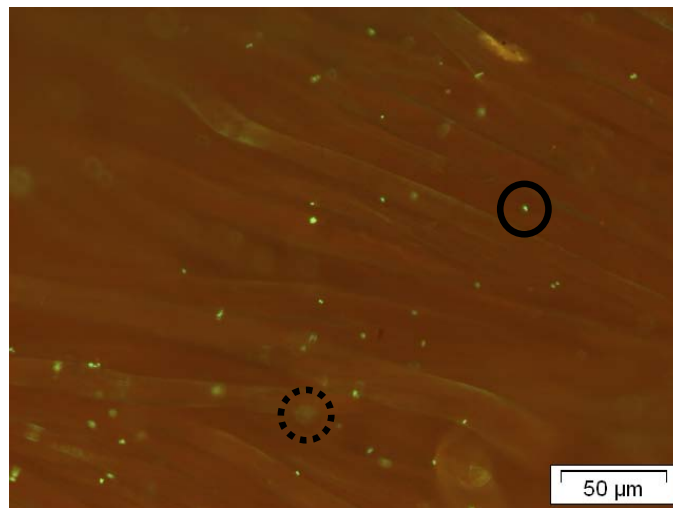


Figura 8. Textil de algodón inoculado con *S. aureus*. El círculo con línea sólida muestra una célula enfocada y el círculo con línea discontinua muestra una célula no enfocada. Imagen digital de epifluorescencia de la tinción con LIVE/DEAD® BacLight™ L13152.

3. Discusión

En este estudio se comparó el método de cultivo convencional, RTi-PCR y DEM para estimar el recuento de *S. aureus* en textiles. Se seleccionó este microorganismo porque se trata de un potencial patógeno de transmisión alimentaria, es resistente y se encuentra presente en textiles relacionados con el ambiente de procesamiento de alimentos (Christison *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2008; Todd *et al.*, 2009).

Los resultados mostraron que los recuentos obtenidos por el método de cultivo convencional y RTi-PCR no presentaron diferencias significativas entre ellos. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por otros investigadores cuando efectuaron comparaciones entre los mismos métodos usando microorganismos sin ser sometidos a condiciones de estrés, tal como se realizó en nuestro estudio (Goto *et al.*, 2007; Reichert-Schwillinsky *et al.*, 2009).

La elevada correlación entre el número de bacterias inoculadas y el recuento estimado por RTi-PCR de los microorganismos recuperados de los textiles, coincide con las investigaciones de Teufel *et al.* (2008) y Teufel *et al.* (2009), donde se contaminaron textiles artificialmente y se determinaron los recuentos microbiológicos por RTi-PCR. Sin embargo, en nuestro estudio se obtuvo un límite de detección de $2,13 \log_{10} \text{ UFC cm}^{-2}$ con RTi-PCR, mejor que el obtenido por Teufel *et al.* (2008), que fue de $3,70 \log_{10} \text{ UFC cm}^{-2}$. Una principal ventaja del uso de la RTi-PCR en textiles es que puede evaluar comunidades microbianas que son difíciles de cultivar.

En este estudio, la relación lineal observada en el rango de $4,12$ a $7,12 \log_{10} \text{ UFC cm}^{-2}$, entre los microorganismos inoculados y los detectados por DEM en los textiles, es la misma descrita por Fuster-Valls *et al.* (2008). En su estudio ellos compararon el método de cultivo convencional frente a DEM y realizaron el recuento de microorganismos recientemente inoculados (desde 4 a $7 \log_{10} \text{ UFC cm}^{-2}$) en soportes de acero inoxidable. Peeters *et al.* (2008) describieron una relación lineal entre $5,00$ y $7,48 \log_{10} \text{ UFC pocillo}^{-1}$ después de contaminar artificialmente placas de microtitulación con bacterias gram negativas y dos cepas de *S. aureus*.

Generalmente, cuando el recuento proviene de microorganismos en estado de estrés, los estudios muestran un mayor recuento del número de microorganismos por DEM y RTi-PCR frente al método de cultivo. Esto debido a que los resultados de los dos primeros métodos mayormente corresponden a la suma de células bacterianas cultivables, no cultivables y muertas (Rinsoz *et al.*, 2008). Así, Chen y Li (2005) indicaron que el recuento obtenido por PCR se encuentra altamente asociado con el obtenido por DEM. No obstante, en nuestro estudio los recuentos obtenidos por DEM fueron significativamente menores ($P < 0,05$) que los obtenidos por RTi-PCR y cultivo (**Figura 7**). Esto debido, posiblemente, a que muchas

células bacterianas sobre la superficie del textil no fueron detectadas por DEM, ya que la estructura tridimensional de los textiles no se puede enfocar completamente debido a que la microscopía de epifluorescencia directa presenta una limitada profundidad de campo, lo que produce un resplandor que degrada la imagen y, por consiguiente, las bacterias en otros planos no son detectadas (**Figura 8**) (White *et al.*, 1987). Es importante mencionar que otra dificultad que se presentó al evaluar los textiles por DEM fue que el propio textil también emitía fluorescencia lo que provocaba una disminución en el contraste entre el fondo (*background*) y los microorganismos.

Para obtener imágenes por DEM con menos interferencia por las estructuras desenfocadas, Fujioka *et al.* (2006) desarrollaron un dispositivo con un sistema automático de detección en el eje Z y un programa de edición asociado, así observaron claramente las células microbianas distribuidas sobre una superficie rugosa de textil. En otro estudio, Peighambardoust *et al.* (2010) desarrollaron un sistema de captura de imágenes en diferentes planos focales del eje Z y obtuvieron una pila de imágenes que se procesaron para obtener una sola imagen con todas las estructuras enfocadas.

Aunque nuestros resultados por DEM lograron detectar la presencia de los microorganismos en los textiles, como indican otros investigadores (Teufel y Redl, 2006; Sivakumar *et al.*, 2010), el recuento de estos resultó en un proceso muy laborioso. Para superar este inconveniente es imprescindible incorporar una base motorizada en el sistema de microscopía que permita analizar más campos a mayor velocidad y que facilite la detección en el eje Z. Sin embargo, se debe destacar que una de las principales ventajas de la DEM es la posibilidad de observar a los microorganismos en interacción con el sustrato y la forma en que se encuentran distribuidos y/o agrupados.

En general, nuestros resultados evidenciaron que los tres métodos determinaron recuentos relativamente consistentes del número de microorganismos inoculados. Sin embargo, el método que mostró mejor sensibilidad fue el cultivo, seguido por la RTi-PCR. Mientras que, la DEM resultó ser la técnica con menos sensibilidad y más laboriosa para el recuento microbiológico en textiles. En conclusión, entre las técnicas rápidas, la RTi-PCR fue la técnica más eficaz para el recuento de *S. aureus* en textiles de algodón. La metodología propuesta

para analizar por RTi-PCR, podría ser una alternativa para la detección de comunidades microbianas que son difíciles de cultivar.

V. Efecto desinfectante del lavado estándar sobre *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* en superficies textiles

1. Material y Métodos

1.1. Superficies de prueba

Se utilizaron textiles de prueba de 100% algodón, 100% poliamida y 100% poliéster en color blanco. Previo a su uso, los textiles se sometieron al tratamiento para eliminar posibles sustancias inhibidoras (Capítulo IV sección 1.1.). Posteriormente se cortaron (área 10 cm²) y se esterilizaron (121 °C durante 15 min). Para la carga del lavado se usaron telas 100% algodón, que previo a su uso se sometieron al mismo tratamiento anterior. Las telas de carga se esterilizaban y secaban antes de cada experimento.

1.2. Cepa microbiana y preparación del inóculo

Se utilizaron las cepas de referencia de *S. aureus* ATCC 6538 (para determinar el efecto antibacteriano del lavado) y *C. albicans* ATCC 10231 (para determinar el efecto antifúngico del lavado), pertenecientes a la ATCC. Las cepas liofilizadas se rehidrataron en BPW a 37 °C (*S. aureus*) y 30 °C (*C. albicans*) durante 18 – 24 h, posteriormente se subcultivaron en TSA e incubaron a 37 °C durante 24 h (*S. aureus*) y en Agar Extracto de Malta (MEA, *Malt Extract Agar*; Biokar Diagnostics) e incubaron a 30 °C durante 48 h (*C. albicans*). Se usaron colonias aisladas para preparar cultivos stock en tubos inclinados de TSA y MEA. Estos se almacenaron un máximo de un mes a 4 °C (Anónimo, 2002).

Se prepararon los inóculos microbianos a partir del cultivo en tubo inclinado, subcultivando en las condiciones óptimas de crecimiento de cada microorganismo mencionadas anteriormente. Para cada microorganismo, a partir del segundo subcultivo en agar se preparó una suspensión microbiana en 9 ml de TSS con el fin de obtener una concentración aproximada entre 8 – 9 log₁₀ CFU ml⁻¹ para inocular los textiles de prueba.

1.3. Inoculación de los textiles de prueba

Los textiles de prueba se colocaron en placas petri e inocularon con 350 µl de suspensión microbiana. Estos textiles se secaron a temperatura ambiente durante 16 – 18 h en una campana de flujo laminar (Bio-II-A; Telstar, Terrasa, España) cerrada y apagada, previamente irradiada con luz UV. Las tapas de las placas petri se dejaron ligeramente abiertas, para favorecer el secado del inóculo. Una vez que el inóculo se secó sobre los textiles, se determinó la concentración final de los microorganismos como se describe más

adelante en evaluación de la carga microbiana en textiles (Capítulo V sección 1.6.). Posteriormente, dos textiles inoculados y dos sin inocular de cada tipo, se sujetaron a la tela de carga del lavado y se colocaron dentro de una misma máquina de lavado bajo condiciones de lavado específicas.

1.4. Procedimiento de lavado

El proceso de lavado se realizó en la lavadora doméstica Fagor A⁺A – F2010 (Fagor Electrodomésticos, S. Coop., España) con capacidad de carga de 8 kg y con diferentes programas de temperatura. Para la carga de lavado se usaron 3,5 kg de telas de algodón, siendo las mismas durante todos los experimentos. El ciclo de lavado consistió de un lavado principal (promedio: 23 min y 9 L de agua), seguido de tres enjuagues (promedio: 26 min y 22 L de agua). Antes y después de cada proceso de lavado, la lavadora se desinfectó usando un ciclo de lavado con programa antibacteriano: 90 °C de agua de lavado principal con 80 ml de hipoclorito de sodio agregado durante el segundo enjuague. Con el fin de verificar la desinfección, se analizó 100 ml de agua del último enjuague por la técnica de filtración de membrana (TFM), como se describe posteriormente (Capítulo V sección 1.7.). Los programas de lavado se realizaron usando agua potable, previamente esterilizada a 121 °C durante 15 min, excepto para el programa antibacteriano.

1.5. Agentes desinfectantes

Como agentes desinfectantes se utilizaron agentes comerciales de lavado: dos detergentes, uno en polvo (PW) y otro líquido (LQ), y tres agentes blanqueadores basados en: hipoclorito de sodio (SH), percarbonato de sodio (SP) y peróxido de hidrógeno (HP). Las dosis se calcularon siguiendo las recomendaciones del fabricante para una carga media de lavado y agua dura. Las características y cantidades de los agentes desinfectante usados se muestran en la **Tabla 9**. Los detergentes y los agentes blanqueadores se colocaron en el dispositivo de dosificación de la lavadora, antes del ciclo de lavado principal, excepto para SH, que fue agregado durante el segundo enjuague de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Se evaluaron ocho combinaciones de detergentes y agentes blanqueadores: PW, PW-SH, PW-SP, PW-HP, LQ, LQ-SH, LQ-SP y LQ-HP, a tres temperaturas: ambiente, 30 °C y 40 °C.

1.6. Evaluación de la carga microbiana en textiles

Con el fin de detectar las células viables en los textiles, antes y después del proceso de lavado, los textiles contaminados y sin contaminar se colocaron en frascos con 10 ml de TSB conteniendo 1 g por litro de Tween 80 y 3 g de perlas de vidrio (diámetro 2 mm). Para la extracción de los microorganismos, los frascos se agitaron siguiendo el procedimiento mencionado en el Capítulo IV sección 1.4. Seguidamente, a partir de la suspensión obtenida se realizaron diluciones decimales en TSS y, a partir de las diluciones adecuadas, se sembró por duplicado 1 ml en medio TSAYE para *S. aureus* y en MEA para *C. albicans* incubados a 37 °C y 30 °C, respectivamente, ambos durante 48 h. Se realizó el recuento en las placas que presentaron entre 30 y 300 UFC. Los datos se expresaron como UFC por centímetro cuadrado.

Tabla 9. Descripción de agentes de lavado comerciales usados como agentes desinfectantes.

| Agente desinfectante | Composición | Componentes | Dosis |
|----------------------|-------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
| PW* | 5 – 15 % | Tensioactivos aniónicos | 16 g kg ⁻¹ textiles |
| | 5 – 15 % | Blanqueadores basados en oxígeno | |
| | < 5 % | Tensioactivos no iónicos | |
| | < 5 % | Fosfonatos | |
| | < 5 % | Policarboxilatos Enzimas | |
| LQ* | 5 – 15 % | Tensioactivos aniónicos y no iónicos | 14 ml kg ⁻¹ textiles |
| | < 5 % | Fosfonatos | |
| | | Enzimas | |
| SH† | < 5 % | Hipoclorito de sodio | 1,4 g kg ⁻¹ textiles |
| SP† | > 30 % | Percarbonato de sodio | 10,4 g kg ⁻¹ textiles |
| HP† | 5 – 15 % | Peróxido de hidrógeno | 28,6 ml kg ⁻¹ textiles |

*Detergentes: polvo (PW) y líquido (LQ).

†Blanqueadores basados en: hipoclorito de sodio (SH), percarbonato de sodio (SP) y peróxido de hidrógeno (HP).

1.7. Evaluación de la carga microbiana en las aguas residuales de lavado

Para detectar los microorganismos viables transferidos de los textiles contaminados a las aguas residuales, se recolectó por separado, el volumen total del agua residual del lavado principal y del enjuague, en garrafas de boca ancha estériles de 10 y 20 L, respectivamente. Posteriormente, las garrafas se homogenizaron con movimientos rotatorios e

inmediatamente se tomó una muestra de 500 ml para el análisis microbiológico. De acuerdo a la carga microbiana del agua residual, se usó la TFM o el método de recuento en placa estándar (RPE). En TFM, se filtró el agua a través de un filtro de membrana (Millipore Corporation, Billerica, MA, EE.UU.) de 0,45 μm de tamaño de poro (diámetro 47 mm). Seguidamente, con el fin de eliminar el detergente residual, se pasó por el filtro 50 ml de solución salina estéril. Los filtros se transfirieron asépticamente a placas de TSAYE o MEA, según el microorganismo. En el método RPE, se sembraron por duplicado alícuotas de 1 ml de las diluciones apropiadas en TSAYE o MEA. Después de la incubación se contaron las placas que contenían entre 30 y 300 colonias y los datos se expresaron en UFC por mililitro.

1.8. Análisis estadístico

Cada experimento se repitió tres veces en distintos días y los análisis se realizaron por duplicado. Los recuentos microbiológicos se transformaron en unidades logarítmicas [$\log_{10}(x + 1)$]. El valor de uno fue agregado al recuento para usar el valor cero en el análisis. Con el fin de evaluar el efecto de desinfección de los procesos de lavado, se determinaron los siguientes parámetros: (1) la reducción de microorganismos en los textiles contaminados, (2) la transferencia de microorganismos de textiles contaminados a textiles estériles y (3) la transferencia de microorganismos de textiles contaminados a las aguas residuales de lavado y enjuague.

Se calculó la eficiencia de reducción (RED) después del lavado, de acuerdo a la ecuación (Fijan *et al.*, 2007):

$$\text{RED} = \log_{10} \left(\frac{\overline{\text{UFC}}_b}{\overline{\text{UFC}}_a} \right)$$

Donde:

RED Eficiencia de reducción después del lavado

$\overline{\text{UFC}}_a$ Promedio de UFC en textiles contaminados después del lavado

$\overline{\text{UFC}}_b$ Promedio de UFC en textiles contaminados antes del lavado

La eficiencia bactericida y fungicida de los agentes desinfectantes se estableció cuando se consiguieron 5 y 4 reducciones logarítmicas, respectivamente (Fijan *et al.*, 2005; Fijan *et al.*, 2007).

El efecto de los tratamientos se evaluó con un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple Student-Newman-Keuls (SNK) ($\alpha = 0,05$). Los análisis se realizaron con el programa SAS para Windows versión 9.1 (SAS Institute, Inc., Cary, EE.UU.).

2. Resultados

2.1. Carga microbiana en los textiles antes del lavado

Después de secar los textiles inoculados durante una noche, la concentración de células viables de *S. aureus* y *C. albicans* fue de 7,65 y 6,41 \log_{10} UFC cm^{-2} , respectivamente. Para *S. aureus*, la supervivencia durante el secado fue independiente del tipo de textil, mientras que para *C. albicans* esto no ocurrió. Para *S. aureus* se observó una reducción de aproximadamente 1,29 \log_{10} ($P > 0,05$) en todos los tipos de textiles. Sin embargo, para *C. albicans* la reducción en los textiles de poliéster (1,39 \log_{10}) fue significativamente menor ($P < 0,05$) que en los textiles de algodón y poliamida (1,69 – 1,61 \log_{10}).

2.2. Reducción microbiana en los textiles contaminados después del lavado

La **Figura 9** muestra la eficiencia de reducción de *S. aureus* en los textiles de algodón, poliamida y poliéster después de lavados con diferentes agentes desinfectantes a temperatura ambiente, 30 °C y 40 °C.

Para *S. aureus* (**Figura 9**), en general, los agentes desinfectantes base PW obtuvieron RED significativamente mayores ($P < 0,05$) que sus respectivas combinaciones en base LQ (PW, PW-SP, PW-HP vs. LQ, LQ-SP, LQ-HP, respectivamente). Excepto para PW-SH vs. LQ-SH, que no mostraron diferencias significativas ($P > 0,05$) en la reducción bacteriana. Además, ambos detergentes, PW y LQ, combinados con los agentes blanqueadores SH y SP lograron mayores reducciones significativas ($P < 0,05$) que sus correspondientes detergentes sin agente blanqueador.

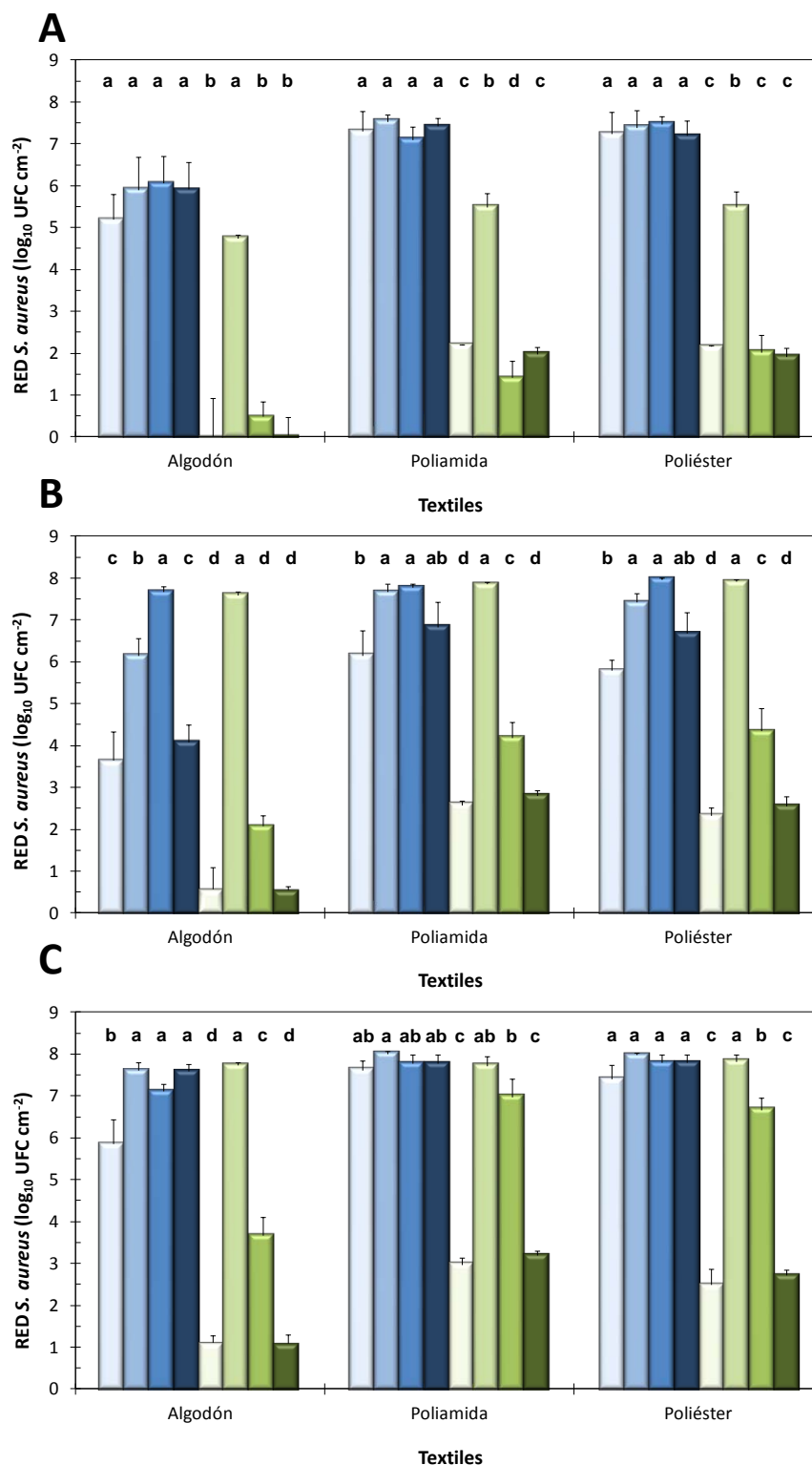


Figura 9. Reducción de *S. aureus* sobre superficies textiles después del lavado con diferentes agentes de desinfección a (A) temperatura ambiente, (B) 30 °C y (C) 40 °C. ■ PW, detergente en polvo; ■ PW-SH, detergente en polvo con hipoclorito de sodio; ■ PW-SP, detergente en polvo con percarbonato de sodio; ■ PW-HP, detergente en polvo con peróxido de hidrógeno; ■ LQ, detergente líquido; ■ LQ-SH, detergente líquido con hipoclorito de sodio; ■ LQ-SP, detergente líquido con percarbonato de sodio; y ■ LQ-HP, detergente líquido con hipoclorito de sodio. Los datos son presentados como promedios de RED \pm error estándar ($n = 6$). Los promedios dentro del mismo tipo de textil con letras diferentes presentan diferencias significativas entre ellos ($P < 0,05$).

Entre las diferentes combinaciones de agentes desinfectantes, cabe destacar que LQ-SH consiguió una reducción de 5 unidades logarítmicas más respecto a LQ, en todos los textiles y temperaturas. Por otro lado, el efecto del incremento en la temperatura de lavado se observó principalmente cuando PW y LQ se combinaron con el agente blanqueador SP, donde la reducción bacteriana se incrementó significativamente ($P < 0,05$) a 30 °C y 40 °C respecto a la temperatura ambiente en todos los tipos de textiles (**Figura 9**).

En general, la RED de *S. aureus* en los textiles de algodón fue significativamente menor ($P < 0,05$) que en los textiles de poliamida y poliéster a temperatura ambiente y 30 °C con todos los agentes desinfectantes, excepto a 40 °C donde no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los textiles cuando el PW se combinó con todos los agentes blanqueadores (**Figura 9**).

Nuestros resultados indican que el nivel bactericida (RED = 5 log) se consiguió con la mayoría de los agentes desinfectantes base PW, en todos los tipos de textiles y temperaturas de lavado, con algunas excepciones. Por el contrario, el nivel bactericida con los desinfectantes base LQ, sólo se consiguió con LQ-SH en todos los tipos de textiles y temperaturas; además, con LQ-SP en poliamida y poliéster lavados a 40 °C (**Figura 9**).

La **Figura 10** muestra la eficiencia de reducción de *C. albicans* en los textiles de algodón, poliamida y poliéster después de lavados con diferentes agentes desinfectantes a temperatura ambiente, 30 °C y 40 °C.

Para *C. albicans* (**Figura 10**), en general, los agentes desinfectantes base PW lograron RED significativamente mayores ($P < 0,05$) que sus respectivas combinaciones en base LQ a temperatura ambiente y 40 °C. Sin embargo, a 30 °C no se apreciaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las reducciones de los agentes desinfectantes base PW y LQ. De la misma manera a lo observado para *S. aureus*, cuando ambos detergentes se combinaron con SH (PW-SH vs. LQ-SH), la RED conseguida no mostró diferencias significativas ($P > 0,05$) entre ellos, para todos los tipos de textiles y temperaturas. Por otro lado, cuando los detergentes se combinaron con SP, PW-SP presentó una RED significativamente superior ($P < 0,05$) a LQ-SP, principalmente a temperatura ambiente y 40 °C para todos los tipos de textiles. Asimismo, cuando los detergentes se combinaron con HP, la RED de PW-HP fue

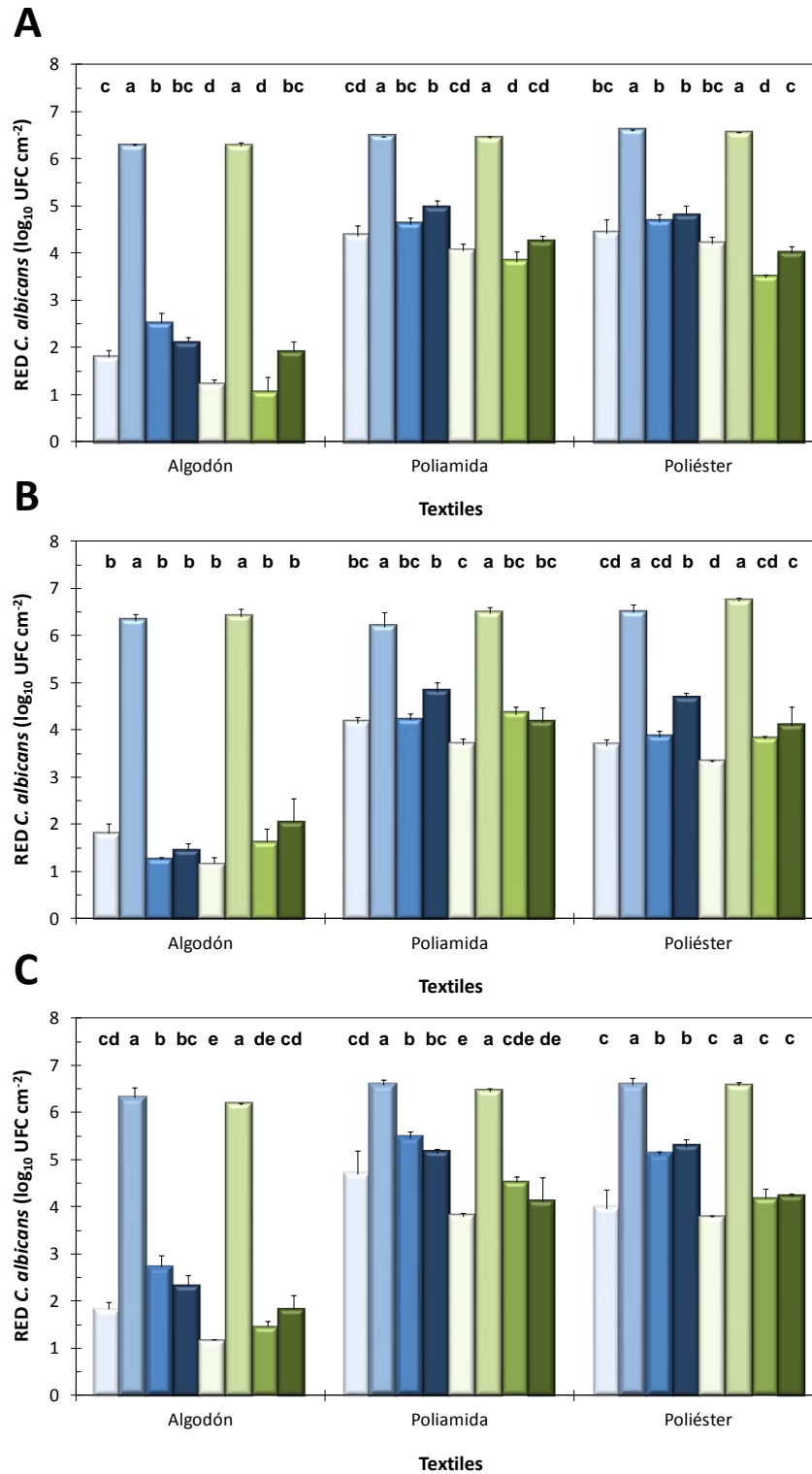


Figura 10. Reducción de *C. albicans* sobre superficies textiles después del lavado con diferentes agentes de desinfección a (A) temperatura ambiente, (B) 30 °C y (C) 40 °C. ■ PW; ■ PW-SH; ■ PW-SP; ■ PW-HP; ■ LQ; ■ LQ-SH; ■ LQ-S; y ■ LQ-HP. Los datos son presentados como promedios de RED \pm error estándar (n = 6). Los promedios dentro del mismo tipo de textil con letras diferentes presentan diferencias significativas entre ellos (P < 0,05).

significativamente mayor ($P < 0,05$) que LQ-HP, para los textiles de poliamida y poliéster a todas las temperaturas.

El efecto de la temperatura de lavado se observó principalmente cuando PW se combinó con el agente blanqueador SP, donde con el incremento de la temperatura a 40 °C se consiguió un aumento significativo ($P < 0,05$) de la reducción fúngica en todos los textiles.

Al igual que para *S. aureus*, la RED de *C. albicans* en los textiles de algodón se observó significativamente menor ($P < 0,05$) que en los textiles de poliamida y poliéster, excepto con los desinfectantes combinados con SH (**Figura 10**).

El nivel fungicida (RED = 4 log) se consiguió con la mayoría de agentes desinfectantes base PW y base LQ, pero sólo para los textiles de poliamida y poliéster a todas las temperaturas. Los detergentes combinados con SH fueron los únicos que consiguieron el nivel fungicida en los textiles de algodón a todas las temperaturas.

2.3. Transferencia de microorganismos a los textiles estériles

La **Figura 11** muestra la transferencia de *S. aureus* a textiles estériles de algodón, poliamida y poliéster después del lavado con diferentes agentes desinfectantes a temperatura ambiente, 30 °C y 40 °C.

Para *S. aureus* (**Figura 11**), con los agentes desinfectantes base PW se observó una transferencia significativamente menor ($P < 0,05$) a los textiles estériles ($\leq 1 \log_{10}$ UFC cm⁻²) que sus respectivas combinaciones en los desinfectantes base LQ, para todos los textiles y temperaturas. La transferencia bacteriana se observó escasa o nula con los agentes desinfectantes PW-SH y LQ-SH ($\leq 0,15 \log_{10}$ UFC cm⁻²), para todos los tipos de textiles y temperaturas. Por el contrario, la transferencia bacteriana más elevada se observó con los agentes desinfectantes LQ, LQ-SP y LQ-HP ($\geq 2,02 \log_{10}$ UFC cm⁻²) para todos los tipos de textiles, especialmente a temperatura ambiente y 30 °C.

El efecto de la temperatura se observó con el agente desinfectante LQ-SP, donde con el aumento de la temperatura a 40 °C se consiguió una reducción significativa ($P < 0,05$) en la transferencia bacteriana para todos los textiles (**Figura 11**).

Entre los diferentes tipos de textiles, la transferencia bacteriana no mostró diferencias

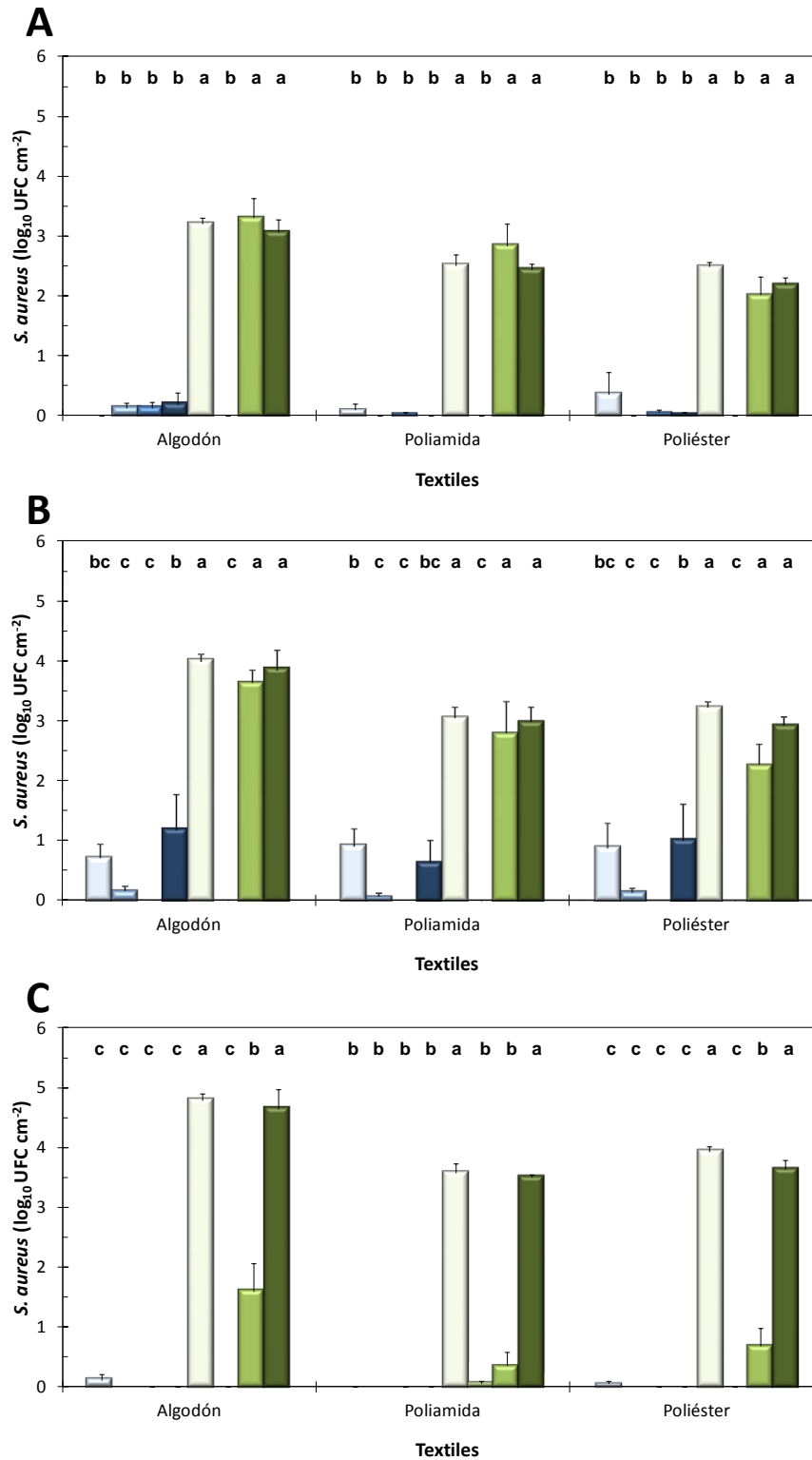


Figura 11. Transferencia de *S. aureus* a superficies textiles estériles después del lavado con diferentes agentes de desinfección a (A) temperatura ambiente, (B) 30 °C y (C) 40 °C. ■ PW; ■ PW-SH; ■ PW-SP; ■ PW-HP; ■ LQ; ■ LQ-SH; ■ LQ-SP; y ■ LQ-HP. Los datos son presentados como promedios ± error estándar (n = 6). Los promedios dentro del mismo tipo de textil con letras diferentes presentan diferencias significativas entre ellos (P < 0,05).

significativas ($P > 0,05$) con los agentes desinfectantes base PW a todas la temperaturas. Sin embargo, la transferencia bacteriana a los textiles de algodón fue mayor respecto a poliamida y poliéster, con los agentes desinfectantes base LQ a todas las temperaturas; excepto con LQ-SH, donde la transferencia bacteriana fue escasa hacia los diferentes tipos de textiles.

La **Figura 12** muestra la transferencia de *C. albicans* a textiles estériles de algodón, poliamida y poliéster después del lavado con diferentes agentes desinfectantes a temperatura ambiente, 30 °C y 40 °C.

Para *C. albicans* (**Figura 12**), la transferencia fúngica a la mayoría de los textiles con los agentes desinfectantes base PW no mostró diferencia significativa ($P > 0,05$) con sus respectivas combinaciones en base LQ a todas las temperaturas. Sin embargo, cuando se observaron diferencias entre ellos, la transferencia con base PW fue significativamente inferior ($P < 0,05$) que con base LQ. Al igual que para *S. aureus*, la transferencia fúngica se observó escasa o nula con los agentes desinfectantes PW-SH y LQ-SH ($\leq 0,08 \log_{10} \text{ UFC cm}^{-2}$), para todos los tipos de textiles y temperaturas. Por el contrario, la transferencia fúngica más elevada se observó con los agentes desinfectantes LQ-SP y LQ-HP para todos los tipos de textiles, especialmente a temperatura ambiente ($\geq 1,76 \log_{10} \text{ UFC cm}^{-2}$) (**Figura 12**).

El efecto de la temperatura se observó con los detergentes PW y LQ combinados con SP y HP, donde con el incremento de la temperatura a 40 °C se consiguió una reducción en la transferencia fúngica en todos los textiles.

Entre los diferentes tipos de textiles, la transferencia de *C. albicans* fue significativamente mayor ($P < 0,05$) hacia los textiles de algodón con los detergentes PW y LQ combinados con SP y HP a todas las temperaturas- Además, con LQ se observó el mismo comportamiento anterior, pero únicamente a 30 °C y 40 °C. Con el resto de los agentes desinfectantes, la transferencia no mostró diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los tres tipos de textiles.

2.4. Transferencia de microorganismos a las aguas residuales

La **Tabla 10** muestra la transferencia de *S. aureus* y *C. albicans* a las aguas residuales después del lavado con diferentes agentes desinfectantes a tres temperaturas.

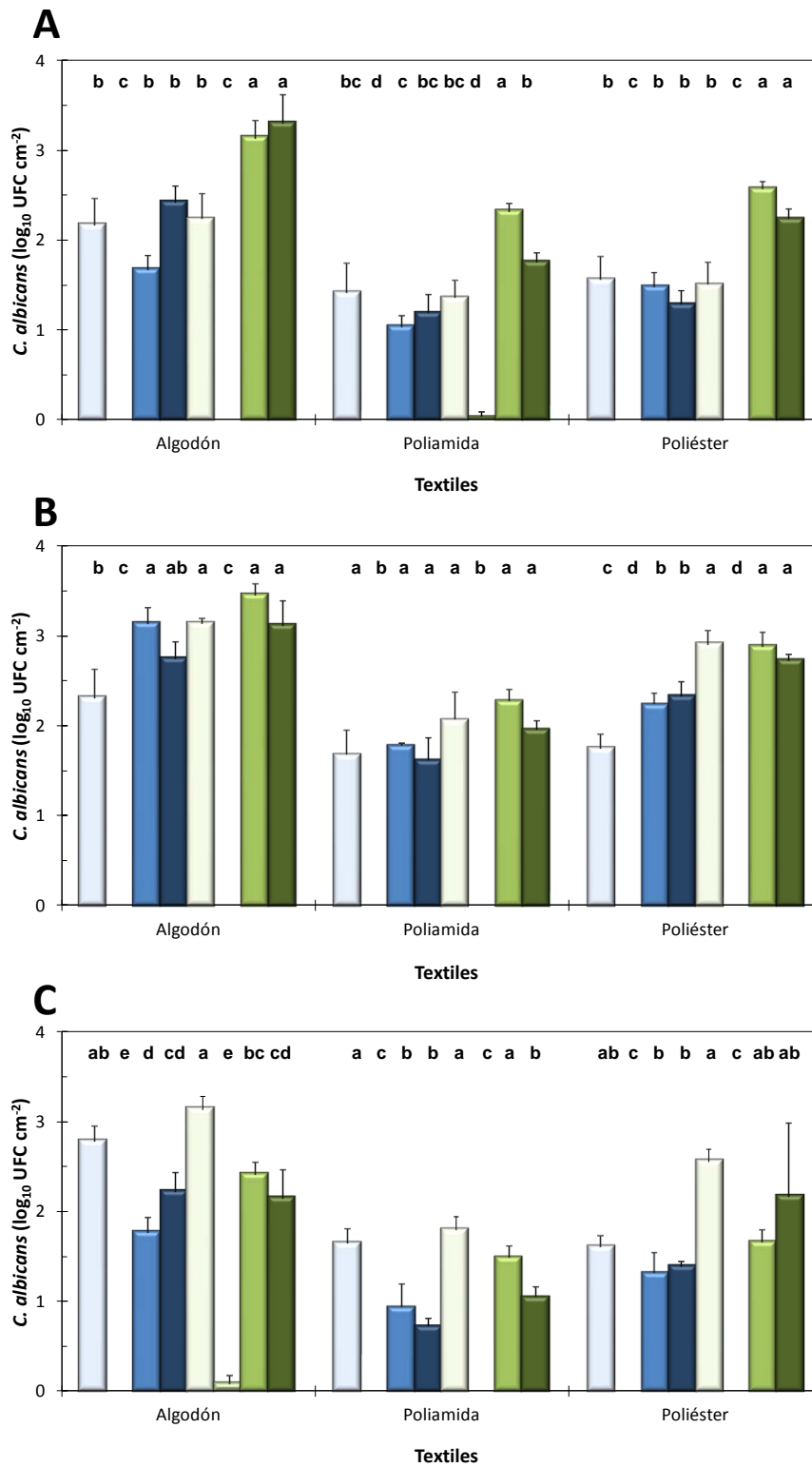


Figura 12. Transferencia de *C. albicans* a superficies textiles estériles después del lavado con diferentes agentes de desinfección a (A) temperatura ambiente, (B) 30 °C y (C) 40 °C. ■ PW; ■ PW-SH; ■ PW-SP; ■ PW-HP; ■ LQ; ■ LQ-SH; ■ LQ-SP; ■ LQ-HP. Los datos son presentados como promedios \pm error estándar ($n = 6$). Los promedios dentro del mismo tipo de textil con letras diferentes presentan diferencias significativas entre ellos ($P < 0,05$).

Tabla 10. Transferencia de *S. aureus* y *C. albicans* a las aguas residuales después del lavado con diferentes agentes desinfectantes a tres temperaturas. Agentes desinfectantes: PW, PW-SH, PW-SP, PW-HP, LQ, LQ-SH, LQ-SP y LQ-HP.

| Microorganismo | Agente desinfectante | Agua residual y temperatura de lavado* | | | | | |
|------------------------------|----------------------|--|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| | | Lavado principal | | | Fase de enjuague | | |
| | | Temperatura ambiente | 30 °C | 40 °C | Temperatura ambiente | 30 °C | 40 °C |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | PW | N.D. ^{†b A} | 1,55 ^{bcA} | 0,79 ^{b A} | N.D. ^{c A} | 0,14 ^{d A} | N.D. ^{c A} |
| | PW – SH | 1,18 ^{b A} | 0,33 ^{c A} | 1,81 ^{b A} | 0,30 ^{c A} | 0,03 ^{d A} | 0,27 ^{c A} |
| | PW – SP | 0,51 ^{b A} | 0,05 ^{c A} | N.D. ^{b A} | 0,12 ^{c A} | N.D. ^{d A} | N.D. ^{c A} |
| | PW – HP | 0,77 ^{b A} | 0,89 ^{bcA} | N.D. ^{b A} | N.D. ^{c A} | 0,34 ^{d A} | N.D. ^{c A} |
| | LQ | 4,70 ^{a A} | 4,35 ^{a A} | 4,00 ^{a A} | 4,37 ^{a A} | 4,19 ^{a A} | 4,00 ^{a A} |
| | LQ – SH | 4,65 ^{a A} | 4,17 ^{a A} | 3,68 ^{a A} | N.D. ^{c A} | N.D. ^{d A} | N.D. ^{c A} |
| | LQ – SP | 4,40 ^{a A} | 2,97 ^{abB} | 1,54 ^{b B} | 4,20 ^{abA} | 2,33 ^{c B} | 0,46 ^{c C} |
| | LQ – HP | 4,27 ^{a A} | 3,74 ^{abA} | 4,00 ^{a A} | 3,95 ^{b A} | 3,22 ^{b A} | 2,30 ^{b B} |
| <i>Candida albicans</i> | PW | 3,24 ^{abA} | 3,61 ^{a A} | 2,92 ^{a A} | 1,45 ^{d A} | 2,92 ^{b A} | 2,21 ^{a A} |
| | PW – SH | 3,40 ^{abA} | 3,52 ^{a A} | 2,91 ^{a A} | N.D. ^{e A} | N.D. ^{c A} | N.D. ^{b A} |
| | PW – SP | 3,01 ^{b A} | 3,93 ^{a A} | 3,02 ^{a A} | 2,12 ^{c A} | 3,29 ^{abA} | 2,26 ^{a A} |
| | PW – HP | 3,46 ^{abA} | 4,03 ^{a A} | 3,59 ^{a A} | 2,79 ^{b A} | 3,34 ^{abA} | 2,71 ^{a A} |
| | LQ | 3,43 ^{abA} | 4,14 ^{a A} | 2,68 ^{a A} | 3,72 ^{a A} | 3,98 ^{a A} | 3,37 ^{a A} |
| | LQ – SH | 3,46 ^{abA} | 3,72 ^{a A} | 2,95 ^{a A} | N.D. ^{e A} | N.D. ^{c A} | N.D. ^{b A} |
| | LQ – SP | 3,90 ^{abA} | 3,43 ^{a AB} | 3,08 ^{a B} | 3,37 ^{abA} | 3,34 ^{abA} | 2,41 ^{a B} |
| | LQ – HP | 4,06 ^{a A} | 4,08 ^{a A} | 3,43 ^{a B} | 3,64 ^{a A} | 4,03 ^{a A} | 2,49 ^{a B} |

* Los datos representan el promedio de los recuentos microbiológicos (\log_{10} UFC ml^{-1}).

† N.D. no detectable (debajo de $0,02 \log_{10}$ UFC ml^{-1} por TFM y debajo $0,18 \log_{10}$ UFC ml^{-1} por RPE).

^{a-c} Dentro de una columna, los valores con distintas letras minúsculas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre agentes desinfectantes por microorganismo.

^{A-C} Dentro de una fila, los valores con distintas letras mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre temperaturas por microorganismo.

En general, la transferencia de *S. aureus*, tanto al agua del lavado principal como de enjuague, fue significativamente inferior ($P < 0,05$) con los agentes desinfectantes base PW respecto a los base LQ, especialmente a temperatura ambiente. Asimismo, entre los agentes desinfectantes base PW no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en la transferencia de *S. aureus* hacia las aguas residuales, tanto de lavado principal como de enjuague. No obstante, entre los agentes desinfectantes base LQ si se apreciaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en la transferencia al combinarse con algunos agentes blanqueadores (Tabla 10).

En el agua de lavado, generalmente se observó una menor transferencia de *S. aureus* con todos los agentes desinfectantes base PW a todas las temperaturas ($\leq 1,81 \log_{10}$ UFC ml^{-1}). Por el contrario, la transferencia más elevada al agua de lavado se detectó con LQ, LQ-SH y

LQ-HP a todas las temperaturas ($\geq 3,68 \log_{10}$ UFC ml⁻¹). Mientras en el agua de enjuague la transferencia bacteriana se observó escasa o nula ($\leq 0,34 \log_{10}$ UFC ml⁻¹) con los agentes desinfectantes base PW y con LQ-SH a todas las temperaturas. En contraste, la transferencia más alta al agua de enjuague se observó con LQ a todas las temperaturas ($\geq 4,00 \log_{10}$ UFC ml⁻¹) (**Tabla 10**).

El efecto de la temperatura se apreció especialmente con LQ-SP, donde se observó una disminución significativa ($P < 0,05$) de la transferencia bacteriana, tanto al agua de lavado principal como al agua de enjuague, con el incremento de la temperatura a partir de 30 °C (**Tabla 10**).

La transferencia de *C. albicans* al lavado principal con los agentes desinfectantes base PW no mostraron diferencias significativas ($P > 0,05$) con sus respectivas combinaciones en base LQ. Sin embargo, en las aguas de enjuague se observó que la transferencia con los desinfectantes base PW fue significativamente inferior ($P < 0,05$) que con los base LQ a temperatura ambiente, excepto con los agentes desinfectantes PW-SH y LQ-SH (**Tabla 10**).

En las aguas de lavado, a diferencia de *S. aureus*, la transferencia de *C. albicans* a todas las temperaturas fue $\geq 2,68 \log_{10}$ UFC ml⁻¹ con todos los agentes desinfectantes. Mientras que, en las aguas de enjuague, la transferencia fúngica se observó nula con los agentes desinfectantes PW-SH y LQ-SH a todas las temperaturas. Por el contrario, las transferencias más altas ($\geq 2,41 \log_{10}$ UFC ml⁻¹) se observaron en la mayoría de los agentes desinfectantes base LQ a todas las temperaturas (**Tabla 10**).

El efecto de la temperatura se observó con LQ-SP y LQ-HP, donde la transferencia de *C. albicans* a las aguas de lavado y de enjuague disminuyó significativamente ($P < 0,05$) con el incremento de la temperatura, especialmente a 40 °C (**Tabla 10**).

3. Discusión

Los textiles pueden estar contaminados con suciedad que podrían perjudicar el rendimiento de los productos de limpieza, aun bajo condiciones normales (Heinzel *et al.*, 2010). Si los textiles siguen contaminados después del lavado, los microorganismos pueden ser transmitidos a otras personas a través del contacto directo (prenda > mano > boca) o por vías indirectas (prenda > mano > alimento > boca) (Gerba y Kennedy, 2007). Por lo anterior,

se debe asegurar la desinfección adecuada de los textiles para prevenir la transmisión de microorganismos patógenos, especialmente en sectores en donde es necesario el control de la biocontaminación (Anónimo, 2003).

En este estudio se evaluó el efecto de la desinfección de diferentes agentes desinfectantes a tres temperaturas de lavado, así como la influencia del tipo de textil en el efecto desinfectante de los procesos de lavados. En nuestro trabajo, no usamos compuestos para simular la suciedad sobre los textiles, debido a que en un estudio previo se reveló que estos sustratos no representaron una barrera de protección significativa contra la eficiencia del lavado (Fijan *et al.*, 2007). Se evaluaron tres aspectos: 1) reducción de microorganismos en los textiles contaminados, 2) transferencia de microorganismos de textiles contaminados a textiles estériles y 3) transferencia de microorganismos a las aguas residuales del lavado.

La RED de los microorganismos en los textiles contaminados muestra que *C. albicans* presentó mayor resistencia que *S. aureus* con la mayoría de los agentes desinfectantes (**Figura 9** y **Figura 10**). Nuestros resultados coinciden con lo descrito por Fijan *et al.* (2007), quienes obtuvieron reducciones más bajas de *C. albicans* comparado con *S. aureus* después de lavados a 35 °C y 45 °C.

En general, nuestros resultados de RED para *S. aureus* y *C. albicans* (**Figura 9** y **Figura 10**) muestran que los agentes desinfectantes base PW consiguieron una mayor reducción que sus respectivas combinaciones en base LQ. Una posible explicación puede ser que en la composición de los detergentes líquidos no se incluyen algunos componentes que son inestables en medio acuoso y la ausencia de algunos de ellos en la formulación puede producir una disminución de sus propiedades de lavado (López y CavacoPaulo, 2008). En este sentido, el nivel bactericida se consiguió con mayor frecuencia con los agentes desinfectantes base PW en todos los tipos de textiles y temperaturas. Respecto a nuestras observaciones, la literatura señala ciertos resultados contradictorios en la evaluación de los detergentes. Fijan *et al.* (2007) observó que los lavados con detergente en polvo no alcanzaron el nivel bactericida para *S. aureus* en textiles de algodón a 35 °C. Por el contrario, Patel *et al.* (2006) al evaluar lavados con detergente en polvo para *S. aureus* en textiles de algodón y poliéster a 40 °C, encontraron reducciones hasta niveles indetectables (reducciones $\geq 6 \log_{10}$) consiguiendo de esta manera el nivel bactericida.

En nuestro trabajo, no se consiguió el nivel fungicida en los textiles de algodón con los agentes desinfectantes base PW y LQ a todas las temperaturas, este se consiguió sólo cuando se combinaron con SH. Nuestros resultados coinciden con lo señalado por Fijan *et al.* (2007), quienes al aplicar un lavado con detergente en polvo a 35 °C no consiguieron el nivel fungicida contra *C. albicans* en los textiles de algodón. Por el contrario, Hammer *et al.* (2010) indicaron una reducción completa ($5,67 \log_{10} \text{ UFC cm}^{-2}$) de *C. albicans* en textiles de algodón lavados con un detergente comercial en polvo a 30 °C y 60 °C.

Estas discrepancias entre resultados de los diferentes estudios, podrían explicarse debido al uso de diferentes formulaciones y concentraciones del detergente. En este sentido, Fijan *et al.* (2007) usaron 6,2 gramos de detergente por kilogramo de textil, mientras que Hammer *et al.* (2010) usaron 28,3 gramos por kilogramo de textil, por tanto, estos últimos investigadores obtuvieron reducciones microbianas superiores.

En este trabajo cuando se usó SH como agente blanqueador, se consiguieron los niveles bactericidas y fungicidas para todos los textiles, incluso en lavados a temperatura ambiente (**Figura 9** y **Figura 10**). Nuestros resultados coinciden con Christian *et al.* (1983), que al evaluar el lavado de textiles naturalmente contaminados (47,8 °C – 60 °C) usando cloro como desinfectante, obtuvieron la eliminación completa de bacterias aerobias, estafilococos y coliformes totales. Asimismo, Gerba y Kennedy (2007) obtuvieron una reducción de virus entre el 92% y 99% en textiles lavados con detergente. Sin embargo, con la adición de hipoclorito al detergente consiguieron una reducción adicional del virus en más del 99,99%. SH es un buen agente desinfectante, ya que actúa directamente a través de las reacciones mediadas por radicales para oxidar la materia orgánica. El ácido hipocloroso es el componente activo del hipoclorito de sodio, este reacciona rápidamente con las proteínas, ADN, lípidos, tioles y sulfitos (DeQueiroz y Day, 2008). Por tanto, exhibe un espectro de actividad amplio contra bacterias, levaduras, mohos, algas y protozoarios (Leveau y Bouix, 2002); sin embargo, presenta ciertas desventajas, como su elevada corrosividad, decoloración enérgica de textiles y producción de compuestos orgánicos clorados peligrosos a partir de la reacción con la materia orgánica en el agua residual (Carson *et al.*, 2006; Barbut *et al.*, 2009). Por lo anterior, existe la necesidad de usar formulaciones desinfectantes alternativas. Las formulaciones basadas en peróxido de hidrógeno han demostrado que tienen una compatibilidad mucho mayor de materiales y es menos tóxica para los seres

humanos y el medio ambiente (Barbut *et al.*, 2009). Otro agente blanqueador seguro para el medio ambiente es el percarbonato de sodio que actúa como una fuente anhidra de peróxido de hidrógeno (McKillop y Sanderson, 2000). La potencia/actividad de un blanqueador de peróxigeno está expresado por su contenido de oxígeno activo (OA). Cuanto mayor es el valor de OA, mayor es el potencial blanqueador. El percarbonato de sodio tiene un contenido de OA y velocidad de disolución importante (Carson *et al.*, 2006). Su acción se debe a la producción de peróxido de hidrógeno en medio alcalino (Baldin *et al.*, 2008), que actúa contra los microorganismos debido a la formación de radicales libres que reaccionan con el grupo tiol en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Pottage *et al.*, 2010).

En este estudio, la adición de SP a los detergentes incrementó el efecto bactericida y fungicida de PW, así como el bactericida de LQ, especialmente a la temperatura más alta (40 °C) (**Figura 9**). Esto se debe a que principalmente la temperatura influye en la actividad antimicrobiana del percarbonato de sodio, ya que su reacción es catalizada por calor y declina su efectividad cuando la temperatura de lavado disminuye (Raffellini *et al.*, 2010). Para superar este inconveniente, se agregan algunos activadores como el tetracetileno diamina a las formulaciones que lo contienen (Carson *et al.*, 2006). En nuestro trabajo, a pesar que *S. aureus* y *C. albicans* son microorganismos catalasa positivos y pueden desactivar el peróxido de hidrógeno (Enjalbert *et al.*, 2007; Delbes-Paus *et al.*, 2010), el efecto desinfectante de SP con el incremento de la temperatura se observó especialmente para *S. aureus* (**Figura 9** y **Figura 10**), debido a que *C. albicans* tiene una actividad catalasa más elevada, característica que puede hacerla más resistente contra los blanqueadores base peróxido de hidrógeno (Leveau y Bouix, 2002).

En este estudio, al contrario de lo observado para SP, con el blanqueador HP no se consiguieron RED altas al combinarse con ambos detergentes, PW y LQ (**Figura 9** y **Figura 10**). Esta variación en los resultados con los blanqueadores *peroxygens* puede ser debido a una rápida degradación del peróxido de hidrógeno al entrar en contacto con material orgánico, y por tanto no tiene actividad a largo plazo (Raffellini *et al.*, 2010). Por tanto, los niveles bactericidas y fungicidas alcanzados con PW-HP y LQ-HP fueron similares a los obtenidos con los detergentes sin agentes blanqueadores. Así, el nivel bactericida se alcanzó con PW-HP en la mayoría de textiles y temperaturas; el nivel fungicida se alcanzó con PW-HP y LQ-HP en todas las temperaturas de lavado en los textiles de poliamida y poliéster, excepto

en algodón. Al contrario de lo observado en nuestros resultados, Fijan *et al.* (2007) encontraron que los lavados con detergentes en polvo combinados con peróxido de hidrógeno no fueron capaces de alcanzar el nivel bactericida contra *S. aureus* en algodón a 45 °C. Sin embargo, coinciden con nuestros resultados al no alcanzar el nivel fungicida en los textiles de algodón lavados a 45 °C con este agente desinfectante. En otros estudios se obtienen mejores reducciones en lavados con peróxido de hidrógeno cuando son combinados con ácido peroxiacético y/o ácido acético (Altenbaher *et al.*, 2010; Fijan y Šostar-Turk, 2010).

Durante el lavado, los microorganismos dentro de la lavadora se pueden transferir desde piezas contaminadas hacia las no contaminadas. Básicamente, una prenda que se encuentra fuertemente contaminada puede servir para contaminar la carga entera de una lavadora (Gerba y Kennedy, 2007). Esta transferencia de microorganismos a textiles limpios, así como al agua, depende de varios factores, como el tipo de microorganismo, el detergente, la dosis, la temperatura de lavado, etc., por lo que si el proceso de lavado no elimina completamente los microorganismos, estos pueden quedarse flotando en la lavadora y representar un riesgo de contaminación para otros textiles (Hammer *et al.*, 2010; Heinzl *et al.*, 2010). Hammer *et al.* (2010) observaron que después de lavar piezas contaminadas con $2,27 \times 10^5$ de *Trichophyton rubrum* con detergente a 30 °C, si el dermatofito sobrevivía en las piezas, el agua del último enjuague contenía 400 ± 200 UFC 100 ml^{-1} de *T. rubrum*. Gerba (2001) determinó que después del lavado, microorganismos como *E. coli* son reducidos en un 99%; sin embargo, si se empieza con 1 millón de microorganismos, 10 000 aún quedarían viables. Por tanto, concluyó que esta situación muestra un riesgo potencial de transferencia durante el lavado desde los textiles contaminados a cada textil presente en la máquina. En nuestro estudio, se confirmó que cuando la transferencia de *S. aureus* a las aguas de enjuague fue escasa o nula con los desinfectantes base PW (**Tabla 10**), la transferencia a los textiles estériles se presentó de la misma manera (**Figura 11**). Asimismo, cuando la transferencia de *C. albicans* al agua de enjuague se observó $\geq 1,45 \log_{10}$ UFC ml^{-1} , la transferencia a los textiles estériles también fue similar, tanto con agentes desinfectantes base PW y LQ a temperatura ambiente y 30 °C, excepto los combinados con SH (**Tabla 12 y Figura 12**). Estos resultados para *C. albicans* son contradictorios a los descritos por Hammer *et al.* (2010), quienes consiguieron la eliminación completa de *C. albicans* tanto de las piezas

contaminadas como en las aguas del último enjuague, en lavados con detergente en polvo a 30 °C y 60 °C. En nuestro estudio, a diferencia de ellos, utilizamos una mayor concentración de microorganismos y una menor dosis de detergente, lo que podría explicar nuestras discrepancias. Sin embargo, el comportamiento de nuestros resultados coinciden con Heinzl *et al.* (2010), que trabajaron con textiles de algodón inoculados con *Poliovirus* ($7,98 \log_{10}$ UFC cm^{-2}) y observaron que cuando la desinfección de los textiles contaminados fue insuficiente durante el proceso de lavado ($5,3 \log_{10}$ UFC cm^{-2}), los microorganismos fueron transferidos fácilmente a textiles estériles ($4,0 \log_{10}$ UFC cm^{-2}) y al agua de lavado ($4,5 \log_{10}$ UFC ml^{-1}). En contraste, cuando las partículas virales se eliminaron por completo de las muestras contaminadas, no se observó ninguna transferencia a las muestras estériles ($< 2,5 \log_{10}$ UFC cm^{-2}), ni a las aguas de lavado ($< 3,5 \log_{10}$ UFC ml^{-1}). De igual manera, Gerba y Kennedy (2007) indicaron reducciones bajas ($1,11 - 2,88 \log_{10}$ UFC 58 cm^{-2}) de virus entéricos inoculados en textiles de algodón después del lavado con detergente, que a su vez originó una eficiente transferencia hacia los textiles estériles ($3,18$ y $3,54 \log_{10}$ UFC 58 cm^{-2}).

La presencia de microorganismos en las aguas residuales del lavado representa un peligro de contaminación, no sólo de las otras prendas que se lavan, sino también del usuario. O'Toole *et al.* (2009) inocularon el agua de enjuague con *E. coli* (< 100 UFC 100 ml^{-1}) y demostraron la transferencia de *E. coli* a los textiles estériles ($< 1,23 \log_{10}$ UFC 100 cm^{-2}) después del enjuague y centrifugado, y además la transferencia a las manos del usuario ($-0,9 \log_{10}$ UFC 30 cm^{-2}) después del contacto con el agua contaminada.

En general, los lavados con LQ presentaron un efecto desinfectante pobre, es decir, RED bajas y transferencias altas, tanto en textiles estériles y aguas residuales. Las condiciones de lavado con este detergente hacen los procesos de lavados ineficientes, por lo que representa un riesgo, ya que la lavadora se puede contaminar con grandes cantidades de microorganismos que pueden multiplicarse excesivamente y colonizar la máquina (Fijan *et al.*, 2006). Asimismo, en un estudio comparativo donde se investigó la formación de biofilms en lavadoras se encontró que el 30% de los biofilms aislados contenían patógenos humanos potenciales. Además, se demostró que el uso de la concentración recomendada de un detergente en polvo no era suficiente para remover completamente el biofilm formado en un día por este tipo de microorganismos (Gattlen *et al.*, 2010).

En nuestro trabajo, la transferencia de *S. aureus* y *C. albicans* a los textiles estériles como a las aguas de enjuague, con los detergentes PW y LQ combinados con SH se observó por debajo del límite de detección (**Figura 11, Figura 12 y Tabla 10**). Estos resultados indican que el hipoclorito de sodio, añadido en el segundo enjuague, reduce en gran medida la contaminación cruzada durante el lavado y disminuye la posibilidad de liberar microorganismos al ambiente. Cuando los detergentes se combinaron con SP, principalmente LQ-SP, la transferencia a los textiles estériles y al agua de enjuague disminuyó significativamente con el aumento de la temperatura a 40 °C, para ambos microorganismos. Dejando claro una vez más que el efecto desinfectante con el percarbonato de sodio fue mejor con el aumento de la temperatura (Raffellini *et al.*, 2010). Por el contrario, el uso de detergentes combinados con HP, generalmente no disminuyeron la transferencia microbiana, ni a los textiles estériles, ni a las aguas residuales del lavado, similar a lo observado con la reducción bacteriana.

De igual manera que en nuestro estudio, O'Toole *et al.* (2009) observaron diferencias en la transferencia entre tipos de textiles (toallas de algodón, tejidos de punto de algodón y de poli-algodón), afirmando que no sólo las propiedades de los microorganismos influyen en la transferencia, sino también las propiedades del textil. Además, en su estudio describen diferentes índices de retención para cada microorganismo después de un ciclo de centrifugado, en el siguiente orden decreciente: oocistos de *Cryptosporidium parvum* > *E. coli* > bacteriófago MS-2 > bacteriófago PRD-1. Nuestros resultados muestran que el tipo de textil influyó en el efecto de desinfección del proceso de lavado, siendo la desinfección más efectiva en poliamida y poliéster que en algodón (**Figura 9 y 10**). El proceso de adhesión de las células puede explicar nuestros resultados, ya que las bacterias se adhieren al material de la superficie a través de interacciones fisicoquímicas, que involucra la hidrofobicidad y cargas de la superficie celular, así como también la hidrofobicidad, carga, rugosidad y composición química de la misma superficie de contacto. La hidrofobicidad de la superficie ha sido descrita como una de las propiedades más importantes durante el proceso de adhesión (Sousa *et al.*, 2009). Nuestros resultados indican que los microorganismos de estudio fueron más fácilmente liberados de los textiles de sintéticos (poliéster y poliamida) respecto a los naturales (algodón). Lo anterior debido a que los textiles de naturaleza sintética son

altamente hidrofóbicos y reducen la habilidad de las células bacterianas para penetrar este tipo de fibras (Sattar *et al.*, 2001).

Los resultados de nuestra investigación demuestran que el tipo de textil interfiere en la efectividad de los agentes desinfectantes. Para ambos microorganismos, los textiles sintéticos como poliamida y poliéster se desinfectaron mejor y presentaron una menor transferencia que los textiles de algodón. Para una desinfección eficaz de los textiles de poliamida y poliéster contaminados con *S. aureus* y *C. albicans*, fue suficiente el detergente PW, sin agentes blanqueadores. En contraste, para lograr una desinfección eficaz en los textiles de algodón contaminados con *C. albicans* se requirió la adición de SH.

Actualmente en todos los sectores, tanto industrial como doméstico, se pretende un ahorro energético, por lo que la tendencia actual en un lavado estándar es el uso de bajas temperaturas. Además de buscar productos ecológicos que tengan un menor impacto al medio ambiente. Sin embargo, debemos ser conscientes que el uso de bajas temperaturas y la selección de un agente desinfectante no adecuado pueden incrementar el riesgo de infección por contagio con patógenos, ya que los microorganismos no siempre son eliminados completamente, ni de los textiles, ni de las aguas residuales del lavado, como lo demuestran nuestros resultados. Cabe destacar que en nuestro estudio usamos altas cargas microbianas para simular el peor escenario y con la finalidad de medir con mayor precisión los niveles de RED en los textiles contaminados.

En conclusión, los desinfectantes base PW comparados con sus respectivas combinaciones en base LQ, presentaron mejor efecto desinfectante. La adición de SH mejoró notablemente el efecto bactericida y fungicida de los detergentes, convirtiéndolo en el agente blanqueador más eficiente, incluso a temperatura ambiente. En tanto, el SP fue el blanqueador que mostró mejor efectividad desinfectante, especialmente con el incremento de temperatura (a 40 °C). Por el contrario, el HP no mejoró sustancialmente el grado de desinfección de los detergentes. Por tanto, después del SH, la adición del agente blanqueador SP se convierte en la mejor elección debido a que tiene un menor impacto negativo al medio ambiente.

Es importante mencionar, que a pesar de obtener una correcta desinfección de los textiles con el proceso de lavado, estos pueden sufrir una recontaminación si la manipulación

posterior (selección, planchado, doblado, etc.) no se lleva a cabo bajo condiciones profesionales (Fijan *et al.*, 2006).

VI. Uso de microscopía de epifluorescencia para evaluar la efectividad del fago P100 en el control de biofilms de *Listeria monocytogenes* sobre superficies de acero inoxidable

1. Material y Métodos

1.1. Superficies de prueba

Se usaron discos de acero inoxidable no porosos con acabado tipo 304 grado 2B (diámetro 2 cm, grosor 1mm) y de superficie plana. Previo a su uso, los discos se trataron de acuerdo a la Norma Europa EN 13697:2001, con un lavado en detergente (Dipol Bac Stop, D.I.S. DINO S.L., Madrid, España) y desengrasado en 2-propanol al 70% (Panreac Química S.A.) (Anónimo, 2002). Posteriormente se esterilizaron a 121 °C durante 15 min.

1.2. Cepa bacteriana y preparación del inóculo

La cepa *L. monocytogenes* CCUG 15526 se obtuvo liofilizada en viales termosellados de la Colección de Cultivos de la Universidad de Göteborg, Suecia. La recuperación del microorganismo hasta la obtención de cultivos stock en tubos de TSA inclinado se realizó según lo descrito en el Capítulo IV sección 1.2. Para preparar el inóculo bacteriano, a partir del tubo inclinado se inoculó un tubo con 9 ml de BPW e incubó a 37 °C durante 20 a 22 h para obtener un cultivo en fase estacionaria. Posteriormente, se realizaron diluciones decimales en TSS. La concentración inicial de este cultivo se determinó a partir de la dilución 10^{-2} por medio de DEM, como se describe más adelante en la sección 1.5.

1.3. Formación del biofilm

Para formar los biofilms de *L. monocytogenes*, los discos se colocaron en placas de Petri y se inocularon con 30 μ l de la dilución bacteriana en TSS con 3 \log_{10} de células por mililitro aproximadamente. Con el fin de verificar el número de células inicial en los discos, se sembraron cinco alícuotas del inóculo en placas de TSA e incubaron a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, los discos inoculados se colocaron dentro de una cámara con humedad absoluta a 22 – 24 °C durante 72 h para permitir el desarrollo del biofilm (condiciones húmedas) (Fuster-Valls *et al.*, 2008). Es importante señalar que los biofilms de *L. monocytogenes* se formaron en condiciones estáticas sin renovación del medio de cultivo.

1.4. Fago y tratamientos

Se usó el fago P100 que se caracteriza por su amplio espectro contra *L. monocytogenes*. EBI Food Safety B.V. (LISTEX P100; Wageningen, Holanda) proporcionó la suspensión purificada de fago P100 en solución salina tamponada [$10,6 \log_{10}$ de Unidades Formadoras de Placa

(UFP) por mililitro], que se almacenó en oscuridad a 4 °C. La concentración de fagos se determinó por el método de doble capa de agar como se describirá más adelante (sección 1.7.).

Una vez desarrollados los biofilms, los discos se trataron con 100 µl de suspensiones de fago P100 con aproximadamente 5, 6, 7 y 8 log₁₀ UFP ml⁻¹, obtenidos por dilución decimal de la suspensión original en solución salina. El control negativo consistió en un tratamiento del biofilm con 100 µl de solución salina en lugar del fago P100, para determinar la supervivencia máxima de *L. monocytogenes* durante el periodo de tratamiento. Después de cada tiempo de exposición (0, 2, 8, 24 y 48 h) se retiraron asépticamente cinco discos, para examinar la estructura del biofilm y el recuento de células viables de *L. monocytogenes* por DEM, para el recuento de *L. monocytogenes* por el método de cultivo, así como para determinar el título de fago por el método de doble capa de agar. Durante el tratamiento con fagos, los discos permanecieron en condiciones de humedad.

1.5. Evaluación del biofilm de *L. monocytogenes* por DEM

Después de cada tiempo de exposición al fago, se realizó la tinción vital con 20 µl del kit de viabilidad LIVE/DEAD®. Algunas muestras teñidas se homogenizaron con la punta de una pipeta para romper el biofilm y realizar el recuento de las células uniformemente distribuidas sobre la superficie del disco. Posteriormente, se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 min. Estas muestras se evaluaron con el microscopio de epifluorescencia Olympus BX51/BX52, equipado con una lámpara de mercurio de 100 W (USH-103OL), un filtro de doble paso (U-M51004 F/R – V2) y una cámara digital DP50-CU.

Las muestras teñidas sin homogenizar se observaron con objetivos de 4X y 40X para examinar la estructura del biofilm (intacto o disgregado) y para evaluar el estado vital de las células bacterianas, respectivamente. Posteriormente, con el fin de determinar el número de bacterias viables, las muestras teñidas y homogenizadas con la punta de una pipeta se observaron con el objetivo de 40X. Para cada muestra, se realizó el recuento de células verdes observadas en diez campos seleccionados al azar para estimar la cantidad de células viables por centímetro cuadrado. La concentración de la suspensión de *L. monocytogenes* usada para inocular los discos y formar el biofilm, se determinó de forma similar, expresando

el resultado de células viables por mililitro. Las imágenes se analizaron usando el programa analySIS Auto 3.2 (Fuster-Valls *et al.*, 2008).

1.6. Evaluación del biofilm de *L. monocytogenes* por el método de cultivo

Después de cada tiempo de exposición a los fagos, los discos se colocaron en un frasco estéril con 10 ml de TSB conteniendo 1 g por litro de Tween 80 y 3 g de perlas de vidrio (diámetro 2 mm). Esta suspensión se agitó energicamente durante 1 min para recuperar los microorganismos adheridos (Anónimo, 2002; Lehtola *et al.*, 2007). Para determinar la concentración de células viables, se realizaron diluciones decimales de la suspensión en solución salina y se sembraron por duplicado en TSAYE alícuotas de 1 ml de las diluciones adecuadas. Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C y se contaron las diluciones que dieron lugar a recuentos entre 30 y 300 colonias. Los datos se expresaron en UFC por centímetro cuadrado.

1.7. Control del título del fago por el método de doble capa de agar

Después del tratamiento con fagos, con el fin de determinar el título del fago en los discos, se usaron las mismas suspensiones obtenidas para el recuento de *L. monocytogenes* por el método de cultivo. El título del fago se determinó usando el método de doble capa de agar (Loessner y Busse, 1990; Carlton *et al.*, 2005). Una alícuota de 100 µl de la suspensión diluida se mezcló por duplicado con 250 µl de *L. monocytogenes* en fase log en un tubo con 4 ml de *Brain Heart Infusion* semisólido a 46 °C (BHI con agar al 0,7%; Becton Dickinson and Co.). Inmediatamente, la mezcla se transfirió a placas de agar BHI solidificadas y se incubó a 37 °C durante 24 h. Al final del periodo de incubación, las placas visibles se contaron y expresaron como UFP por centímetro cuadrado.

1.8. Comparación del método de cultivo y DEM para la determinación de células viables de *L. monocytogenes*

Para comparar ambos métodos, se usaron las diluciones decimales de *L. monocytogenes* en TSS. Una alícuota de 50 µl de cada dilución se colocó en el centro del disco, seguidamente se realizó la tinción vital LIVE/DEAD® y se cuantificó por DEM, como se describió anteriormente. En paralelo, se sembraron cinco placas de TSAYE de las diluciones adecuadas y se incubaron a 37 °C durante 24 h.

1.9. Análisis estadístico

Se transformaron los datos del recuento de bacterias y fagos en unidades logarítmicas [$\log_{10}(x + 1)$]. El valor de uno fue agregado a las determinaciones para usar el valor cero en el análisis. Se aplicó la prueba de t-Student apareado y estudios de correlación con la finalidad de evaluar la relación entre los recuentos obtenidos por DEM y el método de cultivo, con y sin el tratamiento con fagos. Además, los datos del tratamiento se evaluaron con ANOVA con la finalidad de investigar el efecto de la concentración del fago y del tiempo de exposición. Cuando el efecto fue estadísticamente significativo, la comparación de medias se realizó por Duncan y SNK ($\alpha = 0,05$). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SAS para Windows versión 9.1.

2. Resultados

2.1. Evaluación del biofilm de *L. monocytogenes* por DEM

L. monocytogenes desarrolló biofilms en las superficies de acero inoxidable y consiguieron niveles de $5,36 \pm 0,21 \log_{10}$ UFC cm^{-2} después de 72 h de incubación en condiciones de humedad. La **Figura 13A** muestra el recuento de células viables por DEM del biofilm de *L. monocytogenes* después de aplicar el tratamiento con el fago P100. Se observó que a mayor concentración inicial de fagos, es mejor la eficacia en la inactivación del patógeno. Esta inactivación fue dependiente del tiempo de exposición al fago. Así el patógeno no disminuyó significativamente ($P > 0,05$) en las muestras tratadas con $5 \log_{10}$ UFP ml^{-1} hasta las 48 h. Sin embargo, en los biofilms tratados con $6 \log_{10}$ UFP ml^{-1} se detectó una disminución significativa ($P < 0,05$) después de las 24 h y en los biofilms tratados con 7 y $8 \log_{10}$ UFP ml^{-1} la primera reducción significativa ($P < 0,05$) de *L. monocytogenes* se observó después de las 8 h.

Cuando examinamos la estructura del biofilm por DEM usando el objetivo de 4X, se observaron biofilms intactos en todas las muestras tratadas con $5 \log_{10}$ UFP ml^{-1} hasta las 48 h (resultados no mostrados). Sin embargo, cuando las muestras fueron tratadas con 6, 7 y $8 \log_{10}$ UFP ml^{-1} se observó la disgregación del biofilm después de 8 h de tratamiento (**Figura14**). Cuando se usó el objetivo de 40X, se observaron células viables en todas las muestras tratadas incluso a las 48 h de tratamiento con el fago (**Figura 15**). Estas células

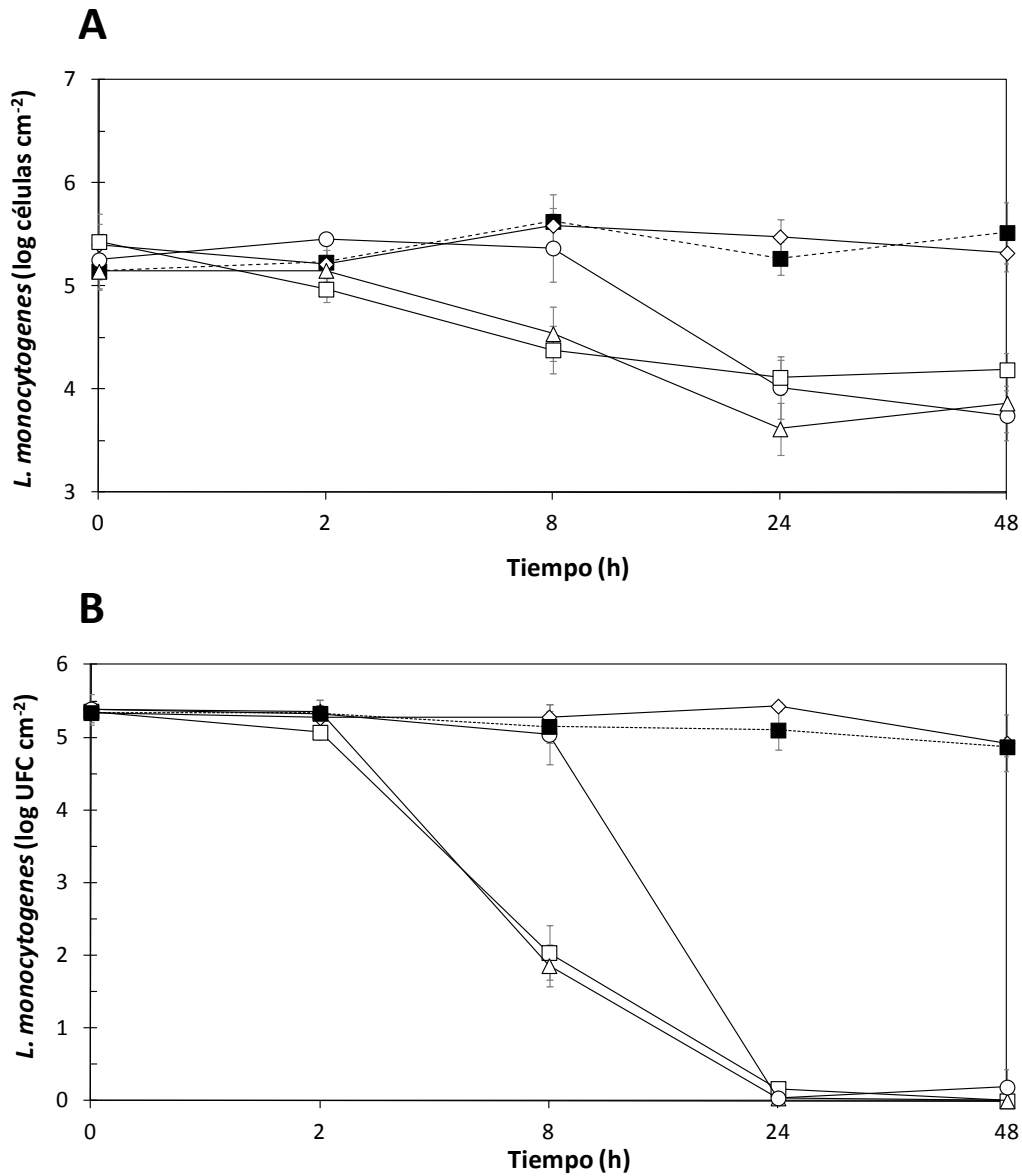


Figura 13. Reducción de *L. monocytogenes* en superficies de acero inoxidable con diferentes concentraciones de fago P100 durante 48 h. **Panel A:** Cálculo de células viables por DEM (límite de detección igual a $2,71 \log_{10}$ células cm^{-2}). **Panel B:** Cálculo por método de cultivo (límite de detección igual a $0,25 \log_{10}$ UFC cm^{-2}). ■, control libre de fago; ◇, fago P100 a $5 \log_{10}$ UFP ml^{-1} ; ○, fago P100 a $6 \log_{10}$ UFP ml^{-1} ; △, fago P100 a $7 \log_{10}$ UFP ml^{-1} ; □, fago P100 a $8 \log_{10}$ UFP ml^{-1} . Las barras de error indican el error estándar de la media ($n = 6$).

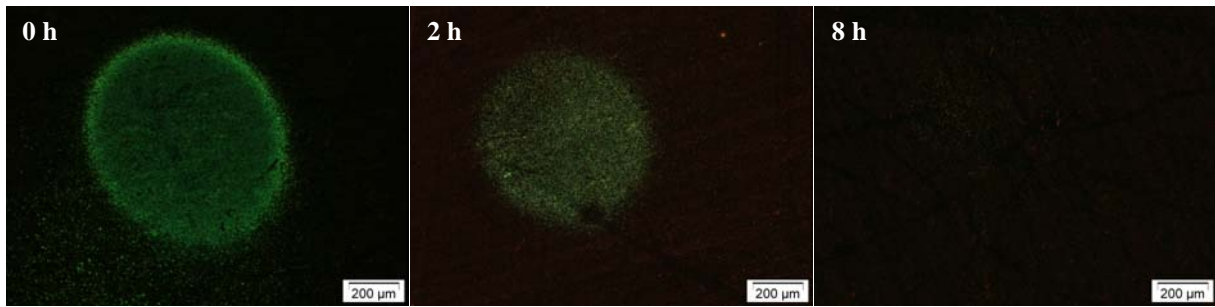


Figura 14. Evaluación de la estructura de biofilms de *L. monocytogenes* sobre superficies de acero inoxidable tratados con $8 \log_{10}$ UFP ml^{-1} de fago P100, evaluados a 0, 2 y 8 h. Imágenes digitales de epifluorescencia de la tinción con LIVE/DEAD® BacLight™ L13152.

viables no se detectaron por el método de cultivo en las muestras tratadas con 7 y $8 \log_{10}$ UFP ml^{-1} (**Figura 13B**).

El porcentaje de células muertas en la muestra control y en las tratadas con $5 \log_{10}$ UFP ml^{-1} se encontró por debajo de 2,71% durante todo el estudio. Mientras que en las superficies tratadas con concentraciones de fago más altas, el porcentaje de células muertas fue significativamente superior ($P < 0,05$). El incremento mayor ocurrió principalmente en los tratamientos con 7 y $8 \log_{10}$ UFP ml^{-1} , alcanzando hasta un 45%.

2.2. Evaluación del biofilm de *L. monocytogenes* por el método de cultivo

De manera similar a las observaciones por DEM, cuando se aplicó $5 \log_{10}$ UFP ml^{-1} del fago sobre el biofilm, no se consiguieron reducciones en el número de *L. monocytogenes* a las 48 h, y no existieron diferencias significativas ($P > 0,05$) con la muestra control (sin fago) (**Figura 13B**). Sin embargo, sí se detectaron reducciones significativas ($P < 0,05$) en el número de bacterias con las concentraciones 6, 7 y $8 \log_{10}$ UFP ml^{-1} de fago. Con $6 \log_{10}$ UFP ml^{-1} de fago, se logró una reducción significativa ($P < 0,05$) del número de *L. monocytogenes* después de 24 h. Sin embargo, a esta concentración se detectó una cantidad muy baja ($0,19 \log_{10}$ UFC cm^{-2}) del patógeno después de 48 h de tratamiento. En contraste, cuando los biofilms se trataron con 7 y $8 \log_{10}$ UFP ml^{-1} , la primera disminución significativa ($P < 0,05$) en el recuento de *L. monocytogenes* se detectó después de 8 h y el patógeno alcanzó niveles indetectables a las 48 h (**Figura 13B**), indicando un control efectivo con estas dos concentraciones de fago.

2.3. Comparación del recuento de células viables por DEM y el método de cultivo

Después de inocular los discos con las suspensiones bacterianas (sin aplicar fagos), se apreció una correlación lineal elevada entre los recuentos obtenidos por DEM y el método de cultivo en el intervalo de 3×10^2 a 1×10^6 células cm^{-2} ($R = 0,92$; $P < 0,0001$). Además, no se mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos ($P > 0,05$).

Sin embargo, cuando los microorganismos se sometieron al tratamiento con fagos, el efecto del tratamiento se detectó por ambos métodos, pero, la correlación entre ellos disminuyó considerablemente ($R = 0,61$; $P < 0,0001$). El método de cultivo mostró recuentos más bajos. La reducción bacteriana máxima por efecto del fago fue de 1,5 y 5,4 unidades logarítmicas en DEM y el método de cultivo, respectivamente.

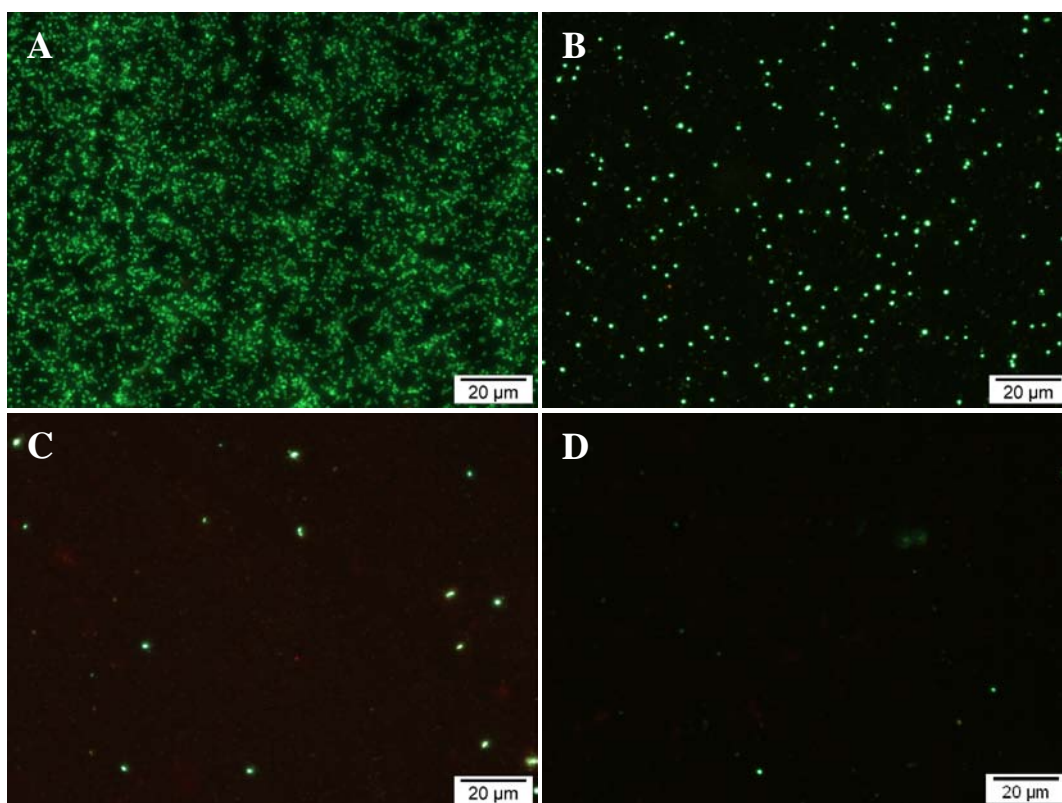


Figura 15. Estado vital de *L. monocytogenes* en biofilms tratados con **A)** $5 \log_{10}$ UFP ml^{-1} , **B)** $6 \log_{10}$ UFP ml^{-1} , **C)** $7 \log_{10}$ UFP ml^{-1} y **D)** $8 \log_{10}$ UFP ml^{-1} de fago P100 a las 48 h de exposición. Imágenes digitales de epifluorescencia de la tinción con LIVE/DEAD® BacLight™ L13152. Las células viables y no viables teñidas de verde y rojo fluorescente, respectivamente.

2.4. Título del fago

En las muestras tratadas con 5, 6 y 7 \log_{10} UFP ml^{-1} se observó un aumento significativo ($P < 0,05$) en el título del fago. Sin embargo, los incrementos mayores se lograron con 6 y 7 \log_{10} UFP ml^{-1} en 2,59 y 1,48 unidades logarítmicas, respectivamente. En ambos casos, los títulos máximos alcanzados no mostraron diferencias significativas ($P > 0,05$) con el nivel máximo alcanzado por 8 \log_{10} UFP ml^{-1} . El título del fago en las muestras tratadas con 8 \log_{10} UFP ml^{-1} se mantuvo constante durante todo el periodo de estudio de 48 h (**Figura 16**).

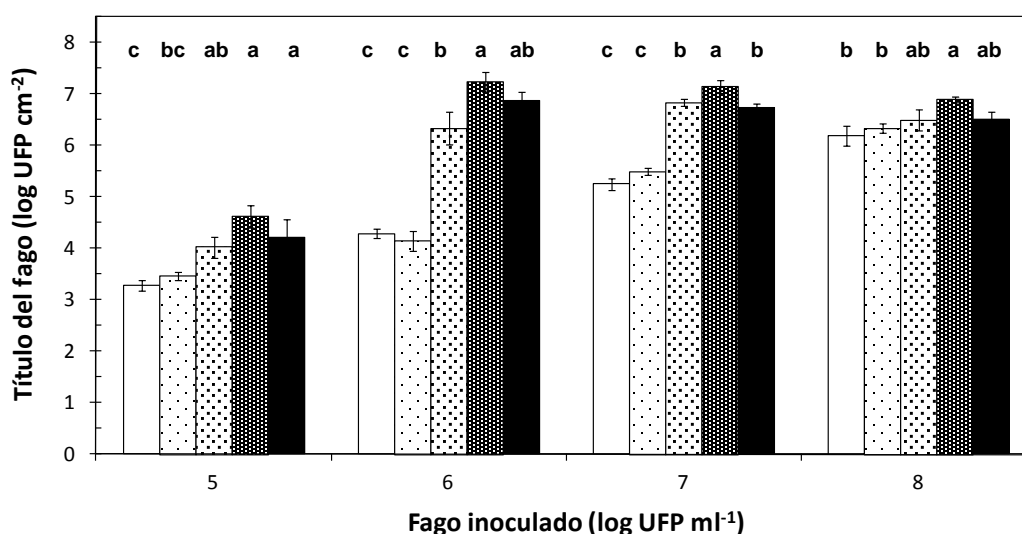


Figura 16. Seguimiento del título del fago P100 durante el tratamiento de biofilms de *L. monocytogenes* con concentraciones de 5, 6, 7 y 8 \log_{10} UFP ml^{-1} de fago P100, durante 48 h. □, 0 h; ▤, 2 h; ▨, 8 h; ▩, 24 h; ■, 48 h. Las letras diferentes indican una diferencia significativa ($P < 0,05$) ente tiempos de exposición. Las barras de error indican los errores estándar de la media ($n = 6$).

3. Discusión

Las cepas persistentes de *L. monocytogenes* pueden ser más tolerantes o resistentes a la limpieza y desinfección usados en la industria alimentaria, especialmente cuando forman biofilms (Tompkin, 2002; Kastbjerg *et al.*, 2009). Este estudio evaluó la efectividad del fago P100 en el control y reducción de biofilms de *L. monocytogenes* sobre superficies de acero inoxidable. Los biofilms usados fueron de 3 días y se formaron en condiciones estáticas sin renovación del medio de cultivo.

La habilidad de los bacteriófagos para fijarse o infectar a la bacteria huésped puede estar influenciada por diversos factores extrínsecos. El más importante es el número de células bacterianas y de fagos. La proporción entre fagos y célula huésped, también conocido como MOI, es crítico en el éxito del tratamiento por fagos (EFSA, 2009b). En este sentido, este estudio muestra que los fagos en concentraciones altas mostraron ser más efectivos en el control de biofilms de *L. monocytogenes* sobre superficies de acero inoxidable (**Figura 13**). Este resultado coincide con lo observado anteriormente por otros investigadores, quienes usaron fagos para controlar patógenos sobre alimentos (Carlton *et al.*, 2005; Bigwood *et al.*, 2007; Guenther *et al.*, 2009). Esto se debe a que los fagos sólo llegan a la célula por difusión pasiva, y en las concentraciones más altas, la partícula del fago tiene más posibilidad de entrar en contacto directo con la célula diana (Guenther *et al.*, 2009).

Teóricamente, un biofilm debería ser rápidamente infectado porque las células están más cerca unas de otra y esto puede favorecer la replicación del fago (Azeredo y Sutherland, 2008). No obstante, la matriz de EPS de un biofilm puede afectar la eficacia de los agentes antimicrobianos porque produce limitaciones en la difusión (Donlan, 2009). Muchos fagos, pero no todos, pueden producir polisacaridasas o liasas de polisacárido. Estas enzimas son capaces de degradar la matriz de EPS, facilitando la migración del fago a través del biofilm (Sutherland *et al.*, 2004). Por lo tanto, el éxito de la aplicación del fago en cualquier ambiente dependerá de la producción y del nivel de actividad de la enzima degradadora de polisacárido (Soni y Nannapaneni, 2010b).

En este trabajo, cuando el estudio de los biofilms tratados se realizó usando DEM, observamos que aunque la estructura de los biofilms se disgregó al ser tratadas con 6, 7 y 8 \log_{10} UFP ml^{-1} (**Figura 14**), las células viables aún estuvieron presentes a las 48 h (**Figura 13A** y **Figura 15**). A parte de la barrera de difusión impuesta por la matriz del biofilm, la tasa de reducción de la biomasa también depende del estado fisiológico de las células. Así, la presencia de una población residual de *L. monocytogenes* después del tratamiento con fagos se podría explicar por la reducida actividad metabólica de las células en el biofilm, especialmente de aquellas que se encuentran en las capas más internas y posiblemente que están privadas de oxígeno y nutrientes. La infección del fago y su ciclo vital en general dependen fuertemente de la fase de crecimiento de la bacteria huésped (Azeredo y Sutherland, 2008), ya que los fagos no pueden infectar productivamente bacterias en fase

estacionaria (EFSA, 2009b). La presencia de células muertas también puede ser considerada una dificultad para la progresión de la infección, debido a que poseen posibles sitios receptores virales (Azeredo y Sutherland, 2008) y de esta manera disminuye la cantidad de fagos efectivos. En nuestras muestras tratadas con concentraciones de fago altas, encontramos hasta un 45% de células muertas que podían ser capaces de absorber una porción de partículas virales libres. La edad del biofilm también afecta el tratamiento por fagos; Soni y Nannapaneni (2010b) observaron que después del tratamiento por fagos, la reducción de células de un biofilm multicapa de 1 semana fue $2 \log_{10}$ UFC cm^{-2} menor que aquellas células de un biofilm de 2 días. La detección de células bacterianas residuales después del tratamiento por fagos también puede sugerir que los fagos se inmovilizaron aparentemente después de la adición a la superficie sólida y por tanto no entraron en contacto con las bacterias sobrevivientes debido a una difusión limitada (Guenther *et al.*, 2009).

La reducción de *L. monocytogenes* por efecto del fago también se evaluó por el método de cultivo para ser comparados con los datos obtenidos por DEM. Con el método de cultivo se observó que los fagos a 6, 7 y 8 \log_{10} UFP ml^{-1} reducen las poblaciones de *L. monocytogenes* en un promedio de 5,29 \log_{10} UFC cm^{-2} después de 24 h (**Figura 13B**). Sin embargo, nuestros datos sugieren que para una óptima eficacia, la concentración de fagos no debería ser inferior a 7 \log_{10} UFP ml^{-1} para lograr una reducción del patógeno a niveles indetectables después de 48 h de contacto (**Figura 13B**). Similares reducciones bacterianas fueron obtenidas por otros investigadores. Soni y Nannapaneni (2010b) demostraron que con el tratamiento con fago P100 en biofilms de 2 días se consiguió una reducción de 5,4 \log_{10} UFC cm^{-2} de *L. monocytogenes* en superficies de acero inoxidable, después de 24 h de tratamiento. Guenther *et al.* (2009) observaron reducciones hasta de 5 unidades logarítmicas en el recuento de *L. monocytogenes* cuando se agregaron fagos (8 \log_{10} UFP g^{-1}) sobre alimentos sólidos. Carlton *et al.* (2005) indicaron reducciones de aproximadamente 2 – 3 \log_{10} de *L. monocytogenes* en queso, cuando se aplicó una concentración de 8 \log_{10} UFP ml^{-1} .

En general, los procesos de desinfección son evaluados usando el método de cultivo convencional. Este método está basado en la habilidad de la bacteria para multiplicarse y formar una colonia. Pero cuando los microorganismos están lesionados, su cultivo se ve

afectado negativamente. En consecuencia, el método de cultivo muestra una disminución en la sensibilidad (Boulos *et al.*, 1999; Oliver, 2005). Berney *et al.* (2006) encontraron que el uso de un solo método indicador de viabilidad, como se aplica frecuentemente, no es suficiente para describir el estado fisiológico de la célula bacteriana bajo estrés. Ellos plantean que la suma de varios indicadores de viabilidad, incluyendo la detección por cultivo, puede dar cierta seguridad sobre el estado fisiológico de la bacteria. En nuestro estudio, la viabilidad celular, como ya se mencionó, también se evaluó usando un método basado en la tinción de células con fluorocromos. Este método determina la viabilidad por evaluación del mantenimiento de la integridad de la membrana (McDougald *et al.*, 1998). La integridad de la membrana demuestra la protección de los constituyentes celulares y su potencial para generar gradientes que confieren capacidad para vivir, pero no garantiza la replicación celular (Baena-Ruano *et al.*, 2006).

En este estudio, la evaluación microscópica de LIVE/DEAD sólo permite distinguir entre células vivas (verdes) y muertas (rojas) (Falcioni *et al.*, 2008), por lo que no se observaron los estados intermedios de vitalidad celular debido a que el ojo humano no puede diferenciar el color emitido en longitudes de onda separadas dentro de este rango (D'hondt *et al.*, 2011). Sin embargo, por medio de la citometría de flujo se muestra que durante los procesos de cambio en la permeabilidad de la membrana celular se producen estados intermedios de viabilidad, este estado se caracteriza porque la célula puede contener a la vez diferentes concentraciones intracelulares de SYTO[®]9 y PI (Berney *et al.*, 2007). Esta tercera población con un estado fisiológico intermedio puede corresponder a células que aún están vivas y metabólicamente activas, pero presentan las membranas lesionadas (Allegra *et al.*, 2008; Kathju *et al.*, 2009). Sin embargo, algunos investigadores consideran como una desventaja el uso del kit LIVE/DEAD[®] con la citometría de flujo, ya que al ocurrir la tinción simultánea de las células con SYTO[®]9 y PI, conduce a la obtención de resultados difíciles de interpretar y que pueden ser críticos, por ejemplo, cuando se tienen que tomar decisiones sobre la efectividad de métodos de desinfección o en la cantidad de bacterias viables en sistemas de distribución de agua (Berney *et al.*, 2007; Díaz *et al.*, 2010; Stocks, 2004; Tomás *et al.*, 2009). Por tanto, la citometría de flujo es especialmente influyente en la redefinición del concepto de "viabilidad" microbiana al revelar que pueden existir microorganismos en estado vivo, muerto y en varios estados intermedios (Doherty *et al.*, 2010). Sin embargo, la DEM aún es

considerada una buena herramienta para evaluar los microorganismos porque así como permite evaluar el estado vital de las células, también muestra la distribución de las células sobre una superficie y nos permite conocer si estas se encuentran libres (planctónicas) o formando biofilms.

En este trabajo, se sobreestimó el efecto del fago con el método de cultivo comparado con DEM, ya que mostró una mayor reducción del biofilm de *L. monocytogenes* y no detectó las células residuales de *L. monocytogenes* observadas por DEM (**Figura 13**). Una razón que podría explicar porque las células bacterianas se visualizaron por microscopía pero no en las placas de agar, es que los fagos presentes en las placas de agar pudieron lisar las células bacterianas y no permitieron el desarrollo de colonias. Para superar esta desventaja del método de cultivo, algunos investigadores recomiendan extraer los fagos de la muestra antes de sembrar las bacterias, con el fin de determinar la reducción bacteriana únicamente debida a la actividad virulenta del fago sobre la muestra y no a la infección por fagos libres presentes en el agar (Sharma *et al.*, 2009; Soni y Nannapaneni, 2010a). Sin embargo, la extracción del fago no asegura la eliminación completa de todos los virus fijados en los microorganismos, y en consecuencia, una actividad residual del fago permanece en el método de cultivo. Heringa *et al.* (2010) encontraron que la extracción de fagos de las suspensiones con bacterias durante el muestreo, por centrifugación y resuspensión del *pellet* bacteriano, no muestra diferencias con el recuento en placa sin extracción de fagos. En nuestro estudio se mostró como la microscopía no necesitó de la inactivación de fagos para detectar las células bacterianas viables sobre las superficies, y esto se convierte en otra ventaja para la técnica de DEM comparada con el método de cultivo.

En este estudio, se demostró que los fagos inoculados estuvieron presentes durante todo el seguimiento. Sin embargo, la concentración más alta de fagos ($8 \log_{10}$ UFP ml^{-1}) no presentó un incremento en su título, mientras que las concentraciones menores incrementaron entre 1 y 2,6 unidades logarítmicas (**Figura 16**). Un hallazgo similar describió Leverentz *et al.* (2003), quienes al realizar tratamientos con fagos sobre piezas de melón durante 7 días detectaron un incremento de aproximadamente 1 unidad logarítmica. Estos diferentes comportamientos que observamos en el título del fago se pueden explicar debido a dos fenómenos que están implicados en la lisis de la bacteria, “lisis desde dentro” y “lisis desde fuera”. El tipo de lisis observado depende de la relación fagos:bacteria. Cuando la relación

de fagos:bacteria no es mayor de 2:1, el fago infecta la célula, se replica y lisa la célula desde dentro, y ocurre un aumento en el título del fago. Sin embargo, cuando existen muchos cientos de fagos por bacteria, las células son lisadas directamente desde fuera, debido a un debilitamiento de la pared celular que ocurre cuando un gran número de fagos se fija, pero no debido a una replicación viral (Dimmock *et al.*, 2007). Por lo tanto, en este estudio, el tratamiento con $8 \log_{10}$ UFP ml^{-1} fue una concentración efectiva como resultado de una inundación pasiva de la bacteria diana, donde principalmente ocurrió la “lisis desde fuera”. Mientras que los tratamientos con 6 y $7 \log_{10}$ UFP ml^{-1} produjeron reducciones similares, pero con “lisis desde dentro”. Estas observaciones pueden promover el uso de bajas concentraciones de fagos. Sin embargo, debemos tener en consideración que la multiplicación del fago tiene ventajas y desventajas en tratamientos usando fagos. Una ventaja es debido a que el fago se replica de acuerdo al número de huésped, por tanto no es necesario emplear la dosis adecuada y resulta más económico cuando se administran pocos fagos. Una posible desventaja sería que el aumento de los ciclos de replicación puede dar lugar al desarrollo de la resistencia del huésped (El-Shibiny *et al.*, 2009). Debemos mencionar que en estudios previos no se observó evidencia de resistencia al fago P100 en las bacterias sobrevivientes tratadas (Carlton *et al.*, 2005; Holck y Berg, 2009).

En conclusión, este trabajo muestra que el fago P100 fue capaz de disgregar los biofilms de *L. monocytogenes* sobre superficies de acero inoxidable a temperatura ambiente. Sin embargo, su efectividad depende de la concentración del fago. Las mayores reducciones en un menor tiempo se obtuvieron con concentraciones de fago mayores a $7 \log_{10}$ UFP ml^{-1} . El método de cultivo mostró reducciones del patógeno a niveles indetectables; sin embargo, este dato debería ser tratado cuidadosamente ya que la tinción vital reveló la presencia de células viables residuales, que representarían un riesgo de contaminación cruzada. Nuestros datos sugieren que el fago P100 puede proporcionar una medida adyuvante para controlar la contaminación de superficies de acero inoxidable con biofilms de *L. monocytogenes*. Sin embargo, el tratamiento con fagos debe usarse en combinación con otras medidas de higienización para incrementar su eficacia. En este estudio, la DEM resultó una buena herramienta para evaluar rápida y adecuadamente el efecto real del fago P100 sobre los biofilms de *L. monocytogenes*.

VII. Conclusiones

1. En el control microbiológico de superficies textiles, los recuentos de *S. aureus* en algodón con el método de cultivo convencional, RTi-PCR y DEM fueron similares a la cantidad de microorganismos inoculados. Así, el método de cultivo presentó el mejor límite de detección ($0,38 \log_{10}$ UFC cm^{-2}), seguido por la RTi-PCR ($2,13 \log_{10}$ UFC cm^{-2}). Entre las técnicas rápidas, la RTi-PCR fue la técnica más eficaz para el recuento de *S. aureus* en textiles de algodón. La metodología propuesta para analizar por RTi-PCR, podría ser una alternativa para la detección de comunidades microbianas que son difíciles de cultivar.
2. En contraste, para el recuento de *S. aureus* en textiles de algodón la DEM fue menos sensible ($4,12 \log_{10}$ UFC cm^{-2}) que el método de cultivo y la RTi-PCR. Además, la técnica resultó poco práctica por ser laboriosa para el recuento de microorganismos en superficies textiles debido a su poca profundidad de campo y al bajo contraste entre microorganismos y superficie.
3. En el efecto desinfectante del lavado estandar sobre *S. aureus* y *C. albicans* en textiles, los agentes desinfectantes base PW presentaron mejor efecto desinfectante comparado con sus respectivas combinaciones en base LQ. En ambos tipos de detergentes (PW y LQ), la adición de SH mejoró notablemente el efecto bactericida y fungicida, por lo que este agente blanqueador fue más eficiente frente a los productos respetuosos con el medio ambiente (SP y HP). Respecto al HP, no mejoró sustancialmente el grado de desinfección de ambos tipos de detergentes. Por tanto, después del compuesto clorado, la adición del agente blanqueador SP sería lo más recomendable debido a que tiene un menor impacto negativo al medio ambiente.
4. El efecto de la temperatura en el lavado de los textiles contaminados con *S. aureus* y *C. albicans* se observó principalmente con los agentes desinfectantes combinados con SP, ya que el incremento de la temperatura a 40 °C mejoró el efecto desinfectante, obteniéndose reducciones mayores y transferencias menores.
5. El efecto del tipo de textil en la desinfección de los agentes desinfectantes, se observó principalmente para los textiles sintéticos como poliamida y poliéster, que tanto para *S. aureus* como para *C. albicans*, se desinfectaron mejor y presentaron una menor transferencia que los textiles de algodón.

6. El fago P100 disgregó los biofilms de *L. monocytogenes* sobre superficies de acero inoxidable a temperatura ambiente. Sin embargo, su efectividad fue dependiente de la concentración de fagos. Las mayores reducciones en menor tiempo ocurrieron cuando se usaron concentraciones de fago superiores a $7 \log_{10}$ UFP ml^{-1} .
7. Los recuentos de los biofilms de *L. monocytogenes* tratados con fagos P100 obtenidos por el método de cultivo mostraron reducciones del patógeno hasta niveles indetectables, este dato debería ser tratado cuidadosamente ya que la DEM reveló la presencia de células viables residuales, que pueden representar un riesgo de contaminación cruzada. Por tanto, la DEM resultó una buena herramienta para evaluar rápida y adecuadamente el efecto real del fago P100 sobre los biofilms de *L. monocytogenes* en superficies de acero inoxidable.
8. Nuestros datos sugieren que el fago P100 puede proporcionar una medida adyuvante para controlar la contaminación de superficies de acero inoxidable con *L. monocytogenes*. Sin embargo, el tratamiento con fagos debe usarse en combinación con otras medidas de higienización para incrementar su eficacia.

VIII. Bibliografía

- Abedon, S.Y. 2008. Bacteriophage ecology: Population growth, evolution, and impact of bacterial viruses. *Cambridge University Press*. New York, EE.UU.
- Ackers, M.L., Schoenfeld, S., Markman, J., Smith, M.G., 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. *J Infect Dis* **181**, 1834-1837.
- Alessandria, V., Rantsiou, K., Dolci, P. y Cocolin, L. 2010. Molecular methods to assess *Listeria monocytogenes* route of contamination in a dairy processing plant. *Int J Food Microbiol* **141**, S156-S162.
- Allegra, S., Berger, F., Berthelot, P., Grattard, F., Pozzetto, B. y Riffard, S. 2008. Use of flow cytometry to monitor *Legionella* viability. *Appl Environ Microbiol* **74**, 17813-7816.
- Altenbaher, B., Šostar-Turk, S. y Fijan, S. 2010. Ecological parameters and disinfection effect of low-temperature laundering in hospitals in Slovenia. *J Clean Prod* **19**, 253-258.
- Altmajer-Vaz, D. 2004. Formulaciones detergentes biodegradables: Ensayos de lavado. 1-302.
- Álvarez-Ordóñez, A., Fernandez, A., Bernardo, A. y López, M. 2009. Comparison of acids on the induction of an acid tolerance response in *Salmonella* Typhimurium, consequences for food safety. *Meat Sci* **81**, 65-70.
- Anónimo. 1996. Richtlinie für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention. RKI 2010, 168.
- 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). EN 13697.
- Anónimo. 2003. Textiles - Laundry processed textile articles - Biocontamination control system. EVS-EN 14065:2003.
- Arya, M., Shergill, I.S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N. y Patel, H.R. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* **5**, 209-219.
- Aycicek, H., Oguz, U. y Karci, K. 2006. Comparison of results of ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing methods for the determination of surface cleanliness at a hospital kitchen. *Int J Hyg Environ Health* **209**, 203-206.
- Azeredo, J. y Sutherland, I.W. 2008. The use of phages for the removal of infectious biofilms. *Curr Pharm Biotechnol* **9**, 261-266.
- Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Santos-Dueñas, I., Cantero-Moreno, D., Barja, F. y García-García, I. 2006. Rapid method for total, viable and non-viable acetic acid bacteria determination during acetification process. *Process Biochemistry* **41**, 1160-1164.
- Bajpai, D. y Tyagi, V.K. 2007. Laundry detergents: an overview. *J O Sci* **56**, 327-340.
- Baldin, A., Calvini, P. y Zappalà, M.P. 2008. A preliminary study on paper bleaching with sodium percarbonate. *Restaurator* **29**, 107-124.

- Banatvala, N., Magnano, A., Cartter, M., Barrett, T., Bibb, W., Vasile, L., Mshar, P., Lambert-Fair, M., Green, J. y Bean, N. 1996. Meat grinders and molecular epidemiology: two supermarket outbreaks of *Escherichia coli* O157: H7 infection. *J Infect Dis* **173**, 480-483.
- Barbut, F., Menuet, D., Verachten, M. y Girou, E. 2009. Comparison of the efficacy of a hydrogen peroxide dry-mist disinfection system and sodium hypochlorite solution for eradication of *Clostridium difficile* spores. *Infect Control Hosp Epidemiol* **30**, 507-514.
- Baumann, A.R., Martin, S.E. y Feng, H. 2009. Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms from stainless steel by use of ultrasound and ozone. *J Food Prot* **72**, 1306-1309.
- Beales, N. 2004. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A review. *CRFSFS* **3**, 1-20.
- Bergen, L.K., Meyer, M., Høg, M., Rubenhagen, B. y Andersen, L.P. 2009. Spread of bacteria on surfaces when cleaning with microfibre cloths. *J Hosp Infect* **71**, 132-137.
- Berney, M., Hammes, F., Bosshard, F., Weilenmann, H.U. y Egli, T. 2007. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight kit in combination with flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* **73**, 3283-3290.
- Berney, M., Weilenmann, H.U. y Egli, T. 2006. Flow-cytometric study of vital cellular functions in *Escherichia coli* during solar disinfection (SODIS). *Microbiology* **152**, 1719-1729.
- Berzins, A., Hellstrom, S., Silins, I. y Korkeala, H. 2010 Contamination Patterns of *Listeria monocytogenes* in Cold-Smoked Pork Processing. *J Food Prot* **73**, 2103-2109.
- Bigwood, T., Hudson, J.A., Billington, C., Carey-Smith, G.V. y Heinemann, J.A. 2007. Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. *Food Microbiol* **25**, 400-406.
- Blaschek, H.P., Wang, H. y Agle, M.E. 2007. Biofilms in the food environment. *Wiley-Blackwell*. EE.UU.
- Bloomfield, S.F., Exner, M., Signorelli, C., Nath, K.J. y Scott, E.A. 2011. The infection risks associated with clothing and household linens in home and everyday life settings, and the role of laundry. *IFH*. Accesado: Noviembre 2012. Disponible en: http://www.ifhhomehygiene.org/IntegratedCRD.nsf/IFH_Topic_Infection_Transmission?OpenForm
- Boulos, L., Prevost, 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. *J Microbiol Methods* **37**, 77-86.
- Breeuwer, P. y Abee, T. 2000. Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *Int J Food Microbiol* **55**, 193-200.
- Breuer, T. 1999. CDC investigations: the May 1998 outbreak of *Salmonella agona* linked to cereal. *Cereal Foods World* **44**, 185-186.
- Brooks, J.D. y Flint, S.H. 2008. Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *Int J Food Sci Tech* **43**, 2163-2176.

- Bruttin, A. y Brussow, H. 2005. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2874-2878.
- Bryers, J.D. y Ratner, B.D. 2004. Bioinspired implant materials befuddle bacteria. *AMS News* **70**, 232-237.
- Cardinale, E., Perrier, G.C., Tall, F., Gueye, E.F. y Salvat, G. 2005. Risk factors for contamination of ready-to-eat street-vended poultry dishes in Dakar, Senegal. *Int J Food Microbiol* **103**, 157-165.
- Careli, R.T., Andrade, N.J., Soares, N.F., Ribeiro Júnior, J.I., Rosado, M.S. y Bernardes, P.C. 2009. The adherence of *Pseudomonas fluorescens* to marble, granite, synthetic polymers, and stainless steel. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **29**, 171-176.
- Carlton, R.M. 1999. Phage therapy: past history and future prospects. *Arch Immunol Ther Exp* **47**, 267-274.
- Carlton, R.M., Noordman, W.H., Biswas, B., De Meester, E.D. y Loessner, M.J. 2005. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regul Toxicol Pharmacol* **43**, 301-312.
- Carpentier, B. y Cerf, O. 2011. Review-Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *Int J Food Microbiol* **145**, 1-8.
- Carson, P.A., Fairclough, C.S., Mauduit, C. y Colsell, M. 2006. Peroxy bleaches: Part 1. Background and techniques for hazard evaluation. *J Hazard Mater* **136**, 438-445.
- Casani, S., Rouhany, M. y Knøchel, S. 2005. A discussion paper on challenges and limitations to water reuse and hygiene in the food industry. *Water Res* **39**, 1134-1146.
- CDC. 2007. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006. Accesado: Septiembre 2011. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/130r.pdf>
- CDC. 2011. Estimates of foodborne illness in the United States. Accesado: Mayo 2011. Disponible en: <http://www.cdc.gov/Features/dsFoodborneEstimates/>
- Chen, B.Y., Pyla, R., Kim, T.J., Silva, J.L. y Jung, Y.S. 2010. Prevalence and contamination patterns of *Listeria monocytogenes* in catfish processing environment and fresh fillets. *Food Microbiol* **27**, 645-652.
- Chen, P.S. y Li, C.S. 2005. Real-time quantitative PCR with gene probe, fluorochrome and flow cytometry for microorganism analysis. *J Environ Monit* **7**, 257-262.
- Chiarini, E., Tyler, K., Farber, J., Pagotto, F. y Destro, M. 2009. *Listeria monocytogenes* in two different poultry facilities: Manual and automatic evisceration. *Poult Sci* **88**, 791-797.
- Choi, K.B., Lim, H.S., Lee, K., Ha, G.Y., Jung, K.H. y Sohn, C.K. 2011. Epidemiological investigation for outbreak of food poisoning caused by *Bacillus cereus* among the workers at a local company in 2010. *J Prev Med Public Health* **44**, 65-73.

- Christian, R.R., Manchester, J.T. y Mellor, M.T. 1983. Bacteriological quality of fabrics washed at lower-than-standard temperatures in a hospital laundry facility. *Appl Environ Microbiol* **45**, 591-597.
- Christison, C.A., Lindsay, D. y Von Holy, A. 2007. Cleaning and handling implements as potential reservoirs for bacterial contamination of some ready-to-eat foods in retail delicatessen environments. *J Food Prot* **70**, 2878-2883.
- Codex Alimentarius Commission. 2003. Recommended international code of practice - General principles of food hygiene. Accesado: Mayo 2011. Disponible en: http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=es
- Conter, M., Paludi, D., Zanardi, E., Ghidini, S., Vergara, A. y Ianieri, A. 2009. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **128**, 497-500.
- Craigien, B., Dashiff, A. y Kadouri, D.E. 2011. The use of commercially available alpha-amylase compounds to inhibit and remove *Staphylococcus aureus* biofilms. *Open Microbiol J* **5**, 21-31.
- Créach, V., Baudoux, A.C., Bertru, G. y Rouzic, B.L. 2003. Direct estimate of active bacteria: CTC use and limitations. *J Microbiol Methods* **52**, 19-28.
- Cruz, C.D. y Fletcher, G.C. 2011. Prevalence and biofilm-forming ability of *Listeria monocytogenes* in New Zealand mussel (*Perna canaliculus*) processing plants. *Food Microbiol* **28**, 1387-1393.
- Dawson, D. 2005. Foodborne protozoan parasites. *Int J Food Microbiol* **103**, 207-227.
- 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. *J Appl Microbiol* **102**, 945-953.
- de Boer, E. y Beumer, R.R. 1999. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *Int J Food Microbiol* **50**, 119-130.
- Delbes-Paus, C., Dorchies, G., Chaabna, Z., Callon, C. y Montel, M.C. 2010. Contribution of hydrogen peroxide to the inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Lactococcus garvieae* in interaction with raw milk microbial community. *Food Microbiol* **27**, 924-932.
- Denyer, S.P. y Stewart, G. 1998. Mechanisms of action of disinfectants. *Int Biodeterior Biodegrad* **41**, 261-268.
- DeQueiroz, G.A. y Day, D.F. 2008. Disinfection of *Bacillus subtilis* spore-contaminated surface materials with a sodium hypochlorite and a hydrogen peroxide-based sanitizer. *Lett Appl Microbiol* **46**, 176-180.
- D'hondt, L., Höfte, M., Van Bockstaele, E. y Leus, L. 2011. Applications of flow cytometry in plant pathology for genome size determination, detection and physiological status. *Molecular Plant Pathology*. 1-14.
- Díaz, M., Herrero, M., García, L.A. y Quirós, C. 2010. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochem Eng J* **48**, 385-407.

- Dimmock, N.J., Easton, A.J. y Leppard, K.N. 2007. Introduction to modern virology. *Blackwell Science*. Malden, EE.UU.
- Doherty, S.B., Wang, L., Ross, R.P., Stanton, C., Fitzgerald, G.F. y Brodkorb, A. 2010. Use of viability staining in combination with flow cytometry for rapid viability assessment of *Lactobacillus rhamnosus* GG in complex protein matrices. *J Microbiol Methods* **82**, 301-310.
- Doijad, S., Barbuddhe, S., Garg, S., Kalekar, S., Rodrigues, J., D'Costa, D., Bhosle, S. y Chakraborty, T. 2011. Incidence and genetic variability of *Listeria* species from three milk processing plants. *Food Control* **22**, 1900-1904.
- Donlan, R.M. 2009. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends Microbiol* **17**, 66-72.
- Durkee, J.B. 2006. Management of Industrial Cleaning Technology and Processes. *Elsevier*. Reino Unido.
- EFSA. 2009a. Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed (2009 update). *EFSA Journal* **7**, 1-92.
- EFSA. 2009b. Scientific opinion on the use and mode of action of bacteriophage in food production. *EFSA Journal*, 1-26.
- EFSA. 2012. Scientific opinion on the evaluation of the safety and efficacy of ListexTMP100 for the removal of *Listeria monocytogenes* surface contamination of raw fish. *EFSA Journal* **10**, 1-43.
- EFSA y ECDC. 2012. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. Accesado: Abril 2013. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2597.pdf>
- Ellis, A., Preston, M., Borczyk, A., Miller, B., Stone, P., Hatton, B., Chagla, A. y Hockin, J. 1998. A community outbreak of *Salmonella berta* associated with a soft cheese product. *Epidemiol Infect* **120**, 29-35.
- El-Shibiny, A., Scott, A., Timms, A., Metawea, Y., Connerton, P. y Connerton, I. 2009. Application of a Group II *Campylobacter* bacteriophage to reduce strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* colonizing broiler chickens. *J Food Prot* **72**, 733-740.
- Enjalbert, B., MacCallum, D.M., Odds, F.C. y Brown, A.J. 2007. Niche-specific activation of the oxidative stress response by the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect Immun* **75**, 2143-2151.
- Evans, M., Tromans, J., Dexter, E., Ribeiro, C. y Gardner, D. 1996. Consecutive *Salmonella* outbreaks traced to the same bakery. *Epidemiol Infect* **116**, 161-167.
- Falcioni, T., Papa, S., Campana, R., Manti, A., Battistelli, M. y Baffone, W. 2008. State transitions of *Vibrio parahaemolyticus* VBNC cells evaluated by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* **74**, 272-281.
- Farber, J.M. y Peterkin, P.I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Mol Biol Rev* **55**, 476-511.

FDA. 2007. GRAS notice no. 000218. Accesado: Octubre 2009. Disponible en: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rpt=grasListing&id=218>

FDA. 2011. Food additives permitted for direct addition to food for human consumption; Bacteriophage preparation. Accesado: Agosto 2012. Disponible en: <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2011-03-23/pdf/2011-6792.pdf>

FDA. 2012a. GRAS notice inventory No. 198. Accesado: Julio 2012. Disponible en: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rpt=grasListing&id=198>

FDA. 2012b. Inventory of effective food contact substance (FCS) notifications. FCN No. 1018. Accesado: Agosto 2012. Disponible en: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rpt=fcsListing&id=1018>

Fijan, S., Cencič, A. y Šostar-Turk, S. 2006. Hygiene monitoring of textiles used in the food industry. *Brazilian J Microbiol* **37**, 356-361.

Fijan, S., Gunnarsen, J.T., Weinreich, J. y Šostar-Turk, S. 2008. Determining the hygiene of laundering industrial textiles in Slovenia, Norway and Denmark. *Tekstil* **57**, 73-83.

Fijan, S., Koren, S., Cencič, A. y Šostar-Turk, S. 2007. Antimicrobial disinfection effect of a laundering procedure for hospital textiles against various indicator bacteria and fungi using different substrates for simulating human excrements. *Diagn Microbiol Infect Dis* **57**, 251-257.

Fijan, S. y Šostar-Turk, S. 2010. Antimicrobial activity of selected disinfectants used in a low temperature laundering procedure for textiles. *Fibres & Textiles in Eastern Europe* **18**, 89-92.

Fijan, S., Šostar-Turk, S. y Cencič, A. 2005. Implementing hygiene monitoring systems in hospital laundries in order to reduce microbial contamination of hospital textiles. *J Hosp Infect* **61**, 30-38.

Fraise, A.P. 1999. Choosing disinfectants. *J Hosp Infect* **43**, 255-264.

Fretz, R., Sagel, U., Ruppitsch, W., Pietzka, A., Stöger, A., Huhulescu, S., Heuberger, S., Pichler, J., Much, P. y Pfaff, G. 2010. Listeriosis outbreak caused by acid curd cheese 'Quargel', Austria and Germany 2009. *Eurosurveillance*, 31.

FSIS. 2012. Safe and suitable ingredients used in the production of meat, poultry, and egg products. Accesado: Agosto 2012. Disponible en: <http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FSISDirectives/7120.1.pdf>

Fujioka, K., Kozone, I., Saito, M. y Matsuoka, H. 2006. Rapid evaluation of the efficacy of microbial cell removal from fabrics. *J Ind Microbiol Biotechnol* **33**, 995-1002.

Fuster-Valls, N., Hernandez-Herrero, M., Marín-de-Mateo, M. y Rodríguez-Jerez, J.J. 2008. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. *Food Control* **19**, 308-314.

Gattlen, J., Amberg, C., Zinn, M. y Mauclair, L. 2010. Biofilms isolated from washing machines from three continents and their tolerance to a standard detergent. *Biofouling* **26**, 873-882.

- Gaulin, C., Ramsay, D. y Bekal, S. 2012. Widespread listeriosis outbreak attributable to pasteurized cheese, which led to extensive cross-contamination affecting cheese retailers, Quebec, Canada, 2008. *J Food Prot* **75**, 71-78.
- Gerba, C.P. 2001. Application of quantitative risk assessment for formulating hygiene policy in the domestic setting. *J Infect* **43**, 92-98.
- Gerba, C.P. y Kennedy, D. 2007. Enteric virus survival during household laundering and impact of disinfection with sodium hypochlorite. *Appl Environ Microbiol* **73**, 4425-4428.
- Gerssen, A., Pol-Hofstad, I.E., Poelman, M., Mulder, P.P.J., van den Top, H.J. y de Boer, J. 2010. Marine Toxins: Chemistry, Toxicity, Occurrence and Detection, with Special Reference to the Dutch Situation. *Toxins* **2**, 878-904.
- Giambrone, C. 2010. Help your employees protect against pathogens. *Food Quality*. Accesado: Agosto 2011. Disponible en: http://www.foodquality.com/details/article/809795/Help_Your_Employees_Protect_Against_Pathogens.html
- 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. *J Appl Microbiol* **87**, 41-48.
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R. y Mathieu, C. 2001. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* **25**, 386-401.
- 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. *J Food Prot* **70**, 90-96.
- Goulet, V., Rocourt, J., Rebiere, I., Jacquet, C., Moyse, C., Dehaumont, P., Salvat, G. y Veit, P. 1998. Listeriosis outbreak associated with the consumption of rillettes in France in 1993. *J Infect Dis* **177**, 155-160.
- Gourabathini, P., Brandl, M.T., Redding, K.S., Gunderson, J.H. y Berk, S.G. 2008. Interactions between food-borne pathogens and protozoa isolated from lettuce and spinach. *Appl Environ Microbiol* **74**, 2518-2525.
- Gracias, K.S. y McKillip, J.L. 2004. A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food. *Can J Microbiol* **50**, 883-890.
- Graves, T.K., Bradley, K.K. y Crutcher, J.M. 1998. Outbreak of *Campylobacter* Enteritis associated with cross-contamination of food—Oklahoma, 1996. *J Am Med Assoc* **279**, 1341-1341.
- Greer, G.G. 2005. Bacteriophage control of foodborne bacteria. *J Food Prot* **68**, 1102-1111.
- Greig, J.D. y Ravel, A. 2009. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. *Int J Food Microbiol* **130**, 77-87.

- Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S. y Loessner, M.J. 2009. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Appl Environ Microbiol* **75**, 93-100.
- Hammer, T.R., Mucha, H. y Hoefler, D. 2010. Infection risk by dermatophytes during storage and after domestic laundry and their temperature-dependent inactivation. *Mycopathologia* **171**, 43-49.
- Hankin, E.H. 1896. An outbreak of cholerae in an officer's Mess. *Br Med J* **2**, 1817-1819.
- Hannig, C., Hannig, M., Rehmer, O., Braun, G., Hellwig, E. y Al-Ahmad, A. 2007. Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel in situ. *Arch Oral Biol* **52**, 1048-1056.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. y Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res* **6**, 986-994.
- Hein, I., Lehner, A., Rieck, P., Klein, K., Brandl, E. y Wagner, M. 2001. Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. *Appl Environ Microbiol* **67**, 3122-3126.
- Heinzel, M., Kyas, A., Weide, M., Breves, R. y Bockmühl, D.P. 2010. Evaluation of the virucidal performance of domestic laundry procedures. *Int J Hyg Environ Health* **213**, 334-337.
- Hennessy, T.W., Hedberg, C.W., Slutsker, L., White, K.E., Besser-Wiek, J.M., Moen, M.E., Feldman, J., Coleman, W.W., Edmonson, L.M. y MacDonald, K.L. 1996. A national outbreak of *Salmonella enteritidis* infections from ice cream. *N Engl J Med* **334**, 1281-1286.
- Heringa, S.D., Kim, J.K., Jiang, X., Doyle, M.P. y Erickson, M.C. 2010. Biological control of *Salmonella* spp. in compost using a mixture of bacteriophages. *Appl Environ Microbiol*. published online.
- Herman, B. 1998. Fluorescence microscope optics. *Curr Protoc Cell Biol* **4**, 1-4.2.
- Hernández-Rodríguez, A. 2006. Aportaciones al estudio de la actividad antimicrobiana de los antisépticos y desinfectantes. 1-185.
- Hilton, A.C. y Austin, E. 2000. The kitchen dishcloth as a source of and vehicle for foodborne pathogens in a domestic setting. *Int J Environ Health Res* **10**, 257-261.
- Hirneisen, K.A., Black, E.P., Cascarino, J.L., Fino, V.R., Hoover, D.G. y Kniel, K.E. 2010. Viral Inactivation in Foods: A Review of Traditional and Novel Food-Processing Technologies. *CRFSFS* **9**, 3-20.
- Holah, J.T. 1995. Progress report on CEN/TC 216/Working Group 3: Disinfectant test methods for food hygiene, institutional, industrial and domestic applications. *Int Biodeterior Biodegrad* **36**, 355-365.
- Holah, J.T., Betts, R.P., Thorpe, R.H. 1989. The use of epifluorescence microscopy to determine surface hygiene. *International biodeterioration* **25**, 147-153.

- 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*. *J Appl Microbiol* **92**, 111S-120S.
- Holck, A. y Berg, J. 2009. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cooked ham by virulent bacteriophages and protective cultures. *Appl Environ Microbiol*. published online.
- Hudson, J.A., McIntyre, L., Billington, C., Sabour, P. y Griffiths, M. 2010. Bacteriophages in the control of food- and waterborne pathogens: Application of bacteriophages in control of pathogenic and spoilage bacteria in food processing and distribution. *Amer Society for Microbiology*. Nueva Zelanda.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). 2004. Microorganismos de los alimentos. *Acribia*. Zaragoza, España.
- Ishida, A., Yoshikawa, T., Nakazawa, T. y Kamidate, T. 2002. Enhanced firefly bioluminescence assay of ATP in the presence of ATP extractants by using diethylaminoethyl-dextran. *Anal Biochem* **305**, 236-241.
- Ivnitski, D., Abdel-Hamid, I., Atanasov, P. y Wilkins, E. 1999. Biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Biosens Bioelectron* **14**, 599-624.
- Johansson, I. y Somasundaran, P. 2007. Handbook for cleaning/decontamination of surfaces. *Elsevier*. Amsterdam, Holanda.
- Joux, F. y Lebaron, P. 2000. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microb Infect* **2**, 1523-1535.
- Kahraman, T., Cetin, O., Dumen, E. y Buyukunal, S.K. 2010. Incidence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on equipment surfaces and personnel hands in meat plants. *Revue Méd Vét* **161**, 108-113.
- Kangwansupamonkon, W., Lauruengtana, V., Surassmo, S. y Ruktanonchai, U. 2009. Antibacterial effect of apatite-coated titanium dioxide for textiles applications. *Nanomedicine* **5**, 240-249.
- Kastbjerg, V.G., Nielsen, D.S., Arneborg, N. y Gram, L. 2009. Response of *Listeria monocytogenes* to disinfection stress at the single-cell and population levels as monitored by intracellular pH measurements and viable-cell counts. *Appl Environ Microbiol* **75**, 4550-4556.
- Kathju, S., Nistico, L., Hall-Stoodley, L., Post, J.C., Ehrlich, G.D. y Stoodley, P. 2009. Chronic surgical site infection due to suture-associated polymicrobial biofilm. *Surgical Infections* **10**, 457-461.
- Kirk, O., Borchert, T.V. y Fuglsang, C.C. 2002. Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 345-351.
- Kramer, A., Schwebke, I. y Kampf, G. 2006. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis* **6**, 130.

- Kuda, T., Iwase, T., Yuphakhun, C., Takahashi, H., Koyanagi, T. y Kimura, B. 2011. Surfactant-disinfectant resistance of *Salmonella* and *Staphylococcus* adhered and dried on surfaces with egg compounds. *Food Microbiol* **28**, 920-925.
- Kushwaha, K. y Muriana, P.M. 2009. Adherence characteristics of *Listeria* strains isolated from three ready-to-eat meat processing plants. *J Food Prot* **72**, 2125-2131.
- 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. *Int J Food Microbiol* **85**, 227-236.
- Ladero, V., Calles-Enriquez, M., Fernandez, M. y Alvarez, A. 2010. Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition & Food Science* **6**, 145-156.
- Landete, J.M., de las Rivas, B., Marcobal, A. y Muñoz, R. 2007. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *Int J Food Microbiol* **117**, 258-269.
- Latorre, A.A., Van Kessel, J.S., Karns, J.S., Zurakowski, M.J., Pradhan, A.K., Boor, K.J., Jayarao, B.M., Houser, B.A., Daugherty, C.S. y Schukken, Y.H. 2010. Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *J Dairy Sci* **93**, 2792-2802.
- Lazcka, O., Campo, F. y Muñoz, F.X. 2007. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosens Bioelectron* **22**, 1205-1217.
- Lehtola, M.J., Miettinen, I.T., Hirvonen, A., Vartiainen, T. y Martikainen, P.J. 2007. Estimates of microbial quality and concentration of copper in distributed drinking water are highly dependent on sampling strategy. *Int J Hyg Environ Health* **210**, 725-732.
- Lelieveld, H.L., Mostert, M.A., Holah, J. y White, B. 2003. *Hygiene in food processing*. CRC Press LLC. Boca Raton FL., EE.UU.
- Lequette, Y., Boels, G., Clarisse, M. y Faille, C. 2010. Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. *Biofouling* **26**, 421-431.
- Leveau, J. y Bouix, M. 2002. Manual técnico de higiene, limpieza y desinfección. *Antonio Madrid Vicente*. Madrid, España.
- Leverentz, B., Conway, W.S., Alavidze, Z., Janisiewicz, W.J., Fuchs, Y., Camp, M.J., Chighladze, E. y Sulakvelidze, A. 2001. Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: a model study. *J Food Prot* **64**, 1116-1121.
- Leverentz, B., Conway, W.S., Camp, M.J., Janisiewicz, W.J., Abuladze, T., Yang, M., Saftner, R. y Sulakvelidze, A. 2003. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Appl Environ Microbiol* **69**, 4519-4526.
- Lichtman, J.W. y Conchello, J.A. 2005. Fluorescence microscopy. *Nat Methods* **2**, 910-919.
- Lignell, U., Meklin, T., Rintala, H., Hyvärinen, A., Vepsäläinen, A., Pekkanen, J. y Nevalainen, A. 2008. Evaluation of quantitative PCR and culture methods for detection of house dust fungi and streptomycetes in relation to moisture damage of the house. *Lett Appl Microbiol* **47**, 303-308.

- Lin, C.M., Takeuchi, K., Zhang, L., Dohm, C.B., Meyer, J.D., Hall, P.A. y Doyle, M.P. 2006. Cross-contamination between processing equipment and deli meats by *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* **69**, 71-79.
- Lindback, T., Rottenberg, M.E., Roche, S.M. y Rorvik, L.M. 2009. The ability to enter into an avirulent viable but non-culturable (VBNC) form is widespread among *Listeria monocytogenes* isolates from salmon, patients and environment. *Vet Res* **41**, 8.
- Lindsay, D. y Von Holy, A. 1997. Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms. *Food Microbiol* **14**, 383-390.
- Little, C. y Sagoo, S. 2009. Evaluation of the hygiene of ready-to-eat food preparation areas and practices in mobile food vendors in the UK. *Int J Environ Health Res* **19**, 431-443.
- Llewellyn, L.J., Evans, M.R. y Palmer, S.R. 1998. Use of sequential case-control studies to investigate a community *Salmonella* outbreak in Wales. *J Epidemiol Community Health* **52**, 272-276.
- Lo, S.V., Connolly, A.M., Palmer, S.R., Wright, D., Thomas, P.D. y Joynson, D. 1994. The role of the pre-symptomatic food handler in a common source outbreak of food-borne SRSV gastroenteritis in a group of hospitals. *Epidemiol Infect* **113**, 513-521.
- Loessner, M.J. y Busse, M. 1990. Bacteriophage typing of *Listeria* species. *Appl Environ Microbiol* **56**, 1912-1918.
- López, C. y Cavaco-Paulo, A. 2008. In-situ enzymatic generation of hydrogen peroxide for bleaching purposes. *Eng Life Sci* **8**, 315-323.
- López-Amorós, R., Mason, D. y Lloyd, D. 1995. Use of two oxonols and a fluorescent tetrazolium dye to monitor starvation of *Escherichia coli* in seawater by flow cytometry. *J Microbiol Methods* **22**, 165-176.
- Lu, T.K. y Collins, J.J. 2007. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *PNAS* **104**, 11197-11202.
- Lues, J.F.R. y Van Tonder, I. 2007. The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. *Food Control* **18**, 326-332.
- Lunden, 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. *J Food Prot* **65**, 1129-1133.
- Lynn, J.L. 2009. Encyclopedia of Chemical Technology: Detergency and Detergents. *Wiley Online Library*. Accesado: Noviembre 2011. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/0471238961.0405200512251414.a01.pub2>
- Lyytikäinen, O., Autio, T., Maijala, R., Ruutu, P., Honkanen-Buzalski, T., Miettinen, M., Hatakka, M., Mikkola, J., Anttila, V.J. y Johansson, T. 2000. An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland. *J Infect Dis* **181**, 1838-1841.
- Madigan, M.T., Guerrero, R., Barrachina, C. y Ruiz Berraquero, F. 2009. Brock biología de los microorganismos. *Pearson Educación*. Madrid, España.

- Maklon, K., Minami, A., Kusumoto, A., Takeshi, K., Thuy, N.T.B., Makino, S. y Kawamoto, K. 2010. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* from commercial asazuke (Japanese light pickles). *Int J Food Microbiol* **139**, 134-139.
- Marks, T. y Sharp, R. 2000. Bacteriophages and biotechnology: a review. *J Chem Technol Biotechnol* **75**, 6-17.
- Martin, B., Garriga, M. y Aymerich, T. 2011. Prevalence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* at small-scale spanish factories producing traditional fermented sausages. *J Food Prot* **74**, 812-815.
- Matias, J.C., Fonseca, J.M., Barata, I.G. y Brojo, F.M. 2013. HACCP and OHS: Can each one help improve the other in the catering sector? *Food Control* **30**, 240-250.
- McDonnell, G. y Russell, A. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* **12**, 147-179.
- McDougald, D., Rice, S.A., Weichart, D. y Kjelleberg, S. 1998. Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiol Ecol* **25**, 1-10.
- McFeters, G.A., Yu, F.P., Pyle, B.H. y Stewart, P.S. 1995. Physiological assessment of bacteria using fluorochromes. *J Microbiol Methods* **21**, 1-13.
- McKillop, A. y Sanderson, W.R. 2000. Sodium perborate and sodium percarbonate: further applications in organic synthesis. *J Chem Soc, Perkin Trans* **2000**, 471-476.
- Michaels, B., Keller, C., Blevins, M., Paoli, G., Ruthman, T., Todd, E. y Griffith, C.J. 2004. Prevention of food worker transmission of foodborne pathogens: risk assessment and evaluation of effective hygiene intervention strategies. *Food Service Technology* **4**, 31-49.
- Mohd Syaifudin, A.R., Jayasundera, K.P. y Mukhopadhyay, S.C. 2009. A low cost novel sensing system for detection of dangerous marine biotoxins in seafood. *Sensors Actuators B: Chem* **137**, 67-75.
- Moore, G. y Griffith, C. 2002. A comparison of surface sampling methods for detecting coliforms on food contact surfaces. *Food Microbiol* **19**, 65-73.
- Moore, G. y Griffith, C. 2006. A laboratory evaluation of the decontamination properties of microfibre cloths. *J Hosp Infect* **64**, 379-385.
- Moore, G. y Griffith, C. 2007. Problems associated with traditional hygiene swabbing: the need for in-house standardization. *J Appl Microbiol* **103**, 1090-1103.
- Møretrø, T., Heir, E., Mo, K.R., Habimana, O., Abdelgani, A. y Langsrud, S. 2010. Factors affecting survival of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* on abiotic surfaces. *Int J Food Microbiol* **138**, 71-77.
- Morgan, D., Newman, C., Hutchinson, D., Walker, A., Rowe, B. y Majid, F. 1993. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiol Infect* **111**, 181-187.

- Mostert, M.A., Holah, J. y Lelieveld, H.L. 2005. Handbook of hygiene control in the food industry. *Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC*, Cambridge, Reino Unido.
- Naidoo, K. y Lindsay, D. 2010. Potential cross-contamination of the ready-to-eat dried meat product, *biltong*. *Br Food J* **112**, 350-363.
- Nayak, M., Kotian, A., Marathe, S. y Chakravortty, D. 2009. Detection of microorganisms using biosensors-A smarter way towards detection techniques. *Biosens Bioelectron* **25**, 661-667.
- Newell, D.G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., Langelaar, M., Threlfall, J. y Scheutz, F. 2010. Food-borne diseases-The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int J Food Microbiol* **139**, S3-S15.
- Nugen, S.R. y Baeumner, A.J. 2008. Trends and opportunities in food pathogen detection. *Anal Bioanal Chem* **391**, 451-454.
- Oliveira, K., Oliveira, T., Teixeira, P., Azeredo, J. y Oliveira, R. 2007. Adhesion of *Salmonella* Enteritidis to stainless steel surfaces. *Brazilian J Microbiol* **38**, 318-323.
- Oliver, J.D. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* **43**, 93-100.
- Oliver, S.P., Jayarao, B.M. y Almeida, R.A. 2005. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathog Dis* **2**, 115-129.
- Onal, A. 2007. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chem* **103**, 1475-1486.
- O'Toole, J., Sinclair, M. y Leder, K. 2009. Transfer rates of enteric microorganisms in recycled water during machine clothes washing. *Appl Environ Microbiol* **75**, 1256-1263.
- Oulahal, N., Brice, W., Martial, A. y Degraeve, P. 2008. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. *Food Control* **19**, 178-185.
- Pagadala, S., Parveen, S., Rippen, T., Luchansky, J.B., Call, J.E., Tamplin, M.L. y Porto-Fett, A. 2012. Prevalence, characterization and sources of *Listeria monocytogenes* in blue crab (*Callinectes sapidus*) meat and blue crab processing plants. *Food Microbiol*, 1-8.
- Park, S.H., Cheon, H.L., Park, K.H., Chung, M.S., Choi, S.H., Ryu, S. y Kang, D.H. 2011. Inactivation of biofilm cells of foodborne pathogen by aerosolized sanitizers. *Int J Food Microbiol* **154**, 130-134.
- Patel, S., Murray-Leonard, J. y Wilson, A. 2006. Laundering of hospital staff uniforms at home. *J Hosp Infect* **62**, 89-93.
- Pearce, R.A., Sheridan, J.J. y Bolton, D.J. 2006. Distribution of airborne microorganisms in commercial pork slaughter processes. *Int J Food Microbiol* **107**, 186-191.
- Peeters, E., Nelis, H.J. y Coenye, T. 2008. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods* **72**, 157-165.

- Peighambardoust, S.H., Dadpour, M.R. y Dokouhaki, M. 2010. Application of epifluorescence light microscopy (EFLM) to study the microstructure of wheat dough: a comparison with confocal scanning laser microscopy (CSLM) technique. *J Cereal Sci* **51**, 21-27.
- Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Carrasco, E., García, R.M. y Zurera, G. 2008. Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. *Trends Food Sci Technol* **19**, 131-144.
- Petty, H.R. 2007. Fluorescence microscopy: Established and emerging methods, experimental strategies, and applications in immunology. *Microsc Res Tech* **70**, 687-709.
- Pottage, T., Richardson, C., Parks, S., Walker, J.T. y Bennett, A.M. 2010. Evaluation of hydrogen peroxide gaseous disinfection systems to decontaminate viruses. *J Hosp Infect* **74**, 55-61.
- Poulis, J., De Pijper, M., Mossel, D. y Dekkers, P.P. 1993. Assessment of cleaning and disinfection in the food industry with the rapid ATP-bioluminescence technique combined with the tissue fluid contamination test and a conventional microbiological method. *Int J Food Microbiol* **20**, 109-116.
- Raffellini, S., Schenk, M., Guerrero, S. y Alzamora, S.M. 2010. Kinetics of *Escherichia coli* inactivation employing hydrogen peroxide at varying temperatures, pH and concentrations. *Food Control* **22**, 920-932.
- Ramos, J.L., Gallegos, M.T., Marqués, S., Ramos-Gonzalez, M.I., Espinosa-Urgel, M. y Segura, A. 2001. Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. *Curr Opin Microbiol* **4**, 166-171.
- Ravishankar, S., Zhu, L. y Jaroni, D. 2010. Assessing the cross contamination and transfer rates of *Salmonella enterica* from chicken to lettuce under different food-handling scenarios. *Food Microbiol* **27**, 791-794.
- Rayner, J., Veeh, R. y Flood, J. 2004. Prevalence of microbial biofilms on selected fresh produce and household surfaces. *Int J Food Microbiol* **95**, 29-39.
- Redmond, E.C. y Griffith, C.J. 2009. The importance of hygiene in the domestic kitchen: Implications for preparation and storage of food and infant formula. *J R Soc Health* **129**, 69-76.
- Reichert-Schwillinsky, F., Pin, C., Dzieciol, M., Wagner, M. y Hein, I. 2009. Stress-and growth rate-related differences between plate count and real-time PCR data during growth of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **75**, 2132-2138.
- Reij, M.W. y Den Aantrekker, E.D. 2004. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *Int J Food Microbiol* **91**, 1-11.
- Reischl, U., Wittwer, C. y Cockerill, F. 2002. Rapid cycle real-time PCR: methods and applications: microbiology and food analysis. *Springer*. Berlín, Alemania.
- Rinsoz, T., Duquenne, P., Greff-Mirguet, G. y Oppliger, A. 2008. Application of real-time PCR for total airborne bacterial assessment: Comparison with epifluorescence microscopy and culture-dependent methods. *Atmos Environ* **42**, 6767-6774.

- Rowe, B., Hutchinson, D., Gilbert, R., Hales, B., Begg, N., Dawkins, H., Jacob, M., Rae, F. y Jepson, M. 1987. *Salmonella* ealing infections associated with consumption of infant dried milk. *The Lancet* **330**, 900-903.
- Rozema, E.A., Stephens, T.P., Bach, S.J., Okine, E.K., Johnson, R.P., Stanford, K. y McAllister, T.A. 2009. Oral and rectal administration of bacteriophages for control of *Escherichia coli* O157: H7 in feedlot cattle. *J Food Prot* **72**, 241-250.
- Russell, A.D. 1997. Plasmids and bacterial resistance to biocides. *J Appl Microbiol* **83**, 155-165.
- Russell, A.D. 2004. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. *J Hosp Infect* **57**, 97-104.
- Russo, P., Spano, G., Arena, M.P., Capozzi, V., Fiocco, D., Grieco, F. y Beneduce, L. 2010 Are consumers aware of the risks related to Biogenic Amines in food? *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* **2**, 1087-1095.
- Sachidanandham, R., Gin, K.Y.H. y Poh, C.L. 2005. Monitoring of active but non-culturable bacterial cells by flow cytometry. *Biotechnol Bioeng* **89**, 24-31.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. y Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sakiyama, T., Toyomasu, T., Nagata, A., Imamura, K., Takahashi, T., Nagai, T. y Nakanishi, K. 1998. Performance of protease as a cleaning agent for stainless steel surfaces fouled with protein. *J Ferment Bioeng* **85**, 297-301.
- Salo, S., Laine, A., Alanko, T., Sjoberg, A.M. y Writanen, G. 2000. Validation of the microbiological methods Hygicult dipslide, contact plate, and swabbing in surface hygiene control: a Nordic collaborative study. *J AOAC Int* **83**, 1357-1365.
- Sattar, S.A., Springthorpe, S., Mani, S., Gallant, M., Nair, R.C., Scott, E. y Kain, J. 2001. Transfer of bacteria from fabrics to hands and other fabrics: development and application of a quantitative method using *Staphylococcus aureus* as a model. *J Appl Microbiol* **90**, 962-970.
- Schmidt, K. y Gervelmeyer, A. 2003. WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe—8th Report 1999–2000. Accesado: Abril 2013. Disponible en: http://www.bfr.bund.de/internet/8threport/8threp_fr.htm
- Scott, E. 2000. Relationship between cross-contamination and the transmission of foodborne pathogens in the home. *Pediatr Infect Dis J* **19**, S111-S113.
- Scott, E., Duty, S. y Callahan, M. 2008. A pilot study to isolate *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* from environmental surfaces in the home. *Am J Infect Control* **36**, 458-460.
- 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. *J Food Prot* **67**, 864-869.

- Shapiro, H.M. 2005. Practical flow cytometry. *Wiley-Liss*. New Jersey, EE.UU.
- Sharma, M., Patel, J.R., Conway, W.S., Ferguson, S. y Sulakvelidze, A. 2009. Effectiveness of bacteriophages in reducing *Escherichia coli* O157: H7 on fresh-cut cantaloupes and lettuce. *J Food Prot* **72**, 1481-1485.
- Sharma, M., Ryu, J.H. y Beuchat, L. 2005. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in biofilm on stainless steel by treatment with an alkaline cleaner and a bacteriophage. *J Appl Microbiol* **99**, 449-459.
- Shi, X. y Zhu, X. 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends Food Sci Technol* **20**, 407-413.
- Silva, S., Teixeira, P., Oliveira, R. y Azeredo, J. 2008. Adhesion to and viability of *Listeria monocytogenes* on food contact surfaces. *J Food Prot* **71**, 1379-1385.
- Simões, M., Simões, L.C. y Vieira, M.J. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology* **43**, 573-583.
- Sivakumar, P.M., Balaji, S., Prabhawathi, V., Neelakandan, R., Manoharan, P.T. y Doble, M. 2010. Effective antibacterial adhesive coating on cotton fabric using ZnO nanorods and chalcone. *Carbohydr Polym* **79**, 717-723.
- Soni, K.A. y Nannapaneni, R. 2010a. Bacteriophage significantly reduces *Listeria monocytogenes* on raw salmon fillet tissue. *J Food Prot* **73**, 32-38.
- Soni, K.A. y Nannapaneni, R. 2010b. Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms with Bacteriophage P100. *J Food Prot* **73**, 1519-1524.
- Sousa, C., Teixeira, P. y Oliveira, R. 2009. Influence of surface properties on the adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to acrylic and silicone. *Int Natl J Biomater* **2009**, 1-9.
- Stocks, S.M. 2004. Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight. *Cytometry A* **61**, 189-195.
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z. y Morris, J.G. 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 649-659.
- Suller, M.T. y Lloyd, D. 1999. Fluorescence monitoring of antibiotic-induced bacterial damage using flow cytometry. *Cytometry* **35**, 235-241.
- Sutherland, I.W., Hughes, K.A., Skillman, L.C. y Tait, K. 2004. The interaction of phage and biofilms. *FEMS Microbiol Lett* **232**, 1-6.
- Swaminathan, B. y Gerner-Smidt, P. 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect* **9**, 1236-1243.
- Tait, K., Skillman, L. y Sutherland, I. 2002. The efficacy of bacteriophage as a method of biofilm eradication. *Biofouling* **18**, 305-311.

- Takahashi, H., Kuramoto, S., Miya, S. y Kimura, B. 2010. Desiccation survival of *Listeria monocytogenes* and other potential foodborne pathogens on stainless steel surfaces is affected by different food soils. *Food Control* **22**, 633-637.
- 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. *J Appl Microbiol* **87**, 718-725.
- Teufel, L., Pipal, A., Schuster, K., Staudinger, T. y Redl, B. 2009. Material-dependent growth of human skin bacteria on textiles investigated using challenge tests and DNA genotyping. *J Appl Microbiol* **108**, 450-461.
- Teufel, L. y Redl, B. 2006. Improved methods for the investigation of the interaction between textiles and microorganisms. *Lenzinger Berichte* **85**, 54-60.
- Teufel, L., Schuster, K.C., Merschak, P., Bechtold, T. y Redl, B. 2008. Development of a fast and reliable method for the assessment of microbial colonization and growth on textiles by DNA quantification. *J Mol Microbiol Biotechnol* **14**, 193-200.
- Tirado, C. y Schmidt, K. 2001. WHO surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications: Preliminary results and trends across greater Europe. World Health Organization. *J Infect* **43**, 80-84.
- Todd, E.C., Greig, J.D., Bartleson, C.A. y Michaels, B.S. 2008. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 5. Sources of contamination and pathogen excretion from infected persons. *J Food Prot* **71**, 2582-2595.
- Todd, E.C., Greig, J.D., Bartleson, C.A. y Michaels, B.S. 2009. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 6. Transmission and survival of pathogens in the food processing and preparation environment. *J Food Prot* **72**, 202-219.
- Todd, E.C., Michaels, B.S., Greig, J.D., Smith, D. y Bartleson, C.A. 2010a. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 8. Gloves as barriers to prevent contamination of food by workers. *J Food Prot* **73**, 1762-1773.
- Todd, E.C., Michaels, B.S., Greig, J.D., Smith, D., Holah, J. y Bartleson, C.A. 2010b. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 7. Barriers to reduce contamination of food by workers. *J Food Prot* **73**, 1552-1565.
- Tomás, I., GarcíaCaballero, L., Cousido, M.C., Limeres, J., Álvarez, M. y Diz, P. 2009. Evaluation of chlorhexidine substantivity on salivary flora by epifluorescence microscopy. *Oral Dis* **15**, 428-433.
- Tompkin, R.B. 2002. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *J Food Prot* **65**, 709-725.
- Traoré, O., Springthorpe, V.S. y Sattar, S.A. 2002. A quantitative study of the survival of two species of *Candida* on porous and non-porous environmental surfaces and hands. *J Appl Microbiol* **92**, 549-555.

Unión Europea. 2005. Reglamento (CE) no 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (Texto pertinente a efectos del EEE). *Diario Oficial de la Unión Europea* **2073/2005**, L338/1-L338/26.

USDA. 2011. Fact Sheets: Foodborne Illness: What Consumers Need to Know. *USDA*.
Accesado: Abril 2011. Disponible en:
http://www.fsis.usda.gov/Fact_Sheets/Foodborne_Illness_What_Consumers_Need_to_Know/index.asp.

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. *Lett Appl Microbiol* **37**, 386-391.

Valentine, N.B., Butcher, M.G., Su, Y., Jarman, K.H., Matzke, M., Webb-Robertson, B.J., Panisko, E.A., Seiders, B.A.B. y Wahl, K.L. 2008. Evaluation of sampling tools for environmental sampling of bacterial endospores from porous and nonporous surfaces. *J Appl Microbiol* **105**, 1107-1113.

Van Egmond, H.P., Schothorst, R.C. y Jonker, M.A. 2007. Regulations relating to mycotoxins in food. *Anal Bioanal Chem* **389**, 147-157.

Van Houdt, R. y Michiels, C.W. 2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J Appl Microbiol* **109**, 1117-1131.

Vasconcellos, J.A. 2004. Quality assurance for the food industry :a practical approach. *CRC Press*. Boca Raton FL., EE.UU.

Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J. y Kreft, J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* **14**, 584-640.

Vilar, M., Rodriguez-Otero, J., Diéguez, F., Sanjuan, M. y Yus, E. 2008. Application of ATP bioluminescence for evaluation of surface cleanliness of milking equipment. *Int J Food Microbiol* **125**, 357-361.

Vogel, B.F., Hansen, L.T., Mordhorst, H. y Gram, L. 2010. The survival of *Listeria monocytogenes* during long term desiccation is facilitated by sodium chloride and organic material. *Int J Food Microbiol* **140**, 192-200.

Votyakova, T.V., Kaprelyants, A.S. y Kell, D.B. 1994. Influence of viable cells on the resuscitation of dormant cells in *Micrococcus luteus* cultures held in an extended stationary phase: the population effect. *Appl Environ Microbiol* **60**, 3284-3291.

White, J.G., Amos, W.B. y Fordham, M. 1987. An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. *J Cell Biol* **105**, 41-48.

Whitehead, K.A., Benson, P. y Verran, J. 2009. Differential fluorescent staining of *Listeria monocytogenes* and a whey food soil for quantitative analysis of surface hygiene. *Int J Food Microbiol* **135**, 75-80.

- WHO. 2002. WHO global strategy for food safety: safer food for better health. Accesado: Mayo 2011. Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/publications/general/en/strategy_es.pdf
- WHO. 2007. Fact sheet N°237: Food safety and foodborne illness. Accesado: Mayo 2011. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/index.html>
- Wieprecht, T., Hazenkamp, M., Rohwer, H., Schlingloff, G. y Xia, J. 2007. Design and application of transition metal catalysts for laundry bleach. *C R Chimie* **10**, 326-340.
- Wildbrett, G. 2000. Limpieza y desinfección en la industria alimentaria. *Acribia*. Zaragoza, España.
- Wilhelm, J. y Pingoud, A. 2003. Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem* **4**, 1120-1128.
- Willey, J.M., Sherwood, L., Woolverton, C.J., Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., Gibert, I. y Ruiz-Berraquero, F. 2009. Microbiología de Prescott, Harley y Klein. *McGraw-Hill*. Madrid, España.
- Wong, L. y Amy, C. 1998. Biofilms in food processing environments. *J Dairy Sci* **81**, 2765-2770.
- Yang, H., Kendall, P.A., Medeiros, L.C. y Sofos, J.N. 2009. Efficacy of sanitizing agents against *Listeria monocytogenes* biofilms on high-density polyethylene cutting board surfaces. *J Food Prot* **72**, 990-998.
- Yu, Y., Zhao, J. y Bayly, A.E. 2008. Development of surfactants and builders in detergent formulations. *Chin J Chem Eng* **16**, 517-527.
- Yuste, R. 2005. Fluorescence microscopy today. *Nat Methods* **2**, 902-904.
- Zorman, T. y Jeršek, B. 2008. Assessment of bioaerosol concentrations in different indoor environments. *Indoor Built Environ* **17**, 155-163.

IX. Anexo

Publicación

Use of epifluorescence microscopy to assess the effectiveness of phage P100 in controlling *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel surfaces. Febrero 2012. Montañez-Izquierdo, V.Y., Salas-Vázquez, D.I. y Rodríguez-Jerez, J.J. *Food Control*. 23(2): 470 – 477.

Congresos

Disinfecting effect of standard laundry washing against *Candida albicans* in textile fabrics. 21 al 23 de Noviembre de 2012. Montañez-Izquierdo, V.Y., Salas-Vázquez, D.I. y Rodríguez-Jerez, J.J. *II International Conference on Antimicrobial Research - ICAR2012*. Póster. Lisboa – Portugal.

Formación de biofilms en la industria alimentaria. Detección de su formación por técnicas rápidas, nuevos enfoques para su control y eliminación. 20 de Enero de 2011. Montañez-Izquierdo, V.Y. *Jornadas Técnicas de Detección, Control y Eliminación de Biofilms en la Industria Alimentaria*. Comunicación oral. Girona – España.

Effectiveness of phage P100 in controlling *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel surfaces. 10 al 12 de Noviembre del 2010. Montañez-Izquierdo, V.Y., Salas-Vázquez, D.I. y Rodríguez-Jerez, J.J. *2010 EFFoST Annual Meeting – Food and Health*. Póster. Dublín – Irlanda.

Aplicación de bacteriófagos como sistema de control de microorganismos patógenos en la industria alimentaria. 01 al 02 de Octubre de 2009. Rodríguez-Jerez, J.J. y Montañez-Izquierdo, V.Y. *6ª Reunión de la Sociedad Española de Seguridad Alimentaria. Alimentación y Salud*. Comunicación oral. Logroño - España.