



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TESIS DOCTORAL

Título
Evolución de la contaminación de superficies durante los procesos productivos en pymes del sector cárnico
Autor/es
Juan Carlos Álvarez Gurrea
Director/es
Susana Sanz Cervera y José Juan Rodríguez Jerez
Facultad
Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática
Titulación
Departamento
Agricultura y Alimentación
Curso Académico
2014-2015



Evolución de la contaminación de superficies durante los procesos productivos en pymes del sector cárnico, tesis doctoral de Juan Carlos Álvarez Gurrea, dirigida por Susana Sanz Cervera y José Juan Rodríguez Jerez (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

© El autor
© Universidad de La Rioja, Servicio de Publicaciones, 2015
publicaciones.unirioja.es
E-mail: publicaciones@unirioja.es



**UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA**

**EVOLUCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN DE SUPERFICIES
DURANTE LOS PROCESOS PRODUCTIVOS EN PYMES
DEL SECTOR CÁRNICO**

Juan Carlos Álvarez Gurrea

Tesis Doctoral

Memoria presentada al Departamento de Agricultura y Alimentación de la
Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática de la
Universidad de La Rioja

Para optar al grado de **Doctor por la Universidad de La Rioja**

Trabajo dirigido por

Susana Sanz Cervera

Departamento de Agricultura y Alimentación. Facultad de Ciencias, Estudios
Agroalimentarios e Informática. Universidad de La Rioja

José Juan Rodríguez Jerez

Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària.
Universitat Autònoma de Barcelona

Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática

Logroño, Septiembre de 2015

SUSANA SANZ CERVERA, profesora titular del área de Tecnología de los Alimentos del Departamento de Agricultura y Alimentación de la Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática de la Universidad de La Rioja

y

JOSÉ JUAN RODRÍGUEZ JEREZ, profesor titular del área de Nutrición y Bromatología del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Universitat Autònoma de Barcelona

HACEN CONSTAR:

Que la memoria titulada “EVOLUCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN DE SUPERFICIES DURANTE LOS PROCESOS PRODUCTIVOS EN PYMES DEL SECTOR CÁRNICO”, presentada por Juan Carlos Álvarez Gurrea para optar al grado de Doctor por la Universidad de La Rioja, 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 Logroño, a 11 de Septiembre de 2015.

Susana Sanz Cervera

José Juan Rodríguez Jerez

Agradecimientos

A mi madre, María, ejemplo de trabajo y entrega, paladín de humildad y bondad.

A mi padre fallecido, Guillermo, huellas de primera infancia.

A mi esposa, Pilar, artífice de esta loca aventura, ventura de esta locura.

A mis hijos, Pablo y María, el Universo. Origen de las mayores preocupaciones y alegrías.

A mis hermanos, sus hijos y los hijos de sus hijos, almas compartidas.

A toda mi familia, viñetas entrañables de vida.

A mis amigos, vuelos de entretiempo. Mesa, zapatilla, viaje, charla, risas, acordes y canto.

A la Dra. Susana Sanz y al Dr. José Juan Rodríguez, sabiduría, abrigo, apoyo y confianza.

A las empresas que han colaborado en nuestro proyecto, hogares de trabajo.

A los laboratorios que nos han acompañado en el viaje, talleres de ciencia.

RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) se deben a la ingestión de alimentos contaminados por microorganismos o sustancias químicas. Abarcan un amplio espectro de dolencias, la más común la asociada con problemas gastrointestinales, y constituyen un importante problema de salud pública, pues también se ocasionan síntomas neurológicos, ginecológicos, inmunológicos u otros, que pueden llevar al paciente incluso la muerte. El crecimiento de la población y el traslado masivo de personas, junto con la aparición de nuevos alimentos e ingredientes y de nuevas tendencias de consumo (basadas en especial en la comida rápida), son algunos de los factores que han ayudado tanto al aumento del porcentaje de personas que han padecido una ETA, como a la aparición de nuevas enfermedades alimentarias.

La contaminación de los alimentos puede producirse en cualquier etapa de la producción, de la cadena de almacenamiento y distribución o de la conservación y preparación hasta su consumo. A nivel industrial, sabemos que para prevenir la contaminación, han de detallarse y respetarse adecuadamente las instrucciones operativas de los procesos y de las actividades de limpieza y desinfección, y aplicarse una serie de metodologías de previsión y control de la contaminación estandarizadas, en especial un adecuado APPCC (Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico).

La presencia de biofilms en las superficies de trabajo de las industrias es la principal causa de contaminación de los alimentos distinta de la, en el caso de los productos cárnicos, derivada de trabajar con animales vivos para la obtención posterior de la carne. Los biofilms adheridos a superficies, son agrupaciones de microorganismos que generan sustancias poliméricas extracelulares que los recubren, protegiéndolos de las condiciones ambientales adversas y de la agresión de detergentes y desinfectantes. Así pues, mantener las superficies de contacto con el alimento en un estado higiénico óptimo, es de vital importancia para evitar o minimizar la contaminación de los productos que se pondrán en venta. Para ello, es imprescindible la adecuada definición y la correcta aplicación de un Programa de Limpieza y Desinfección. El propósito de este es la destrucción de microorganismos patógenos en las superficies y en el medio que las rodea, y la reducción considerable de los microorganismos alterantes de los alimentos, evitando la remanencia de microorganismos, libres o conformando biofilms, en las superficies.

Se han asignado muchos recursos y esfuerzos para estudiar sistemáticas y productos para la higienización de las industrias, y metodologías para la toma de muestras de superficies higienizadas y el análisis de las mismas para evaluar la posible existencia de contaminación. En cambio, apenas se han desarrollado estudios que evalúen qué ocurre en tales superficies con el

transcurso del tiempo en la jornada de trabajo, olvidando que, aunque podamos iniciar nuestras operaciones de producción en condiciones asépticas, la propia carga contaminante de algunos alimentos, como las carnes, puede ser recogida por las superficies donde se trabajan y ser transmitida a otros alimentos que se coloquen después allí.

Considerando esto, en nuestro estudio hemos llevado a cabo, en una primera fase, por un lado una revisión del estado de las superficies higienizadas en una serie de PyMEs (mataderos, salas de despiece y fábricas de embutidos), además de evaluar las metodologías de limpieza y desinfección, y, por otro lado, una evaluación de la contaminación de las superficies a mitad de jornada y, en algún caso, al finalizar la jornada, con objeto de conocer si son precisas medidas de corrección de la posible contaminación de las superficies durante intermedios o paros de las actividades productivas. En todos los casos se analizaron aerobios mesófilos, enterobacterias, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*. Como resultado de nuestro estudio se han obtenido datos que indican que, a pesar de no existir una selección rigurosa de los productos de limpieza y desinfección en tales PyMEs, ni una formación exhaustiva del personal limpiador para garantizar una aplicación estricta de las metodologías establecidas, los resultados de los análisis sobre superficies higienizadas no son malos cuando son evaluadas mediante muestreo convencional con hisopos. También hemos visto que la acumulación de contaminación, o el crecimiento de la misma durante el transcurso de la jornada, en las superficies de trabajo donde se da una renovación continua de los alimentos que allí se apoyan, conduce a valores microbiológicos muy elevados en la mayoría de los casos, y que en virtud de ello es, si no imprescindible, sí altamente aconsejable establecer medidas de limpieza intermedias, al menos a media jornada. Se orienta en nuestro estudio sobre la posibilidad de establecer algunas de ellas, eminentemente prácticas y sencillas, para evitar el deterioro de la calidad de los productos elaborados en las últimas horas.

En la segunda parte de nuestro estudio, hemos tomado dos superficies clásicas de las industrias de trabajo con carnes, dos tablas de corte, para analizarlas mediante metodología más actualizada que permita recoger la contaminación de la muestra de un modo mucho más riguroso que el muestreo mediante hisopos (para el que muchos estudios indican una eficacia de recogida de la contaminación existente siempre inferior al 30%). Tales tablas (recién retiradas de las empresas una vez aplicados los procedimientos de limpieza y desinfección habituales), se evaluaron mediante microscopía de epifluorescencia directa (DEM). Los resultados obtenidos revelan la existencia de importantes cantidades de carga orgánica y de biofilms en tales elementos, a pesar de que, analizados mediante toma de muestra con hisopos, no sean sospechosos de contener tan elevada contaminación.

ABSTRACT

Diseases transmitted by foods are due to ingestion of contaminated foods by microorganisms or chemical substances. They cover a wide spectrum of sickness, the most common is that one associated with gastrointestinal problems, and they constitute an important public health problem, as neurological, gynaecological, immunological or other symptoms that can even take the patient to death are also caused. Population growth and massive movement of people, together with new foods and ingredients and new consumption trends (based especially on fast food) appearance, are some of the factors which have helped to increase the percentage of people who have suffered a foodborne disease, as well as appearance of new foodborne diseases.

Foods contamination can be produced in any stage of production, storage and distribution chain or conservation and preparation until its consumption. On the industrial level, we know that in order to prevent contamination, operating instructions of the processes and cleaning and disinfection activities have to be detailed and respected, and some standardised methodologies of prediction and control of contamination must be applied, especially a suitable HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point).

Biofilm presence in work surfaces of factories is the main cause of foods contamination apart from the one that come from working with alive animals for meat extraction, in case of meat products. Biofilms stuck on surfaces, are groups of microorganisms that generate extra-cellular polymeric substances which cover them, protecting them from unfavourable environmental conditions and from detergents and disinfectants attack. So maintaining surfaces in contact with foods in an optimal hygienic condition is of vital importance in order to avoid or minimise products contamination. To do this, it is indispensable a suitable definition and a correct implementation of a Cleaning and Disinfection Programme. The purpose of this is the destruction of pathogenic microorganisms in the surfaces and the medium that surround them, and the considerable reduction of microorganisms that damage foods, avoiding the existence of microorganisms, free or making up biofilms, in the surfaces.

Many resources and efforts have been allocated to study systematics and products for cleaning of factories, and methodologies for sample gathering of hygienized surfaces and their analysis in order to evaluate the possible existence of microbiological contamination. However, studies that evaluate what happens in such surfaces with the passing of time in a work day have been barely developed, forgetting that, although we can start our production operations in aseptic conditions,

microbiological contamination of some foods themselves, as meat, can be collected by surfaces where they are worked and be transmitted to other foods that are placed there later.

Taking this into account, in our study we have carried out, in a first stage, on the one hand an inspection of the hygienized surfaces in a series of small and medium enterprises (slaughterhouses, quartering rooms and cured cold meat factories), besides evaluate cleaning and disinfection methodologies, and, on the other hand, an evaluation of surfaces contamination in the middle of the work day and, in some cases, at the end of the work day, in order to know if correction measures of the possible contamination in surfaces during production activities strikes are accurate. In all cases mesophilic aerobics, enterobacter, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* were analysed. As a result of our study, we have obtained data that indicate that, despite the absence of a rigorous selection of cleaning and disinfection products in such companies, or an exhaustive training of the cleaning personnel to guarantee a strict implementation of the established methodologies, analysis results on hygienized surfaces are not bad when they are evaluated by common sampling with cotton buds. We have also seen that accumulation of contamination or its increment in the course of the work day, in surfaces in which take place a continuous renovation of the foods supported there, lead to very high microbiological values in most cases, and by virtue of that it is highly recommended to establish intermediate cleaning measures, at least part-time. We show in our study the possibility of implementation of some of them, practical and easy, to avoid quality of products made in the last hours deterioration.

In the second part of our study, we have taken two classic surfaces of meat work factories, two cutting boards, to analyse them by updated methodologies that allow us collecting the sample contamination in a much more rigorous way than sampling with cotton buds (for which many studies indicate an effectiveness of existing contamination collection always below 30 %). Such boards (recently withdrawn from companies once applied cleaning and disinfection usual procedures) were evaluated by direct epifluorescent microscopy (DEM). Results obtained reveal the existence of important amounts of organic contamination and biofilms in such elements, even though, analysed by sample gathering with cotton buds, they are not suspicious of containing so high contamination.

CONTENIDOS Y ABREVIATURAS



R_c	cR
Zn	Zn
Aq	αA
CE	EC
BPF	FPB
ATP	PTA
ALOA	AOLA
3g/V	V/B
ANICE	ECINA
APPCC	CCPPA
ANOVA	AVONA

CONTENIDOS

0.1. LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	1
0.2. LISTA DE FIGURAS	4
0.3. LISTA DE TABLAS	8
I. INTRODUCCIÓN	13
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	19
1. El sector cárnico español	19
2. Seguridad alimentaria. Toxiinfecciones y contaminación microbiana de los alimentos. Enfermedades de origen alimentario relacionadas con la industria cárnica	22
2.1. Importancia de la seguridad alimentaria	22
2.2. Toxiinfecciones y enfermedades transmitidas por alimentos	23
2.3. Principales microorganismos patógenos relacionados con carnes y productos cárnicos	26
2.3.1. <i>Campylobacter</i>	29
2.3.2. <i>Salmonella</i>	30
2.3.3. <i>Listeria monocytogenes</i>	31
2.3.4. <i>Escherichia coli</i>	32
2.3.5. <i>Yersinia</i>	33
2.3.6. <i>Clostridium</i>	33
2.3.7. <i>Staphylococcus aureus</i>	35
2.4. Contaminación fúngica en ambientes de procesado de alimentos cárnicos	36
3. Implicación de la contaminación cruzada en las Enfermedades de Transmisión Alimentaria	38
4. Superficies alimentarias	42
4.1. Requerimientos de las superficies alimentarias	43
5. Higienización en la industria alimentaria. El problema de los Biofilms	46
5.1. Limpieza	52
5.2. Desinfección	54
5.2.1. Requisitos de los desinfectantes	56
5.2.2. Tipos de desinfectantes en la industria alimentaria	57
5.3. Importancia del secado	61
6. Adherencia bacteriana en superficies alimentarias. Biofilms	62
6.1. Biofilms	62
6.2. Implicaciones de la formación del biofilm	65
6.3. Formación del biofilm	66
7. Resistencia bacteriana	70

7.1. Resistencia bacteriana intrínseca	71
7.2. Resistencia microbiana adquirida	78
8. Métodos de verificación para el control microbiológico e higiénico de las superficies	78
8.1. Inspección visual	79
8.2. Métodos clásicos de laboratorio	79
8.2.1. Hisopado o esponjado	79
8.2.2. Aplicación-impronta	80
8.2.3. Aguas de enjuague	81
8.2.4. Extracción de microorganismos de fracciones de superficies	81
8.3. Aplicación de métodos rápidos	82
8.3.1. Sistema automatizado TEMPO	83
8.3.2. Microscopía de epifluorescencia directa	84
8.3.3. Pruebas inmunológicas	87
8.3.4. Pruebas enzimáticas	87
8.3.4.1. Principio de bioluminiscencia	88
8.3.4.2. Ventajas y limitaciones	88
8.3.5. Métodos basados en la amplificación molecular	89
8.3.5.1. PCR convencional	90
8.3.5.1.1. Limitaciones de la PCR convencional	91
8.3.5.2. PCR en tiempo real	91
8.3.5.2.1. Introducción del control interno de amplificación	92
8.3.5.2.2. Ventajas y limitaciones de la PCR en tiempo real	92
8.3.6. Espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR)	94
8.3.7. Medidas eléctricas. Impedancia	96
8.3.8. Métodos rápidos orientativos	97
9. Diseño de industrias y superficies de contacto con los alimentos. Nuevos enfoques para reducir la carga microbiana de las superficies	97
9.1. Agentes antimicrobianos	99
9.1.1. Sistemas orgánicos	100
9.1.2. Sistemas inorgánicos	101
9.2. Clasificación de superficies antimicrobianas según su modo de acción	103
9.2.1. Superficies que repelen los microorganismos	103
9.2.2. Superficies de contacto activo	104
9.2.3. Superficies que liberan biocidas	104
9.3. Superficies poliméricas antimicrobianas a base de plata	105
9.4. Superficies poliméricas antimicrobianas a base de zinc	107
9.5. Superficies poliméricas antimicrobianas a base de cobre	108
9.6. Durabilidad de las superficies biocidas	109

9.7. Bases legales de las superficies en contacto con los alimentos	110
10. Evolución de contaminación superficial durante operaciones de trabajo en la industria cárnica	111
III. OBJETIVOS	117
IV. SITUACIÓN INICIAL Y EVOLUCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN EN MATADEROS, SALAS DE DESPIECE Y SALAS DE EMBUTIDOS. METODOLOGÍA VISUAL Y METODOLOGÍA ANALÍTICA TRADICIONAL	121
1. Material y métodos	121
1.1. Planificación del trabajo	121
1.2. Descripción de las inspecciones y muestreos	124
1.2.1. Determinación de las características de las industrias e instalaciones evaluadas	124
1.2.2. Metodologías de control de las superficies de trabajo	125
1.2.2.1. Control visual	125
1.2.2.1.1. Control visual simple	125
1.2.2.1.1.1. Antes de la jornada de trabajo	125
1.2.2.1.1.2. Durante la jornada de trabajo	126
1.2.2.1.2. Control visual tras aplicación de spray revelador de contaminación	126
1.2.2.1.2.1. Antes de la jornada de trabajo	127
1.2.2.1.2.2. Durante la jornada de trabajo	127
1.2.2.2. Control analítico de las superficies de trabajo en contacto con los alimentos. Control analítico de manipuladores en matadero de cordero	128
1.2.2.2.1. Control analítico de superficies de trabajo en contacto con alimentos antes de la jornada de trabajo	128
1.2.2.2.2. Control analítico de superficies de trabajo en contacto con alimentos durante el desarrollo de los procesos. Control analítico de manipuladores en matadero de cordero	128
1.2.2.2.3. Metodología analítica	130
1.2.2.2.3.1. Procedimiento de toma de muestras	130
1.2.2.2.3.2. Detección de aerobios mesófilos tras muestreo con hisopo	131
1.2.2.2.3.3. Detección de enterobacterias tras muestreo con hisopo	134
1.2.2.2.3.4. Detección de presencia/ ausencia de <i>L. monocytogenes</i>	137
1.2.2.2.3.5. Detección de presencia/ ausencia de <i>Salmonella</i>	140
1.3. Análisis estadístico	144
2. Resultados y Discusión	146

2.1. Características de las industrias e instalaciones evaluadas	146
2.1.1. Mataderos	147
2.1.1.1. Matadero de Porcino. Instalación y Equipamiento	147
2.1.1.2. Matadero de Cordero. Instalación y Equipamiento	149
2.1.2. Salas de despiece	150
2.1.2.1. Sala de Despiece Porcino. Instalación y Equipamiento	150
2.1.2.2. Sala de Despiece Bovino. Instalación y Equipamiento	151
2.1.3. Industrias de embutidos crudos curados	153
2.1.3.1. Fábrica de Embutido 1. Instalación y Equipamiento	153
2.1.3.2. Fábrica de Embutido 2. Instalación y Equipamiento	155
2.2. Resultados del Control Visual	155
2.2.1. Control visual simple	155
2.2.1.1. Evaluación de los procedimientos de Limpieza y Desinfección y de su aplicación	156
2.2.1.1.1. Operativa de Limpieza y Desinfección	156
2.2.1.1.2. Personal de Limpieza y Desinfección	156
2.2.1.1.3. Defectos observados en el procedimiento de Limpieza y Desinfección	157
2.2.1.2. Revisión del estado higiénico de superficies en contacto directo con alimentos inspeccionadas visualmente tras su limpieza y desinfección (antes del inicio de los procesos)	161
2.2.1.3. Análisis visual de la evolución de la carga contaminante de las superficies de contacto directo con alimentos durante las operaciones de trabajo	162
2.2.1.3.1. Percepción sobre potenciales superficies en contacto con alimentos que pueden acumular contaminación durante la jornada de trabajo	162
2.2.1.3.2. Observación visual de la evolución de la contaminación en las superficies de trabajo en contacto directo con el alimento consideradas en el apartado anterior	164
2.2.1.4. Análisis visual de la operativa y el lavado de manos de los manipuladores de las empresas evaluadas	164
2.2.2. Control visual mediante espray revelador	165
2.2.2.1. Verificación de estado de superficies higienizadas en contacto directo con los alimentos inspeccionadas visualmente tras aplicación de espray revelador	166
2.2.2.2. Análisis visual mediante espray revelador de la evolución de las superficies de contacto directo con alimentos durante las operaciones de trabajo	169
2.3. Resultados del control analítico de superficies de contacto directo antes y durante los procesos productivos	170
2.3.1. Resultados analíticos para el control antes de los procesos productivos	170
2.3.1.1. Aerobios mesófilos	170
2.3.1.2. Enterobacterias	172

2.3.1.3. <i>Listeria monocytogenes</i>	174
2.3.1.4. <i>Salmonella</i>	175
2.3.2. Resultados analíticos para el control durante los procesos productivos	176
2.3.2.1. Aerobios mesófilos	176
2.3.2.1.1. A las 3,5-4,5 h de procesado	177
2.3.2.1.2. A las 7,5-8 h de procesado. Comparativa	185
2.3.2.2. Enterobacterias	189
2.3.2.2.1. A las 3,5-4,5 h de procesado	189
2.3.2.2.2. A las 7,5-8 h de procesado. Comparativa	198
2.3.2.3. <i>Listeria monocytogenes</i>	201
2.3.2.4. <i>Salmonella</i>	202
2.4. Resultados del control analítico de manipuladores en matadero de ovino	203
2.5. Discusión	205
2.5.1. Análisis visual de las superficies de trabajo	206
2.5.1.1. Antes de los procesos de trabajo (sobre superficies limpias y desinfectadas) ..	206
2.5.1.2. Análisis visual de las superficies en contacto con alimentos durante los procesos de producción	209
2.5.2. Resultados de los análisis en laboratorio de las superficies de trabajo en contacto con los alimentos	211
2.5.2.1. Resultados analíticos para superficies higienizadas	211
2.5.2.2. Interpretación de resultados analíticos de las superficies en contacto con alimentos durante los procesos de producción. Puntos críticos de acumulación de contaminación en virtud de tales análisis y de las percepciones visuales	212
2.5.2.2.1. Interpretación general	212
2.5.2.2.2. Mataderos	214
2.5.2.2.3. Salas de Despiece	215
2.5.2.2.4. Fábrica de embutidos	216
2.5.3. Posibilidad de implantación de medidas de corrección económicas y viables desde el punto de vista productivo	216
2.5.3.1. Matadero porcino	216
2.5.3.2. Matadero ovino	217
2.5.3.3. Salas de despiece	218
2.5.3.4. Industrias de embutidos	219
V. EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN EN SUPERFICIES DE CORTE MEDIANTE METODOLOGÍA AVANZADA: MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA DIRECTA Y APLICACIÓN DE ESPRAY REVELADOR	223
1. Material y métodos	223

1.1. Planificación del trabajo	223
1.2. Descripción de las inspecciones y muestreos	223
2. Resultados y discusión	226
2.1. Resultados de la percepción visual simple y de la aplicación de microscopía de epifluorescencia directa	227
2.1.1. Tabla blanca	227
2.1.2. Tabla roja	232
2.2. Resultados microbiológicos	236
2.3. Resultados de la percepción visual mediante spray “Biofinder”	237
VI. CONCLUSIONES	241
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	247

0.1. Lista de Abreviaturas y Acrónimos

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AECOSAN	Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria
AFNOR	Asociación Francesa de Normalización
AFSA	Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria
Ag	Plata
ALOA	Agar Cromogénico Selectivo para <i>Listeria</i>
AMP	Péptido Antimicrobiano
ANICE	Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España
ANOVA	Análisis de la Varianza
AP	Agua de Peptona
APPCC	Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos
APT	Agua de Peptona Tamponada
ASINCAR	Asociación de Industrias Cárnicas del Principado de Asturias
ATP	Adenosina Trifosfato
BDC	Centrifugación con soluciones de distintos gradientes de densidad
BgVV	Bundesinstitut für Gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (Instituto Federal de Salud, Protección al Consumidor y Medicina Veterinaria, Alemania)
BIOHAZ	Comité Científico sobre Riesgos Biológicos de la EFSA
BOPP	Polipropileno Biaxial Orientado
BPF	Buenas Prácticas de Fabricación
CA	Control de Aglutinación
CaO	Óxido de calcio
CE	Comunidad Europea
CEE	Comunidad Económica Europea
CIP	Cleaning in Place (Limpieza en el sitio)
cm, cm ²	Centímetro, Centímetro cuadrado
cP	Centipoise
CSLM	Microscopía Láser de Escaneo Confocal
Ct	Ciclo Umbral
Cu	Cobre
CVC	Catéter Central Venoso
DAPI	4', 6-diamino-2-fenilindol
DEFT	Técnica Automática de Filtración combinada con Microscopía de Epifluorescencia Directa

DEM	Microscopía de Epifluorescencia Directa
DESV. ST.	Desviación Típica (Estándar)
dNTP	Desoxinucleótido de Trifosfato
ECDC	European Center of Disease Control (Centro Europeo para la Prevención y Control de las Enfermedades)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EFSA	European Food Safety Authority (Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria)
ELFA	Enzyme-linked Fluorescent Assay (Ensayo fluorescente ligado a una enzima)
EPS	Sustancias poliméricas extracelulares
ETA	Enfermedad de Transmisión Alimentaria
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDA	Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos -USA-)
FTI	Inmunocaptura mediante Flujo continuo
IAC	Control interno de Amplificación
ICMSF	International Commission on Microbiological Specifications for Foods (Comisión Int. para Especificaciones Microbiológicas de los Alimentos)
ISO	International Organization for Standardization
KIA	Kliger Iron Agar (Agar Hierro de Kliger)
LbL	Técnica Capa por Capa
LIA	Lysine Iron Agar (Agar Lisina Hierro)
log ₁₀	Logaritmo en base 10
LPS	Lipopolisacárido
MDD	Marcas de Distribuidor
MER	Material Especificado de Riesgo
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
MgO	Óxido de Magnesio
MI	Microbiología de Impedancia
µg	Microgramo
µl	Microlitro
NaPT	Sodio Piritiona
NIAID	National institute of Allergy and Infectious Disease (Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas -USA-)
NIR	Espectroscopía de Infrarrojo Cercano
NMP	Técnica del Número Más Probable
OBPA	Oxibisfenoxarsina
OMS	Organización Mundial de la Salud

PCA	Plate Count Agar (Método de Recuento sobre Placa de Ágar)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDA	Parenteral Drug Association (Asociación de Fármacos administrados por vía Parenteral)
PEG	Polietilenglicol
PGA	Poli-beta-1,6-N-acetil-D-glucosamina
PI	Yoduro de Propidio
PVC	Policloruro de Vinilo
PIB	Producto Interior Bruto
PNCH	Plan Normalizado de Control de la Higiene
PyME	Pequeña y mediana empresa
QAC	Compuesto de Amonio Cuaternario
R _c	Rugosidad media de una superficie
RLM	Rapid L. Mono Chromogenic Media (Medio selectivo cromogénico para determinación de <i>L. monocytogenes</i>)
ROS	Especies Reactivas al Oxígeno
RTi PCR	PCR en tiempo real
SM-ID	Medio cromogénico selectivo para detección de Salmonella
SW-NIR	Método Multiespectral de Onda Corta que abarca el Espectro del Infrarrojo Cercano
TiO ₂	Óxido de Titanio (IV)
TSB	Tryptic Soy Broth (Caldo Triptona Soja)
UNE-EN	Una Norma Española-Norma Europea
USA/ EEUU	Estados Unidos de América
USDA	U.S. Department of Agriculture (Departamento de Agricultura de los EEUU)
UE	Unión Europea
ufc	Unidades Formadoras de Colonias
URL	Unidades Relativas de Luz
(UV) VIS	Espectroscopía de Ultravioleta Visible
UV	Luz Ultravioleta
VRBGA	Agar Biliado Dextrosa Cristal Violeta Rojo Neutro
VTEC	Verotoxigénico (productor de verotoxina)
W	Vatio
WHO	World Health Organization (Organización Mundial de la Salud, OMS)
Zn	Zinc
ZnO	Óxido de Zinc
ZnO-CTs NTs	Nanopartículas de Chitosán con Óxido de Zinc
ZPT	Zinc Piritiona

0.2. Lista de Figuras

Figura 1: Distribución de enfermedades producidas por alimentos en la Unión Europea en 2013, según agente causante. EFSA Journal 2015	24
Figura 2: Alimentos causantes de enfermedades de transmisión alimentaria en la UE en 2013. EFSA Journal 2015	25
Figura 3: Casos de zoonosis confirmados en la UE en 2013 por cada 100.000 habitantes. EFSA Journal 2015	27
Figura 4: Distribución de los sectores implicados en brotes verificados de origen alimentario. Datos del 2007 donde están incluidos 2025 brotes sucedidos en 19 países miembros de la Unión Europea (EFSA, 2009)	41
Figuras 5 A y B (Njobuenwu y Oboho, 2007): Indican un ambiente en el cual una gota está en contacto con una superficie sólida, todo inmerso en un fluido externo (aire). En este sistema el ángulo de contacto se denota con la letra griega <i>tita</i> (θ , ver en figura superior), que denota la situación del fluido 2 con respecto a la superficie sólida. Si $\theta < 90$ grados el sólido es mojado por el líquido -casos a, b y c; si $\theta > 90$ grados no hay humectación -caso d-, mientras que $\theta = 0$ -caso a- y $\theta = 180$ grados -caso f-, denotan las situaciones extremas de completa o nula humectabilidad respectivamente	45
Figura 6: Comparación de la efectividad entre CIP tradicional y técnicas de limpieza enzimáticas (Liu y cols., 2014)	50
Figura 7: Fases de desarrollo de un biofilm (Martínez y Vadyvaloo, 2014)	66
Figura 8: Simulación informatizada (según el programa BacLAB) de un modelo de biofilm regenerado. Los puntos verdes simbolizan bacterias de nuevo asentamiento, los rojos bacterias muertas, los azules bacterias resistentes, que habrían servido de base para la regeneración del biofilm tras un tratamiento desinfectante no determinante (Chambless, 2006)	71
Figura 9: Imagen de mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos (Peleg y cols., 2010)	74
Figura 10: Cuatro posibles mecanismos de resistencia bacteriana en biofilm formado sobre una superficie atacada (en gris). (Chambless, 2006): 1) Dificultar la penetración de biocidas en zonas externas del biofilm (en amarillo), 2) Generar una respuesta al estrés por parte de algunas bacterias (en verde), 3) Alterar el medioambiente del biofilm como respuesta (zona rosa) y 4) bacterias resistentes por diferenciación fenotípica (en morado)	76
Figura 11: Estación de lectura TEMPO de la casa Biomérieux	84
Figura 12: Esquema del microscopio confocal y el trayecto de luz. El rayo láser (luz azul) es filtrado por un agujero y un espejo dicróico; luego es enfocado mediante un lente objetivo sobre el espécimen y estimula la fluorescencia presente en el mismo (luz verde). La fluorescencia es recolectada por el objetivo y dirigida al espejo dicróico, que la refleja y dirige hacia un detector. Un segundo filtro con agujero se coloca frente al detector y sólo deja pasar la luz proveniente del plano de enfoque (línea continua). La fluorescencia fuera de foco de las zonas que están por encima y por debajo del plano de enfoque (en líneas discontinuas) no pasa por el agujero y por lo tanto no formará parte de la imagen. (Olschewski, 2000)	86

Figura 13: Cronograma de trabajo y de los ensayos experimentales	123
Figura 14: Colonias típicas de <i>Listeria monocytogenes</i> en medio selectivo cromogénico RLM ..	139
Figura 15: Imágenes de elementos no previstos en el programa de limpieza diaria de las empresas, que precisan limpieza manual convencional y se observan higienizados de modo deficiente ..	157
Figura 16: Imagen de suelo higienizado, con su impermeabilidad deteriorada, una vez aplicado el spray revelador de contaminación. Se observa burbujeo blanco intenso por la existencia de contaminación microbiana	158
Figura 17: Lamas de peladora de porcino, una vez finalizadas las actividades de higienización, tras aplicación de spray revelador	167
Figura 18: Teflón de despiece blanco que burbujea tras aplicar spray revelador a pesar de tener una apariencia visual limpia (véase con mayor claridad en los bordes de la aplicación)	167
Figura 19: Fotogramas de superficies higienizadas de contacto con alimentos una vez aplicado "Biofinder", spray revelador de contaminación. No se observa burbujeo blanco intenso (la mera aplicación del spray conlleva la aparición de alguna pequeña burbuja del color del spray, no achacable a suciedad en las superficies)	168
Figura 20: Imágenes de superficies de contacto con alimentos durante el procesado de estos una vez aplicado el spray revelador de contaminación. Se observa burbujeo blanco intenso por la existencia de contaminación microbiana	169
Figura 21: Representaciones gráficas de resultados analíticos para Aerobios mesófilos para cada una de las superficies de contacto directo con el alimento evaluadas a las 3,5-4,5 h de procesado (\log_{10} (ufc/cm ²))	180
Figura 22: Representaciones gráficas de valores medios y desviaciones típicas de los 30 valores de las 10 superficies estudiadas. Aerobios mesófilos (ufc/cm ²)	181
Figura 23: Representaciones gráficas de resultados analíticos, para las diez superficies de contacto en evolución evaluadas a las 3,5-4,5 h de procesado, con valores expresados en medias acumuladas (columna 1: media de 1 valor, columna 2: media de 2 valores, ... columna n: media de n valores), para Aerobios mesófilos (\log_{10} (ufc/cm ²)). Línea de trazado roja: valor de la media más dos veces el valor de la desviación típica hasta cada uno de los puntos de lectura. Línea de trazado verde: valor de la media menos dos veces el valor de la desviación típica hasta cada uno de los puntos de lectura. El área entre las líneas roja y verde es el valor de la media \pm 2 veces la desviación típica (En una distribución normal, encontraríamos en tal área el 95 % de los valores posibles)	182
Figura 24: Representaciones gráficas de resultados analíticos, para aerobios mesófilos, de las superficies de contacto en evolución contempladas individualmente, evaluadas a las 3,5-4,5 h de procesado y a las 7,5-8 h (\log_{10} (ufc/cm ²)), e incremento reflejado en la contaminación entre los dos distintos tiempos	187
Figura 25: Representación gráfica de resultados analíticos, para aerobios mesófilos, de las superficies de contacto en evolución contempladas en conjunto, evaluadas a las 3,5-4,5 h de procesado y a las 7,5-8 h (\log_{10} (ufc/cm ²)), e incremento reflejado en la contaminación entre los dos distintos tiempos	188

Figura 26: Representación gráfica de valores medios (aerobios mesófilos, ufc/cm ²), para las tres superficies estudiadas, a mitad de jornada y al finalizar la jornada de trabajo de la Sala de Despiece de Vacuno	188
Figura 27: Representaciones gráficas de resultados analíticos para Enterobacterias para cada una de las superficies de contacto directo con el alimento evaluadas a las 3,5-4,5 h de procesado (log ₁₀ (ufc/cm ²))	193
Figura 28: Representaciones gráficas de valores medios y desviaciones típicas de los 30 valores de las 10 superficies estudiadas. Enterobacterias (ufc/cm ²)	194
Figura 29 Representaciones gráficas de resultados analíticos, para las diez superficies de contacto en evolución evaluadas a las 3,5-4,5 h de procesado, con valores expresados en medias acumuladas (columna 1: media de 1 valor, columna 2: media de 2 valores, ... columna n: media de n valores) para enterobacterias (log ₁₀ (ufc/cm ²)). Línea de trazado roja: valor de la media más dos veces el valor de la desviación típica hasta cada uno de los puntos de lectura. Línea de trazado verde: valor de la media menos dos veces el valor de la desviación típica hasta cada uno de los puntos de lectura. El área entre las líneas roja y verde es el valor de la media ± 2 veces la desviación típica. (En una distribución normal, encontraríamos en tal área el 95 % de los valores posibles)	195
Figura 30: Representaciones gráficas de resultados analíticos, para enterobacterias, de las superficies de contacto en evolución contempladas individualmente, evaluadas a las 3,5-4,5 h de procesado y a las 7,5-8 h (log ₁₀ (ufc/cm ²)), e incremento reflejado en la contaminación entre los dos distintos tiempos	199
Figura 31: Representación gráfica de resultados analíticos, para enterobacterias, de las superficies de contacto en evolución contempladas en conjunto, evaluadas a las 3,5-4,5 h de procesado y a las 7,5-8 h (log ₁₀ (ufc/cm ²)), e incremento reflejado en la contaminación entre los dos distintos tiempos	200
Figura 32: Representación gráfica de valores medios (enterobacterias, ufc/cm ²), para las tres superficies estudiadas, a mitad de jornada y al finalizar la jornada de trabajo de la Sala de Despiece de Vacuno	200
Figura 33: Resultados comparativos de evaluación analítica de manos en la manipulación de corderos durante el desuelle en mataderos, para Aerobios mesófilos. En azul resultados tras lavado una vez transcurridos 15 minutos de proceso. En rojo resultados tras el mismo periodo pero estableciendo enjuagues de manos intermedios cada 2-3 minutos con agua clorada (1 ppm) a 45-50 °C. Cada pareja de barras de distinto color corresponde a un análisis concreto con y sin lavados de manos intermedios	204
Figura 34: Resultados comparativos de evaluación analítica de manos en la manipulación de corderos durante el desuelle en mataderos, para enterobacterias. En azul resultados tras lavado una vez transcurridos 15 minutos de proceso. En rojo resultados tras el mismo periodo pero estableciendo enjuagues de manos intermedios cada 2-3 minutos con agua clorada (1 ppm) a 45-50 °C. Cada pareja de barras de distinto color corresponde a un análisis concreto con y sin lavados de manos intermedios	204
Figura 35: Tabla de corte blanca: imagen sin teñir de la superficie	227

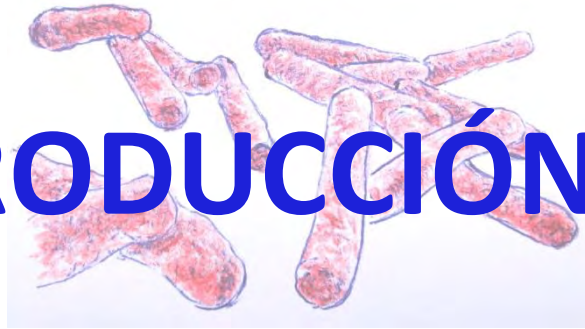
Figura 36: Contaminación orgánica de la tabla de corte blanca, tras su tinción con DAPI	228
Figura 37: Tinción a 20x de la superficie de la tabla de corte blanca teñida con DAPI	229
Figura 38: Tinción con Live-Dead de la tabla de teflón blanco, con la presencia de restos proteicos de color verde y acúmulos microbianos de color rojo	230
Figura 39: Tabla de teflón blanco, teñida con Live-Dead, apreciándose la estructura de una microcolonia	231
Figura 40: Tinción con DAPI de la superficie de la tabla roja	233
Figura 41: Imagen de los residuos orgánicos sobre la tabla roja, tras su tinción con DAPI	234
Figura 42: Imagen de la superficie de la tabla de corte roja, con la presencia de grandes cantidades de residuos orgánicos y microorganismos activos en su interior	235
Figura 43. Imagen de restos de suciedad (verde) en la tabla roja, con la presencia de colonización microbiana en su interior (tonos naranja-rojizos)	236
Figura 44: Imagen de las tablas blanca y roja una vez aplicado el spray "Biofinder"	237

0.3. Lista de Tablas

Tabla 1: Producción española de elaborados cárnicos de 2003 a 2013. Fuente: ANICE, 2013 ...	20
Tabla 2: Casos de zoonosis en la UE en 2013, número de hospitalizados y número de fallecidos. EFSA Journal 2015.	
Tabla 3: Brotes de origen alimentario por bacterias patógenas causados por un manejo inadecuado	27
Tabla 3: Brotes de origen alimentario por bacterias patógenas causados por un manejo inadecuado, principalmente contaminación cruzada e higiene insuficiente (Modificado de Reij y Den Aantrekker, 2004)	39
Tabla 4: Principales desinfectantes y su mecanismo de acción (Modificado por Denyer y Stewart, 1998; McDonnell y Russell, 1999; Wirtanen y Salo, 2003; Mostert, 2005)	58
Tabla 5: Mecanismos de resistencia intrínseca en bacterias hacia los antisépticos y desinfectantes (McDonnell y Russell, 1999)	72
Tabla 6: Metodología para interpretación de resultados de presencia de <i>Salmonella</i>	144
Tabla 7: Descripción de equipamiento en matadero de vacuno y valoración de la posibilidad de acumulación de contaminación microbiana superficial	148
Tabla 8: Descripción de equipamiento en matadero de cordero y valoración de la posibilidad de acumulación de contaminación microbiana superficial	149
Tabla 9: Descripción de equipamiento en sala de despiece de porcino y valoración de la posibilidad de acumulación de contaminación microbiana superficial	151
Tabla 10: Descripción de equipamiento en sala de despiece de vacuno y valoración de la posibilidad de acumulación de contaminación microbiana superficial	152
Tabla 11: Descripción de equipamiento en fábrica de elaboración de embutidos y valoración de la posibilidad de acumulación de contaminación microbiana superficial	154
Tabla 12: Resultados de la encuesta de conocimiento de la importancia de la Limpieza y Desinfección por los empleados ocupados en esta tarea en las industrias evaluadas	160
Tabla 13: Resultados de inspección visual simple de superficies de contacto con alimentos tras aplicación de los procedimientos de limpieza y desinfección en las empresas evaluadas	161
Tabla 14: Resultados de inspección visual simple de superficies higienizadas de contacto directo con alimentos tras aplicación de espray revelador	166
Tabla 15: Resultados analíticos para aerobios mesófilos en las distintas superficies, higienizadas, de contacto directo con el alimento (ufc/ cm ²)	171
Tabla 16: Compendio de resultados analíticos por tipo de empresa para Aerobios mesófilos en las distintas superficies, higienizadas, de contacto directo con el alimento (ufc/ cm ²)	172
Tabla 17: Resultados analíticos para enterobacterias en las distintas superficies, higienizadas, de contacto directo con el alimento (ufc/ cm ²)	173
Tabla 18: Compendio de resultados analíticos por tipo de empresa para enterobacterias en las distintas superficies, higienizadas, de contacto directo con el alimento (ufc/ cm ²)	174

Tabla 19: Resultados analíticos para <i>Listeria monocytogenes</i> en las distintas superficies de contacto directo con el alimento (presencia/ ausencia)	175
Tabla 20: Resultados analíticos para <i>Salmonella</i> en las distintas superficies de contacto directo con el alimento (presencia/ ausencia)	176
Tabla 21: Resultados analíticos para Aerobios mesófilos en las distintas superficies de contacto directo con el alimento a las 3,5-4,5 h de procesado (en ufc/cm ² y en log ₁₀ (ufc/cm ²))	177
Tabla 22: Resultados analíticos expresados en promedio acumulado (media 1 valor, media 2 valores, ... media n valores) para Aerobios mesófilos en las distintas superficies de contacto directo con el alimento a las 3,5-4,5 h de procesado (log ₁₀ (ufc/cm ²))	179
Tabla 23: Resultados analíticos para Aerobios mesófilos en las tres superficies de contacto directo con el alimento evaluadas, en los mismos días, a las 3,5-4,5 h de procesado y a las 7,5-8 h (en ufc/cm ² y en log ₁₀ (ufc/cm ²))	186
Tabla 24: Resultados analíticos para enterobacterias en las distintas superficies de contacto directo con el alimento a las 3,5-4,5 h de procesado (en ufc/cm ² y en log ₁₀ (ufc/cm ²))	190
Tabla 25: Resultados analíticos expresados en promedio acumulado (media 1 valor, media 2 valores, ... media n valores) para enterobacterias en las distintas superficies de contacto directo con el alimento a las 3,5-4,5 h de procesado (log ₁₀ (ufc/cm ²))	192
Tabla 26: Resultados analíticos para enterobacterias en las tres superficies de contacto directo con el alimento evaluadas, en los mismos días, a las 3,5-4,5 h de procesado y a las 7,5-8 h (en ufc/cm ² y en log ₁₀ (ufc/cm ²))	198
Tabla 27: Resultados analíticos para <i>Listeria monocytogenes</i> en las distintas superficies de contacto directo con el alimento evaluadas a las 3,5-4,5 h de procesado (presencia/ ausencia)	201
Tabla 28: Resultados analíticos para <i>Salmonella</i> en las distintas superficies de contacto directo con el alimento evaluadas a las 3,5-4,5 h de procesado (presencia/ ausencia)	202

I. INTRODUCCIÓN



I. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) como “el conjunto de síntomas originados por la ingestión de agua y/o alimentos que contengan agentes biológicos (por ejemplo bacterias o parásitos) o no biológicos (por ejemplo plaguicidas o metales pesados) en cantidades tales que afecten a la salud del consumidor en forma aguda o crónica, a nivel individual o de grupo de personas”. El brote de una ETA se produce cuando dos o más personas sufren una enfermedad similar después de ingerir un mismo alimento, y los análisis epidemiológicos o de laboratorio lo señalan como el origen de ese malestar (González, 2009). Las ETAs se deben pues a la ingestión de alimentos contaminados por microorganismos o sustancias químicas.

Las enfermedades de transmisión alimentaria abarcan un amplio espectro de dolencias y constituyen un problema de salud pública creciente en todo el mundo. La OMS afirma que siguen siendo el problema de salud pública más extendido. La contaminación de los alimentos puede producirse en cualquier etapa del proceso que va de la producción al consumo del alimento («de la granja al tenedor»), y puede también deberse a la contaminación ambiental, ya sea del agua, la tierra o el aire. La manifestación clínica más común de una enfermedad transmitida por los alimentos consiste en la aparición de síntomas gastrointestinales, pero estas enfermedades también pueden dar lugar a síntomas neurológicos, ginecológicos, inmunológicos y de otro tipo. La ingestión de alimentos contaminados puede provocar una insuficiencia multiorgánica, incluso cáncer, por lo que representa una carga considerable de discapacidad, así como de mortalidad (OMS, 2015).

Estamos transitando una época muy particular, donde la globalización forma parte de nuestras vidas: se observan desde nuevas tecnologías y nuevos productos hasta las comidas étnicas al alcance de la mano. El crecimiento de las sociedades, la incorporación de nuevos ingredientes, el aumento de la población y el traslado de personas a lo largo de todo el planeta y las nuevas tendencias de consumo (en general con inclinación por la comida rápida), son algunos de los factores que han ayudado tanto al aumento del porcentaje de personas que han padecido una ETA como a la aparición de nuevas enfermedades alimentarias. (González, 2009).

A nivel industrial, sabemos que para prevenir agentes contaminen nuestra producción, debemos aplicar Procedimientos Operativos Estandarizados, Programas de Buenas Prácticas y un adecuado APPCC (Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico) (González, 2009). Como prerrequisito de todo sistema APPCC es imprescindible implantar un programa adecuado de higienización en las

industrias de alimentos. El propósito de los procedimientos de Limpieza y Desinfección es la destrucción de microorganismos patógenos y una considerable reducción de los microorganismos alterantes en las superficies y en el medio que las rodea.

La presencia de biofilms en las superficies de trabajo de la industria durante los procesos de elaboración de alimentos es la principal causa de contaminación del producto distinta de la, en el caso de productos cárnicos, derivada de trabajar con animales vivos para la obtención de las canales de carne (lo que puede abrir vías de contaminación directa por contactos con pieles o restos de heces por ejemplo). Los biofilms son agrupaciones de microorganismos adheridos a superficies que producen diversas sustancias poliméricas extracelulares que los recubren, protegiéndolos de las condiciones ambientales adversas. Estas sustancias confieren resistencia a los microorganismos embebidos y forman una barrera frente a los procedimientos convencionales de limpieza y desinfección, lo que dificulta la eliminación del biofilm. La formación de esas comunidades sésiles y su resistencia inherente a los agentes antimicrobianos está en la raíz de muchas infecciones bacterianas persistentes y crónicas (Costerton y cols., 1999).

Así, el estado higiénico de las superficies de contacto con el alimento, es de vital importancia para reducir el nivel de contaminación en los productos finales. En un establecimiento de alimentación es imprescindible la correcta aplicación de un Programa de Limpieza y Desinfección para mantener buenas condiciones higiénico-sanitarias, por lo que su diseño debe tener una base científico-técnica actualizada. Para la confección y aplicación de un Programa de Limpieza y Desinfección es necesario obtener toda la información relativa a las características y condiciones del establecimiento y las sustancias y útiles que se emplean. Es importante considerar que estos programas deben ser actualizados, especialmente si se dan cambios o modificaciones de las condiciones existentes en los establecimientos o en los procesos de trabajo.

No obstante, aplicar un procedimiento de higienización no es suficiente, también es necesario evaluarlo y, más todavía, evaluar qué ocurre durante el proceso con aquellas superficies que inicialmente limpiamos (y aquellos manipuladores que comenzaron recién lavados). Por ello, para la industria alimentaria, cada vez es más importante disponer de sistemas rápidos y fiables para detectar contaminación microbiana en superficies, pues el control microbiológico en varios puntos de los procesos de producción resulta un factor clave y esencial para la planificación de la calidad de los productos a elaborar (Caballero Torres y cols., 2002).

La exigencia creciente de seguridad alimentaria hace aconsejable la indagación sobre la contaminación durante los procesos de las distintas superficies de trabajo y de los manipuladores en contacto con los alimentos, que provocaría a su vez la contaminación cruzada de otros

alimentos. No podemos darnos por satisfechos considerando que partimos a inicio de jornada de unas condiciones higiénicas muy buenas sin pensar que, al poco tiempo de trabajo, toda esa exigente limpieza inicial tiene escasa validez para las operaciones que han de desarrollarse posteriormente. Este es un error muy importante en el que suelen incurrir las inspecciones veterinarias oficiales y, también con frecuencia, las inspecciones correspondientes a auditorías externas por parte de grandes y medios grupos de distribución de alimentos. Las condiciones iniciales (de exigida demostración mediante análisis) no garantizan en absoluto que el proceso posterior sea trabajado durante toda la jornada en condiciones higiénicas.

Aunque pudiera esperarse lo contrario, es especialmente costoso localizar estudios donde se haya evaluado la evolución de la contaminación de las superficies de trabajo durante el desarrollo de la jornada en las industrias de alimentos.

Como sabemos, la carne fresca y algunos productos cárnicos son alimentos perecederos que presentan una elevada actividad de agua y un alto contenido en nutrientes. Ambas características favorecen el desarrollo de microorganismos indeseables y la aparición de otras modificaciones de origen físico-químico y enzimático, a menudo propiciadas por los citados microorganismos. Los factores que influyen en el crecimiento de los microorganismos en las carnes son la actividad de agua, el potencial de óxido-reducción, el pH, las necesidades nutritivas y la temperatura, y, en productos cárnicos, también los aditivos utilizados. La actividad de agua de la carne fresca es de 0,98-0,99, cifra sumamente favorable para la multiplicación de todas las especies microbianas (Restrepo Molina y cols., 2001). La contaminación en proceso de superficies y manipuladores puede ser especialmente importante en mataderos, a causa de contactos involuntarios con pieles animales y roturas gastrointestinales.

Por ello es consecuente pensar que las industrias cárnicas deben conocer la situación de sus instalaciones, en lo referente a aquellas superficies que contactan con el alimento, antes y durante el desarrollo de los procesos de producción.

Por otra parte, la mayoría de los métodos usados para medir el nivel de limpieza y desinfección se basan en los recuentos microbiológicos en placa. Es preciso tener claro que tales métodos no permiten la toma rápida de decisiones, pues requieren entre uno y dos días de incubación de las placas. Métodos más rápidos como medida de ATP o detección proteica pueden resultar necesarios (Valcárcel y cols., 2002). Adicionalmente, podemos encontrar hoy en el mercado productos para ayudarse en la percepción visual, que favorecen conocer a priori si una superficie está contaminada o no, sin incurrir en gastos (o siendo estos simbólicos). Se trata de productos aplicables en espray que son objeto de cambios físicos en presencia de contaminación microbiana,

libre o formando biofilms. El empleo de estos productos proporciona conocimiento inmediato acerca de la higiene de la superficie donde se aplica. Esta inmediatez puede hacerlos muy útiles para las empresas. Además, su manejo es tan sencillo como el de cualquier spray convencional, y, en algún caso, su fácil solubilidad en agua facilita su enjuague inmediato de modo simple, además de no dejar residuos, en virtud de su estudiada composición.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. El sector cárnico español

España es uno de los países con una tradición más rica en la elaboración y consumo de los más variados embutidos y salazones (jamón especialmente). Lo diverso de nuestra producción chacinera, que se extiende a todos los rincones del país, forma parte de nuestro acervo cultural y gastronómico, y es apreciado dentro y fuera de nuestras fronteras.

La industria cárnica es una de las más importantes en términos monetarios para la economía del país, ya que se halla entre los cuatro primeros sectores industriales, sólo por detrás de sectores de la dimensión de la industria automovilística, la industria del petróleo y combustibles, y la producción y distribución de energía eléctrica. En este sentido, según datos que la Asociación Nacional de la Industria de la Carne en España (ANICE) indica en su web (2015, últimos datos incorporados de Noviembre de 2013), entre mataderos, salas de despiece e industrias de elaborados, suman más de 3000 empresas las dedicadas al procesado cárnico, repartidas por toda la geografía nacional.

Según la mencionada página de ANICE, el volumen de negocio de la industria cárnica nacional es de 21.164 millones de euros (más de un 20% del total del sector alimentario, en el primer lugar de toda la industria española de alimentos y bebidas), aproximadamente el 2% del PIB español y el 14% de la rama industrial de nuestro PIB, y emplea a casi 81.000 trabajadores (más del 20% de la ocupación en la industria alimentaria española). En cuanto a la estructura industrial, en el informe de ANICE se comenta que se registra año a año un suave descenso en el número de instalaciones autorizadas, principalmente mataderos, y que el 71,6 % de las instalaciones de procesado cárnico tiene menos de 20 personas ocupadas.

En lo relativo al consumidor, la asociación señala que de los 67.634 millones de euros que alcanzó el gasto alimentario en el hogar en España en 2012, un 22,7% correspondió a carnes y derivados, muy por encima de los otros sectores principales de productos que conforman la cesta de la compra (por ejemplo frutas y hortalizas frescas y transformadas, en segundo lugar, con un 16,9%). En valor, supone un gasto total de 15.329 millones de euros consumidos en el hogar, 52,85 kg per cápita (a estas cifras habría que sumar el consumo extradoméstico, de singular importancia para los productos cárnicos, especialmente para referencias tan emblemáticas como el jamón curado o

las carnes frescas, para el que no se tienen datos pormenorizados, aunque se estima que alrededor del 20% del consumo de carnes y elaborados cárnicos se realiza en el ámbito extradoméstico).

Refiriéndose al volumen de producto, en el informe ANICE expone que en 2013 la producción española de carne rompió la tendencia de crecimiento que llevaba desde el año 2009. Es notorio, se indica, que la producción porcina es la primera actividad cárnica española (más del 60% de nuestra producción cárnica), y además representa el 3,4% de la producción mundial y nos sitúa como el cuarto mayor productor de carne de esta especie, por detrás de China (que por sí sola produce el 50% de la carne de cerdo de todo el mundo), EE.UU. (10% de la producción mundial) y Alemania (5,3%). Por otra parte, a pesar de que la producción de carne de ovino se encuentra en declive desde hace varios años, España es el segundo productor europeo de ovino y caprino, con casi un 18% del total, por detrás del Reino Unido (37%). En cuanto a la producción de elaborados cárnicos, España, con 1,3 millones de toneladas anuales, se sitúa en cuarto lugar en la Unión Europea, por detrás de Alemania, Italia y Francia. Por productos, y en cuanto a volumen se refiere, el jamón curado es el rey en nuestro país, aunque destacan en volumen el conjunto de los fiambres cocidos (Ver Tabla 1). Si el análisis se centra en el valor económico de lo vendido, la cuota de los jamones curados se amplía mucho más, hasta representar más de un tercio de las ventas de derivados cárnicos. Junto a las tendencias crecientes en formatos loncheados y porciones, la imparable subida de la cuota de mercado de las marcas de distribuidor (MDD) es otro de los rasgos definitorios del mercado retail de elaborados cárnicos en España.

PRODUCCIÓN ESPAÑOLA DE ELABORADOS CÁRNICOS (tm)											
Producto	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Jamón y paleta curados	245.700	249.400	251.345	265.168	270.470	271.900	245.000	251.000	255.000	247.500	254.000
Embutidos curados	191.844	194.300	193.386	192.999	196.280	197.020	185.200	188.000	185.000	183.000	186.000
Jamón y paleta cocidos	169.997	172.500	174.398	178.583	183.050	183.510	175.000	174.000	175.600	176.000	177.500
Otros tratados por el calor	345.789	351.000	355.212	360.540	367.750	382.450	385.000	393.000	408.700	421.000	417.000
Prod. adobados y frescos	170.680	174.500	178.165	181.772	183.600	185.400	180.400	182.500	185.000	187.200	189.000
Platos preparados	66.688	78.700	71.105	73.593	77.273	84.220	80.600	82.000	83.000	86.300	87.500
TOTAL ELABORADOS	1.190.698	1.220.400	1.223.611	1.252.655	1.278.423	1.304.500	1.251.200	1.270.500	1.292.300	1.301.000	1.311.000

Fuente: ANICE-CONFECARNE

Tabla 1: Producción española de elaborados cárnicos de 2003 a 2013. Fuente: ANICE, 2013.

En cuanto al destino de la carne producida, señalar que cerca del 60% de la producción de carne de porcino es para consumo directo y el 40% para consumo industrial, mientras que en el caso del vacuno y el ovino la práctica totalidad es para consumo directo, y que en 2013 se exportaron 1,57 millones de Tm de productos cárnicos (1,43 millones de estas en productos frescos y el resto como elaborados, que crecían un 13% en 2013), con un valor de 4.189 millones de € (un 3,9% superior al dato de 2012, que a su vez superó en un 11% el valor de 2011) y una balanza comercial muy positiva y creciente de modo considerable en los últimos años (hasta el 356% actual) (ANICE, 2013). La industria cárnica nacional ha pasado, en apenas 25 años, de no hacer ventas exteriores a convertirse en el primer sector exportador de la industria agroalimentaria española y en una potencia en el mercado mundial de productos cárnicos. Dos terceras partes de nuestras exportaciones se dirigen a la Unión Europea, la mayor parte de nuestros productos a Francia, Alemania, Portugal e Italia (lo que deja abierto el reto para la industria de la venta extracomunitaria) (ANICE, 2013).

En definitiva, la industria alimentaria y, en concreto, el sector cárnico, está siendo uno de los que mejor está resistiendo a la actual crisis debido, entre otras cosas, al mantenimiento del consumo o aumento en determinados productos y, sobre todo, al crecimiento de las exportaciones. No obstante, a pesar de que los datos muestran un escenario optimista, motivado por los resultados del comercio exterior, no hay que dejar de prestar atención a una serie de problemáticas asociadas al sector (Anónimo, 2013):

- . La retracción del consumo nacional debido al entorno de crisis actual y a la creciente asociación de la carne como alimento menos sano que otros.
- . Un alto nivel de concentración de la distribución, lo que implica un aumento de la resistencia al incremento de precios y la pérdida de margen consecuente, más aún tras la subida del IVA y el “miedo” a la pérdida de la venta por parte del minorista.
- . El incremento de costes de los cereales, provocado por las sequías y el auge de los biocombustibles, provocan una retracción de la crianza de ganado.
- . Un alto grado de atomización del sector, la sobrecapacidad productiva a nivel nacional y la madurez del mercado comunitario provocan una fuerte competencia que hace descender el precio del producto cárnico.
- . La descapitalización de pequeñas y medianas empresas debido a los problemas de acceso a fuentes de financiación, que está provocando fusiones o absorciones entre empresas.

Además, alertas sanitarias frecuentes asociadas al ámbito cárnico con (por ejemplo la conocida como “mal de las vacas locas” -enfermedad de Creutzfeldt-Jakob-), incluso sin motivo (por ejemplo la gripe aviar u otras enfermedades animales cuya transmisión no está asociada al consumo del alimento), ponen al consumidor de productos cárnicos con cierta frecuencia a la defensiva y hacen que normativas y reglamentaciones se endurezcan cada vez más en busca de mejorar la calidad de los productos, asegurar su trazabilidad y garantizar su correcto estado higiénico-sanitario. Por otra parte, la globalización, que caracteriza el escenario de la economía mundial presente, al tiempo que facilita vías de expansión, posibilita un aumento de la competencia desde el exterior.

Por ello, para hacer frente a la competencia y para demostrar al consumidor que se dan todas las garantías en materia de seguridad alimentaria, han de cumplirse los criterios microbiológicos europeos de acuerdo a las categorías de alimentos correspondientes tal y como se establece en el Reglamento CE n.º 2073/2005. Además es necesario además proporcionar al mercado una oferta amplia y novedosa, en consonancia con sus exigencias. Por tanto, las empresas del sector cárnico español, mayoritariamente PyMEs, deben mejorar su competitividad y rentabilidad mediante el desarrollo tecnológico, mejorando sus costes y optimizando sus procesos de producción e higienización.

2. Seguridad alimentaria. Toxiinfecciones y contaminación microbiana de los alimentos. Enfermedades de origen alimentario relacionadas con la industria cárnica.

2.1. Importancia de la seguridad alimentaria

La seguridad alimentaria es cada vez más importante en el área de la salud pública, y por ello, todos los gobiernos están intensificando sus esfuerzos para adaptarla a la gran variabilidad de peligros existentes. Las enfermedades alimentarias transmitidas por patógenos bacterianos son una preocupación relevante para la seguridad alimentaria a nivel mundial (Bhagwat, 2003). Las toxiinfecciones alimentarias, y especialmente las enfermedades diarreicas, constituyen significativamente una causa de morbilidad y mortalidad (WHO, 2007).

Los problemas de seguridad alimentaria están en constante cambio, ya sea por la aparición de agentes patógenos emergentes, como por los cambios producidos en el estilo de vida, economía, hábitos alimenticios y edad de la población, entre otros (OMS, 2002; Forsythe, 2010; Nyachuba, 2010). La globalización ha traído consigo grandes riesgos para la salud, ya que la producción intensiva de alimentos, la expansión mundial de su comercialización y el nivel de concentración de consumidores de alimentos preparados o que comen en colectividades, hacen que aumente la problemática de generación de brotes alimentarios. A ello hay que sumar que, ante un brote, la enfermedad se disemine con facilidad y, de no disponer de un adecuado programa de vigilancia, necesario para su control, el número de afectados sea mayor (OMS, 2002; WHO 2007).

Por otra parte, la demanda por parte de los consumidores de productos naturales y orgánicos es una tendencia en continuo aumento en nuestra sociedad. El rechazo a la presencia de antibióticos, pesticidas, hormonas u organismos genéticamente modificados en plantas y animales, y a la presencia de aditivos químicos en alimentos va ganando importancia y marcando pautas para definir los retos y necesidades de la industria alimentaria actual. En esta línea, los consumidores están dispuestos a pagar más por productos naturales y orgánicos. El precio puede ascender fácilmente entre un 10-40%, y hasta un 200% en productos cárnicos (Bacus, 2006). Por ello, el fabricante de alimentos cárnicos ha de pensar en cómo suprimir el riesgo alimentario sin que su producto sea sospechoso de “poco natural”, es decir, sin que se asocie a una presencia importante de aditivos.

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

2.2. Toxiinfecciones y enfermedades transmitidas por alimentos

Las toxiinfecciones y las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), comprenden un amplio grupo de enfermedades causadas por bacterias patógenas, parásitos, contaminantes químicos y biotoxinas; además de las reacciones individuales del cuerpo humano a los microorganismos (OMS, 2006; NIAID, 2007).

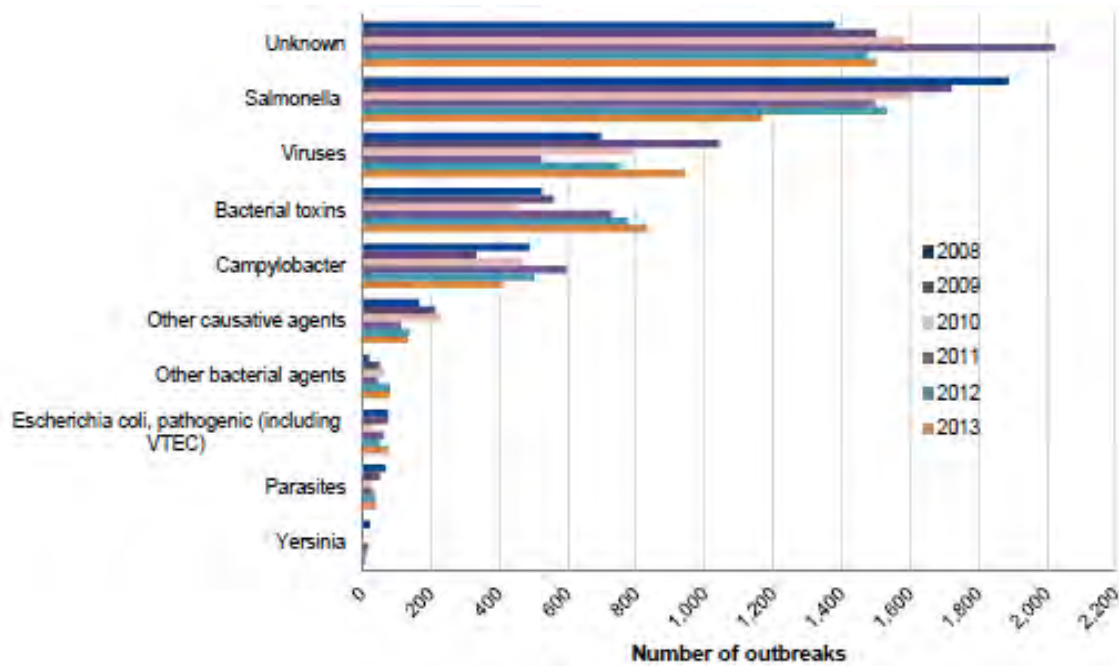


Figura 1: Distribución de enfermedades producidas por alimentos en la Unión Europea en 2013, según agente causante. EFSA Journal 2015.

Las ETAs constituyen un gran problema mundial, tanto en lo referente al perjuicio para las personas, como a los costes económicos que originan, pues pueden dañar el comercio y el turismo, y conducir a la pérdida de ganancias, al desempleo y a demandas legales. Por lo tanto, un control eficaz de la higiene es de vital importancia para evitar las consecuencias adversas a la salud humana y a la economía (Codex Alimentarius, 2003), y los programas de control de calidad microbiológica son cada vez más aplicados a lo largo de la producción de la cadena alimentaria para reducir al mínimo el riesgo de infecciones para el consumidor. Consecuentemente, la disponibilidad de sistemas de prueba aceptados y rápidos para detectar la presencia o ausencia, o incluso el grado de contaminación de patógenos, se ha vuelto cada vez más importante para la industria alimentaria (Malorny y cols., 2003 a y b).

Dado que la mayoría de los países no emplea un buen sistema de registro, la incidencia global de las enfermedades transmitidas por los alimentos es difícil de calcular, pero se estima que casi un 70% de los aproximadamente 1.500 millones de casos de diarrea que se dan en el mundo al año, son causados directamente por la contaminación biológica o química de los alimentos. Todo ello a pesar de que se estima que únicamente entre el 1 y el 10% de los casos son registrados en las agencias oficiales (Tirado y Schmid, 2001). Hemos de pensar que un malestar relacionado con los alimentos no implica que el consumidor acuda a un centro médico. Así, si en las ETAs el número de afectados es pequeño (ámbito familiar por ejemplo), no se suelen recoger en las estadísticas

oficiales. Sólo si se llega a afectar un segmento masivo de la población se recoge estadísticamente y, a menudo se genera una alarma, con frecuencia desproporcionada. Sin embargo hay algunos casos especialmente llamativos, por ejemplo, en 1994, un brote de salmonelosis en los EEUU, debido a la contaminación de la base para la producción de helado, afectó a 224.000 personas (OMS, 2007).

Algunas estimaciones indican que, tan sólo en EEUU, las ETAs causaban 76 millones de casos, 350.000 hospitalizaciones y 5.000 muertes al año (OMS, 2007). En 2010, la European Food Safety Authority -EFSA- y el Centro Europeo de Control de Enfermedades (European Center of Disease Control -ECDC-), (2012), documentaron un total de 5.262 brotes de enfermedades de origen alimentario en la Unión Europea, afectando a 43.473 personas, de las cuales 4.695 fueron hospitalizadas y 25 murieron. Los alimentos más frecuentemente involucrados en estos brotes (ver Figura 2) fueron huevos y ovoproductos, comidas mixtas o de bufés, vegetales y sus productos. Las principales bacterias transmitidas por alimentos fueron *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Brucella spp.* y *Listeria spp.*, siendo la enfermedad más frecuente la salmonelosis, a pesar del descenso significativo de los casos registrados en los últimos años. Un brote es definido (BgVV-FAO/WHO, 2003) como un incidente donde dos o más personas padecen similar enfermedad después de la ingestión del mismo alimento (o agua), y la evidencia epidemiológica implica al alimento como origen de la enfermedad.

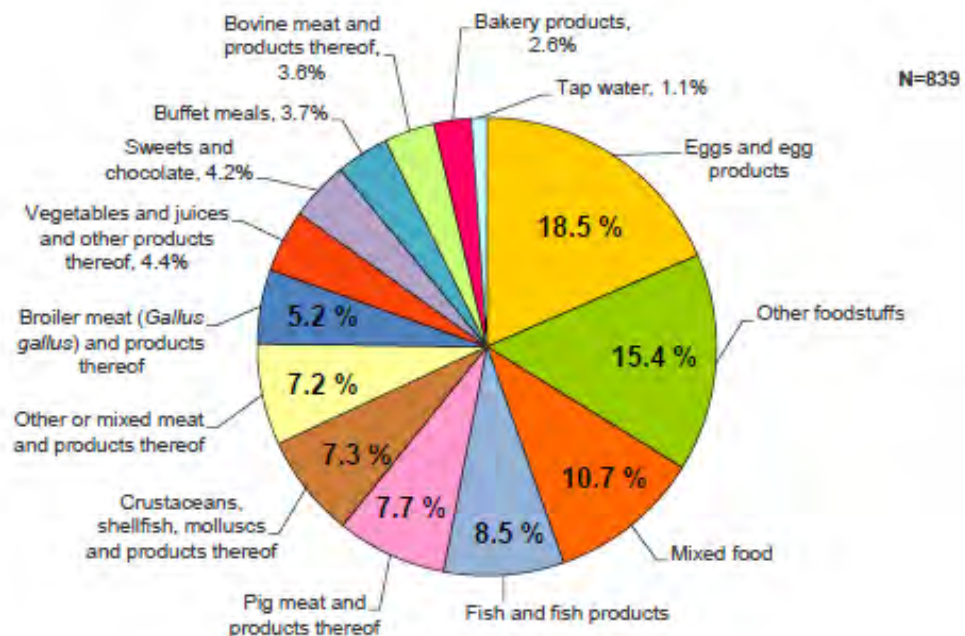


Figura 2: Alimentos causantes de enfermedades de transmisión alimentaria en la UE en 2013. EFSA Journal 2015.

En Europa, según noticia de la BBC (Anónimo, 2014), 12 personas murieron de listeriosis en Agosto de 2014 en Dinamarca a causa de fiambres contaminados, y en España un brote de salmonelosis a causa del consumo de pollo asado (según versión de la empresa, problema emanado del circuito de dosificación de la salsa de los pollos) afectó, en 2005 a 2.833 personas, con 1 fallecido, según comparecencia del presidente de la AESA (Agencia Española de Seguridad Alimentaria) en el Congreso de los Diputados (Otero Carballeira, 2007), y obligó a la retirada de más de 170.000 bandejas del alimento de las 190.000 distribuidas en el mercado.

Desde la década de 1990, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae* son las principales bacterias transmitidas por los alimentos, microorganismos que han persistido en la cabecera de la lista en el siglo XXI (OMS, 2007; Newell y cols., 2010). Enfermedades causadas por *E. coli* verotoxigénica o por *L. monocytogenes*, son menos numerosas, aunque, dada la seriedad de la enfermedad asociada, causan unas altas tasas de mortalidad (Carrasco y cols., 2012). Así, hay una creciente preocupación por *Listeria monocytogenes* (véase la razón de ello en casos como el expuesto de Dinamarca en el párrafo anterior). *Cronobacter spp.* (*Enterobacter sakazaki*) es una bacteria patógena oportunista que causa serias infecciones como enterocolitis necrotizante, bacteremia y meningitis en neoanatos y niños vulnerables (Lai, 2001; Hunter y Bean, 2013). La enfermedad causada por *Cronobacter spp.* no es frecuente, unos 6 casos por año en el mundo (Healy y cols., 2010), asociada a alimentos en polvo rehidratados (van Acker y cols., 2001; Iversen y cols., 2004), pero la mortalidad estimada es de un 80% (Lai, 2001).

Algunas enfermedades son bien conocidas, mas se consideran emergentes porque están ocurriendo en la actualidad con mayor frecuencia ocasionando brotes en diferentes países. Entre las bacterias patógenas emergentes y re-emergentes, significativamente en aumento, se encuentran: *Campylobacter spp.*, *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *E. coli* O157:H7 y *Yersinia enterocolitica* (FAO/WHO, 2002; Codex Alimentarius, 2003).

2.3. Principales microorganismos patógenos relacionados con carnes y productos cárnicos.

Las zoonosis son enfermedades infecciosas o parasitarias que se transmiten directa o indirectamente entre animales y seres humanos, por ejemplo al consumir alimentos contaminados o por contacto con animales infectados. En Tabla 2 podemos ver los casos de zoonosis detectados en la Unión Europea en el año 2013 y los microorganismos implicados en tales casos en la Figura 3.

Disease	Number of confirmed human cases	Hospitalisation				Deaths			
		Confirmed cases covered ^{(a),(b)} (%)	Number of reporting MS ^(c)	Reported hospitalised cases	Hospitalisation rate (%)	Confirmed cases covered ^{(a),(b)} (%)	Number of reporting MS ^(c)	Reported deaths	Case-fatality rate (%)
Campylobacteriosis	214,779	12.7	13	11,922	43.6	52.9	14	56	0.05
Salmonellosis	82,694	26.4	12	7,841	36.0	49.6	14	59	0.14
Yersiniosis	6,471	15.3	12	481	48.4	62.4	14	2	0.05
VTEC infections	6,043	41.1	16	922	37.1	59.3	18	13	0.36
Listeriosis	1,763	42.1	15	735	99.1	69.7	19	191	15.6
Echinococcosis	794	22.7	12	127	70.6	28.5	13	2	0.88
Q fever	648	NA	NA	NA	NA	51.2	11	2	0.61
Brucellosis	357	55.2	9	139	70.6	28.3	11	1	0.99
Tularaemia	279	26.9	8	39	52.0	46.2	9	0	0
West Nile fever ^(a)	250	20.8	3	52	91.7	90.8	6	16	3.4
Trichinellosis	217	74.7	7	106	65.4	82.5	8	1	0.56
Rabies	1	100	1	1	100	100	1	1	100

NA: not applicable as the information is not collected for this disease.

(a): For West Nile fever the total number of cases were included.

(b): The proportion (%) of confirmed cases for which the information on hospitalisation or death was available.

(c): Not all countries observed cases for all diseases.

Tabla 2: Casos de zoonosis en la UE en 2013, número de hospitalizados y número de fallecidos. EFSA Journal 2015.

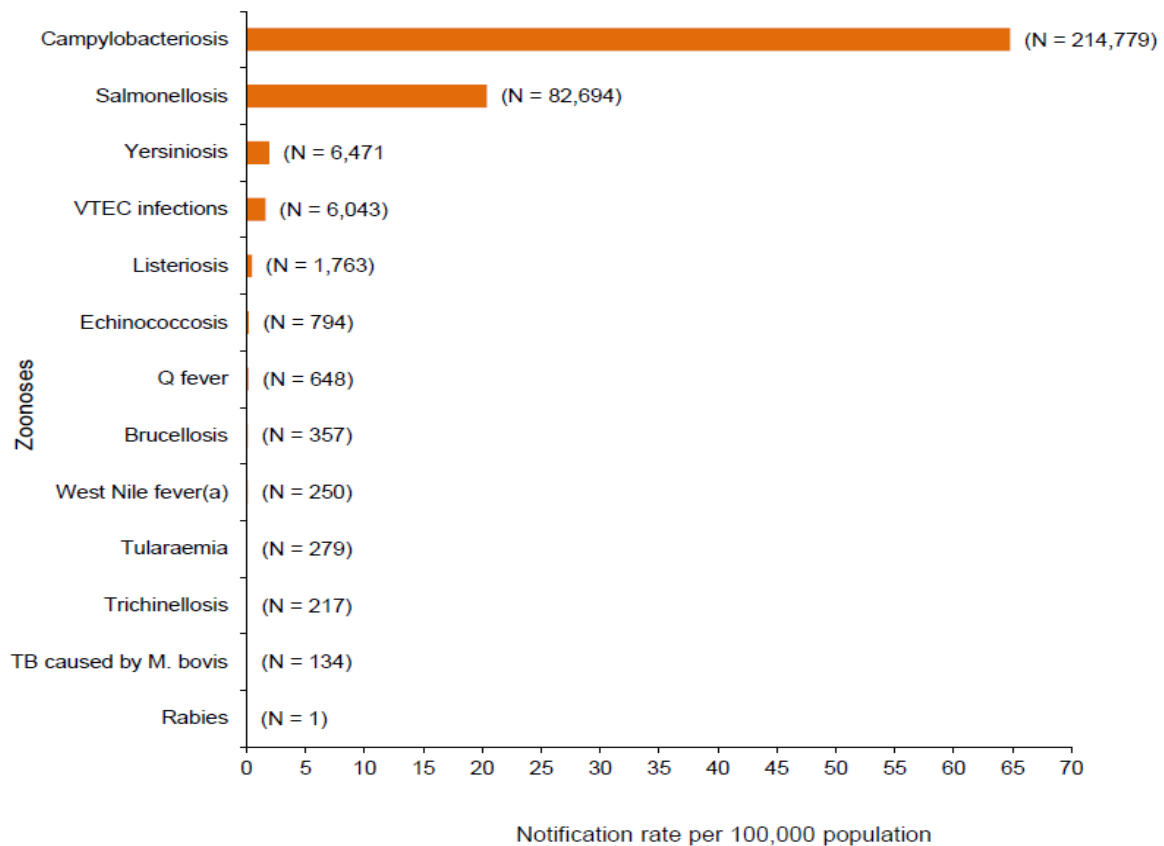


Figura 3: Casos notificados de zoonosis confirmados en la UE en 2013 por cada 100.000 habitantes. EFSA Journal 2015.

La carne fresca y los productos cárnicos son alimentos perecederos. La carne fresca se caracteriza por contener una cantidad elevada de nutrientes, presentar pHs entre 5,0 y 6,0 y valores de actividad de agua superiores a 0,98. Estas condiciones la convierten en un excelente medio de cultivo en el que prácticamente todos los microorganismos son capaces de crecer (Campbell-Platt, 1995), dado además, el elevado contenido en nutrientes. Estas características favorecen el desarrollo de microorganismos indeseables y la aparición de otras modificaciones de origen físico-químico y enzimático. En consecuencia, aunque la contaminación de la carne es difícilmente evitable durante el sacrificio del animal, requiriéndose a veces tratamientos de descontaminación específicos (Buncic y Sofos, 2012), el proceso de transformación y las condiciones de conservación de los productos acabados, deben dirigirse a mantener una serie de condiciones que impidan el crecimiento de microorganismos patógenos. Además, dichos tratamientos, deben retrasar al máximo el crecimiento de microorganismos alterantes, que, sin ser patógenos, pueden alterar las características organolépticas y/o la apariencia de los alimentos haciéndolos inaceptables para su consumo.

Por tanto, aunque para prevenir el deterioro, son numerosos los sistemas y procedimientos de tratamiento de los alimentos, ya sea en la propia industria o en el hogar del consumidor, el respeto por una cuidada e higiénica elaboración debe ser la base indispensable para la obtención de alimentos seguros y homogéneos. Sin embargo, esto no siempre ocurre: se ha estudiado, por ejemplo, la calidad microbiológica de productos de pollo (alas, muslos, salchichas, hamburguesas) expuestos en comercios minoristas en España y se ha observado que un alto porcentaje de las muestras analizadas presentan una excesiva carga microbiana, más acentuada cuanto mayor es el grado de procesado del producto, lo que pone de manifiesto que los productos de pollo podrían suponer un riesgo para la salud pública (Álvarez-Astorga y cols., 2002; Cápita y cols., 2003)

En cuanto a los embutidos crudos-curados, son productos cárnicos elaborados por selección, troceado y picado de las carnes y de la grasa del cerdo, incorporación de condimentos, especias y aditivos autorizados, embutido, maduración y secado. La estabilidad y el bajo riesgo sanitario de este tipo de productos se basa fundamentalmente en (Ordoñez y De la Hoz, 2001): i) el descenso de los valores del pH a causa de la fermentación microbiana de los hidratos de carbono, ii) la disminución de la actividad de agua debido a los solutos añadidos y la deshidratación durante la maduración, iii) la adición habitual de nitratos y nitritos que contribuye a prevenir el crecimiento de microorganismos y iv) las especias, con cierta actividad antimicrobiana.

La microbiota inicial de la masa cárnica de los embutidos crudos-curados es muy heterogénea, variable en función de los ingredientes utilizados y de las condiciones establecidas durante las operaciones previas al embutido. Esta microbiota inicial puede comprender lactobacilos, micrococos, enterobacterias, enterococos, pediococos, hongos, levaduras y patógenos tales como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* y *S. aureus* (Ordoñez y De la Hoz, 2001).

2.3.1. *Campylobacter*

Centrándonos en la existencia de microorganismos patógenos en el ámbito de carnes y productos cárnicos, capaces, fuera de control, de inducir enfermedad en el consumidor, infecciones con *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp. están entre las enfermedades en las personas más a menudo relacionadas con causas de origen animal (European Food Safety Authority, EFSA, 2013). Las bacterias *Campylobacter* son una de las principales causas de las enfermedades diarreicas de transmisión alimentaria del ser humano y las bacterias más comunes causantes de gastroenteritis en el mundo entero. En la mayoría de los países industrializados las infecciones por *Campylobacter* spp. son más frecuentes que las debidas a *Salmonella* spp., *Shigella* spp. o *E. coli* O157:H7 (Rosenquist y cols., 2006; OMS, 2011). Por lo general, se cree que la vía principal de transmisión son los alimentos, vía carne y productos cárnicos poco cocidos, así como a través de leche cruda o contaminada. Agua o hielo contaminados son también una fuente habitual de infección (OMS, 2011).

Aunque se conocen 17 especies diferentes de *Campylobacter* la mayoría de las infecciones humanas son ocasionadas por *C. jejuni* (89-96% de los casos) y, en menor grado, por *C. coli* (4-11% de los casos) y se consideran esporádicas individuales o cursan como brotes esporádicos familiares (Rosenquist y cols., 2006). Muchos estudios han confirmado que el manejo y consumo de canales de pollos constituye el mayor factor de riesgo en el desarrollo de las campilobacteriosis esporádicas humanas (Rosenquist y cols., 2006). Peyrat y cols. (2008), tras llevar a cabo investigaciones en cuatro mataderos de pollos, indican, en función de los resultados obtenidos, que *C. jejuni* es capaz de sobrevivir en el equipamiento de estas industrias después de aplicar los procedimientos de limpieza y desinfección.

En 2013, el número de casos confirmados de campylobacteriosis en humanos fue de 214.779, con un ratio de 64,8 casos por cada 100.000 habitantes, a niveles similares a los del año 2012. Se registraron 56 fallecidos (European Food Safety Authority, EFSA, 2015).

2.3.2. *Salmonella*

Actualmente *Salmonella* spp. Aparece como un serio riesgo de enfermedad alimentaria en el mundo entero según los datos obtenidos (Carrasco y cols., 2012). Se registraron 82.694 casos confirmados de salmonelosis en personas de la Unión Europea en 2013, un ratio de 20,4 personas por cada 100.000 habitantes, (si bien con una disminución del 7,9 % respecto del año anterior), con 59 fallecidos confirmados, representando la segunda enfermedad zoonótica en humanos más importante tras campylobacteriosis. (EFSA, 2015).

Varios factores tales como la multiplicación en alimentos debido a inadecuadas temperaturas de almacenamiento, tratamiento térmico insuficiente o contaminación cruzada están a menudo implicados en los brotes de salmonelosis (Ryan y cols., 1996; Todd, 1997). La principal ruta de transmisión de este patógeno son los alimentos de origen animal contaminados con materia fecal (Swartz, 2002; Haeghebaert y cols., 2003), aunque el consumo de carne de animales infectados con el microorganismo puede ser ocasionalmente también una fuente del problema (Tauxe, 1991; Benenson, 1995). Pollo, cerdo y vacuno han sido identificados como fuentes habituales de salmonelosis (Bacon y cols., 2002; Botteldoorn y cols., 2003). En Dinamarca y Alemania, la estimación de salmonelosis asociada al consumo de cerdo es del 15–20% de los casos de esta enfermedad en humanos (Borch y cols., 1996; Berends y cols., 1998).

Carrasco y cols. (2012) señalan como, en general, en áreas de preparación de alimentos, la aparición de *Salmonella* es debida a temperaturas de almacenamiento deficientes, tratamientos térmicos insuficientes o contaminación cruzada, además de la obvia procedencia a partir de contaminación fecal en alimentos de origen animal.

Salmonella puede permanecer viable en superficies de contacto con alimentos durante periodos significativos, incrementando el riesgo de contaminación cruzada entre manipuladores, alimentos y superficies de contacto (Humphrey y cols., 1994; De Cesare y cols., 2003). En contra de lo que pueda parecer, es sin embargo, según se indica en el estudio de Martín y cols. (2011), menos probable que este microorganismo sea problemático como remanente en el equipamiento de los elaboradores de productos cárnicos picados. De hecho, en 24 muestras de superficies con las que se trabajaba fue en su fase de producto fresco no se detectó *Salmonella*, tampoco en las 61 muestras de superficies en las que el producto estaba en fase de curación o como producto final, ni apareció en el producto final mismo. Sí en cambio apareció *L. monocytogenes* en el 11,8 % de las superficies muestreadas y un 15,8 % en el producto final.

Swanenburg y cols.(2001), toman 1.114 muestras de cerdos y canales de cerdo y 477 de aguas de drenaje e instalaciones de dos mataderos en dos días de muestreo diferentes para ambos lugares. Se halló *Salmonella* en más del 47% de las muestras (en canales únicamente en 1.4%; 19.6% en amígdalas, 9.3% en hígado, 9.3% en lenguas y 9.3% en nódulos linfáticos mesentéricos). El resultado en canales e hígado proporciona información sobre la higiene durante el proceso de sacrificio, y el resultado en amígdalas, lenguas, nódulos y heces (un 25,6 % de positivos en este caso), da información acerca del estado del animal antes del sacrificio. Por otra parte, en el 61% de las aguas de drenaje prevalecía *Salmonella*.

Hald y cols. (2003), exponen que en un muestreo de 12 mataderos de porcino de 5 países europeos, se halla un 5,53% de positivos de *Salmonella* en canales (de 3.845 muestras totales) y un 13,8% en muestras de superficies (de un total de 3.845), indicando que la prevalencia es mayor durante los meses cálidos de año. O`Leary y cols. (2013) caracterizan 172 aislados de *Salmonella typhimurium* tomados de una cadena de procesado de carne de cerdo, analizando su habilidad de producir biofilms y su potencial de sobrevivir en las superficies donde se procesan los alimentos. Se encontró que la mayoría de las cepas tienen capacidad para formar biofilms, y que el grado de éxito de su adhesión depende del tipo de superficie. Así mismo, se observó que las cepas que se pueden unir fácilmente a las superficies de acero inoxidable y plástico sobrevivir en altas concentraciones de cloro.

2.3.3. *Listeria monocytogenes*

Según datos de 2013 (EFSA, 2015), en la Unión Europea se registraron 1.763 casos confirmados de listeriosis (0,44 casos por 100.000 habitantes), con un incremento del 8,6 % con respecto a 2012. Esta baja tasa de afectados sin embargo conlleva una alta tasa de mortalidad, con 191 fallecidos.

Listeria monocytogenes es, como hemos visto con sobrada razón, desde hace décadas un microorganismo que causa honda preocupación entre los fabricantes de alimentos. Tiene un alto riesgo en alimentos listos para consumir como los lácteos, cárnicos o derivados de pescado y en vegetales o frutos crudos (EFSA, 2013; Ferreira y cols., 2014). La principal causa de transmisión a personas susceptibles, tales como embarazadas, ancianos o pacientes inmunodeprimidos, es el alimento contaminado (McLaughlin y cols., 2004). *L. monocytogenes* está ampliamente distribuida en el medio ambiente, siendo capaz de introducirse en la cadena alimentaria vía alimentos crudos, persistir en reservorios y recontaminar (contaminación cruzada) productos finales (Ferreira y cols., 2011; Fox y cols., 2011; Almeida y cols., 2013; Holch y cols., 2013; Parisi y cols., 2013). La bacteria es ubicua y puede transmitirse vía instalaciones de procesado, materias primas,

trabajadores, vehículos, máquinas y herramientas o materiales de limpieza (Reij y Den Aantrekker, 2004).

Es probable que la más importante ruta de contaminación radique en nichos de superficies y equipos colonizados por cepas persistentes que pueden sobrevivir a la limpieza y desinfección y causar contaminación cruzada entre los productos. Esta persistencia ha sido detectada a menudo durante varios años (Tompkin, 2002). Ortiz y cols. (2014) encuentran persistencia, con los métodos habituales de limpieza de una empresa de procesamiento de cerdo ibérico, de 8 de 29 cepas distintas de *L. Monocytogenes* en un periodo de tres años. Cepas de *Listeria monocytogenes* son con frecuencia localizadas en superficies de las industrias de alimentos, destacadamente en locales refrigerados, aunque sean rutinariamente limpiados y desinfectados. En su revisión, Mørretrø y Langsrud (2004) citan 21 estudios en los que la persistencia de cepas *Listeria monocytogenes* fue demostrada o supuesta. Similares estudios acerca de esta persistencia continúan publicándose, por ejemplo Williams y cols. (2011) encontraron una prevalencia promedio del 6,8 % de positivos de *Listeria monocytogenes* de 688 superficies muestreadas durante un año en seis pequeñas plantas de platos preparados cárnicos. Prencipe y cols. (2012) evalúan, con 774 muestras, la presencia y niveles de *Listeria monocytogenes* desde materia prima cárnica (canales de cerdo y jamón fresco) hasta producto final de la cadena de procesamiento de jamón de Parma (encontrando presencias en el 12,5% de los jamones frescos -sensiblemente mayor que en las canales de partida- y en el 2% del producto curado final).

2.3.4. *Escherichia coli*

Otro de los microorganismos estudiados con frecuencia con objeto de determinar las causas de su aparición en alimentos cárnicos es el *E. coli*, dada la virulencia del serotipo O157:H7. Según EFSA (2015) en 2013 se registraron en la Unión europea 6.043 casos confirmados debidos a *E. coli* verotoxigénico (VTEC), un 5,9 % más que en 2012, y con un total de 13 personas fallecidas.

Hoy se sabe que la mayoría de los casos de síndrome urémico hemolítico (SUH) son ocasionados por *E. coli* (Marzocca y cols., 2006). En un estudio en explotaciones porcinas tecnificadas y carne bovina del departamento de Córdoba (Argentina), los resultados mostraron una frecuencia de aparición de *Escherichia coli* O157: H7 del 2% en canales bovinas y del 10% en carne picada de porcino y bovino (Piedrahita y cols., 2001). En carne picada y chorizos del mercado municipal de Cumaná (Venezuela), 3 muestras de 256 confirmaron presencia de *Escherichia coli* O157:H7 (Bravo y cols., 2002). En carne picada fresca y hamburguesas congeladas obtenidas en supermercados de Argentina, se aisló *E. coli* O157:H7 en una sola muestra de carne picada fresca (2,7%) (Marzocca y

cols., 2006). En 100 muestras de menudos de pollo comprados en supermercados de Costa Rica, hubo 15 positivos de *Salmonella* y 3 de *E. coli* O157:H7 (Reuben, 2003).

2.3.5. *Yersinia*

En 2013 se registraron 6.471 casos confirmados de yersiniosis en la UE, constituyendo la tercera zoonosis más común. Hubo 2 fallecidos por esta causa (EFSA, 2015).

Desde 1960, *Yersinia enterocolitica* ha sido identificada como la causa más frecuente de enfermedades transmitidas por alimentos en humanos en países desarrollados, especialmente en zonas con temperaturas templadas. Según las cifras que maneja el Comité Científico sobre Riesgos Biológicos de la EFSA (BIOHAZ), en 2005 un total de 25 Estados miembros notificaron en la Unión Europea 9.662 casos de yersiniosis (de los que fueron confirmados 9.553), lo que refleja una incidencia de 2,6 afectados por cada 100.000 personas. En el año 2006, la cifra apenas llegó a casi los 9.000 (Chavarrías, 2008).

A pesar de que son diversos los alimentos procedentes de animales que pueden ser portadores de *Y. enterocolitica*, es el ganado porcino el que se infecta más que cualquier otra especie animal. (Chavarrías, 2008). Un total de 90 muestras de carne de vacuno, mitad mexicanas y mitad importadas, fueron recolectadas en estudio de Rubio Lozano y cols. (2013). El 27,78 % de tales muestras, analizadas por PCR, fueron positivas a *L. monocytogenes*, 8,89 % a *Salmonella* (ninguna de entre las importadas) y 28,89 % a *Y. enterocolitica*. Gill y Jones (1995) no detectan *Yersinia* en 48 lomos de cerdo tomados de dos mataderos (*Listeria monocytogenes* es aislada en 23 de 24 muestras de lomo de una de las plantas y en sólo una de 24 muestras en la otra -en la que se trabaja con una temperatura de escaldado mayor y se hace una mejor operativa de limpieza-). *Yersinia* es detectada de modo esporádico, con recuentos bajos, en muestras de superficies, con más frecuencia en la planta peor higienizada.

2.3.6. *Clostridium*

Las especies del género *Clostridium* implicadas con más frecuencia en enfermedades de transmisión alimentaria son *Clostridium perfringens* y *Clostridium botulinum*. Los clostridios se encuentran habitualmente en suelos, polvo, el medio acuático y en el intestino de los animales, en consecuencia, *C. perfringens* y *C. botulinum* pueden estar presentes en una amplia gama de alimentos (EFSA/ACSA, 2005).

La intoxicación causada por *C. perfringens* suele ser breve, autolimitante, y raramente resulta fatal (EFSA/ACSA, 2005). Sin embargo es uno de los microorganismos patógenos para el hombre, considerado como causante de infección grave, la denominada gangrena gaseosa, según se conoce desde 1892, y relacionado poco después, en 1895 y en 1899, con brotes de gastroenteritis en Londres. Finalmente, debido a la aparición de brotes asociados con las comidas de las escuelas y con platos de pollo precocinado en los EEUU (1945), *C. perfringens* es ratificado como una causa de intoxicación alimentaria (Alvarado Salinas, 2013).

Las toxiinfecciones causadas por *C. perfringens* se asocian comúnmente a platos cárnicos cocinados, productos cárnicos cocidos no curados, salsa de carne asada, estofados, albóndigas, etc., producidos a gran escala en establecimientos de comida preparada con servicio de catering, comedores sociales y similares. Casi todos los brotes son consecuencia de un enfriamiento lento de temperatura o de mantener la comida sin refrigerar. Los métodos de cultivo detectan todos los *Clostridium perfringens*, mientras que la enterotoxina es producida sólo por una parte de las cepas (EFSA/ACSA, 2005).

Se investigó la presencia y número de *Clostridium perfringens* sulfito reductores en hamburguesas comercializadas en mercados de la ciudad de Trujillo (Perú), 15 muestras de entre las preparadas artesanalmente y 15 de entre las procesadas industrialmente, procedentes de cada uno de los tres mercados evaluados. Las muestras de hamburguesas positivas a *C. perfringens* sulfito reductores fueron el 100% en las preparadas artesanalmente y el 0% para las muestras procesadas industrialmente. El recuento en las hamburguesas artesanales varió entre 30 y 90 ufc/gramo (Alvarado Salinas, 2013).

Las neurotoxinas de *Clostridium botulinum* en cambio, se encuentran entre los tóxicos naturales más potentes y pueden provocar intoxicaciones alimentarias graves, en algunas ocasiones fatales. El botulismo está causado por la ingestión de una neurotoxina formada cuando las esporas de *C. botulinum* tipos A, B, E o F germinan y se multiplican en una comida. El botulismo causado por comidas procesadas industrialmente suele estar asociado a un fallo en el proceso o en la integridad del envase o el contenedor. Históricamente, un porcentaje alto de brotes de botulismo se ha relacionado con conservas caseras o elaboradores artesanos de comidas caseras a pequeña escala (EFSA/ACSA, 2005). Aunque *C. perfringens* suele estar presente en alimentos e ingredientes, ocasionalmente en cantidades de centenares por gramo, *Clostridium botulinum* está presente con menor frecuencia, normalmente unas pocas esporas por kilogramo (EFSA/ACSA, 2005). Los clostridios, incluido *Clostridium botulinum*, pueden controlarse en los embutidos fermentados manteniendo el pH y la actividad de agua en valores bajos, independientemente de que se adicione nitritos. No hay evidencia práctica ni epidemiológica del crecimiento y

producción de toxinas por los clostridios durante la maduración y almacenamiento de embutidos curados. La toxina botulínica ha sido detectada sólo cuando el embutido se elabora sin glucosa adicionada y se mantiene a elevadas temperaturas (32,2 °C) durante periodos prolongados (Christiansen y cols., 1975). El crecimiento de esporas de *Bacillus* y *Clostridium*, procedentes principalmente de las especias utilizadas como ingredientes y, en menor medida, de la carne, se pueden controlar por la acción de los nitritos y valores bajos de pH y la actividad de agua (Nordal y Gudding, 1975).

2.3.7. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es ubicuo en los animales, y como tal es un contaminante habitual de la carne, de los productos cárnicos y de la leche. Se encuentra frecuentemente en carne fresca y en embutidos fermentados, habitualmente en niveles bastante bajos (Lücke, 1998). *S. aureus* vive en aire, polvo, aguas residuales, agua, leche y otros alimentos. Los humanos y los animales son reservorios primarios: un 30% de la población sana es portadora de *S. aureus* toxigénicos. Si se dan las condiciones para su multiplicación en el alimento, aumenta el riesgo de producción de toxinas. La intoxicación se produce habitualmente por el consumo de alimentos sometidos a tratamientos térmicos inadecuados (< 60°C), o sometidos a una manipulación considerable, o refrigerados a insuficiente temperatura (>7,2 °C) (Forsythe, 2010). El hábito de tocarse con las manos la cara mientras se elaboran alimentos incrementa el riesgo de contaminación con el microorganismo. El equipo contaminado también se relaciona como fuente del microorganismo, pues en varios brotes donde se involucró al jamón, la máquina loncheadora tenía la misma cepa enterotoxigénica que la presente en el alimento que causó la intoxicación. (Mota de la Garza y Fernández, 2012).

S. aureus puede tolerar las condiciones ambientales de los embutidos, pero resulta un pobre competidor frente a las Bacterias lácticas y cocos gram-positivos, catalasa-positivos (CGC+) empleados como cultivos iniciadores (Metaxopoulos y col., 1981 a y b).

De los brotes de intoxicación que se presentan, en promedio, el 20% se debe al consumo de alimentos contaminados con bacterias del género *Staphylococcus* y, principalmente, por la especie *aureus*. En México, según un estudio del Laboratorio Nacional de Salud Pública, entre 1980 y 1989, el 45% de los brotes confirmó al *Staphylococcus aureus* como agente causal, ocasionando 792 casos y 5 defunciones. (Mota de la Garza y Fernández, 2012)

Menéndez García (2012), en un muestreo de productos cárnicos comercializados en las regiones Castilla y León, halla presencia de *S. aureus* en 8 de 25 muestras de chorizo, 6 de 18 en salchichón,

8 de 19 en jamón, 3 de 16 en cecina y 13 de 18 en lomo embuchado. No se detecta presencia de *C. botulinum* en ninguna muestra (Mota de la Garza y Fernández, 2012). Talon y cols. (2007) toman 314 muestras de superficies de 54 pequeñas plantas de producción de productos curados del sur y este de Europa, una vez aplicados los procesos de limpieza y desinfección correspondientes. *Salmonella* es detectada en el 4,8% de las muestras, *Listeria monocytogenes* en el 6,7 % y *Staphylococcus aureus* en el 6,1%. Maquinaria, cuchillo y tablas de corte fueron identificados como puntos críticos. La variabilidad de contaminación residual entre las distintas fábricas, enfatizó la diferente eficacia de los procesos de limpieza y desinfección entre los distintos productores.

2.4. Contaminación fúngica en ambientes de procesado de alimentos cárnicos

La contaminación fúngica de los alimentos es un problema sanitario y tecnológico que afecta a numerosos productos alimenticios y que tiene causas muy diversas. Los hongos son un problema debido a sus esporas, que están muy bien adaptadas para ser diseminadas por el aire desde reservorios, como sistemas de ventilación, alfombras, cuartos de baño, paredes o superficies, entre otros (Gots y cols., 2003; Singh, 2005). Es así como han llegado a ser la cuarta causa más común de septicemia en pacientes hospitalizados, cuya infección es propagada por equipos y/ o dispositivos médicos (Paulo y cols., 2010). La toxicidad, hace referencia a las sustancias químicas altamente tóxicas producidas por los mohos denominadas micotoxinas (metabolitos secundarios), capaces de tener efectos tóxicos agudos, carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, inmunotóxicos y estrogénicos en humanos y animales. Las micotoxinas son producidas principalmente por la estructura micelial de los mohos bajo condiciones específicas. Sin embargo, se pueden encontrar también presentes en las esporas (D' mello y Macdonald, 1997; Van Egmond y cols., 2007; Reddy y cols., 2010).

El desarrollo de nichos ecológicos y la producción de gran número de esporas por parte de los hongos, previamente a su diseminación, suele llevarse a cabo en ambientes creados por el ser humano, como las superficies alimentarias, los lavaplatos, las cafeteras o los refrigeradores, donde se adaptan a microclimas. Estos se forman gracias a la condensación de humedad, formada en ambientes cerrados. Más aún, existen hongos capaces de soportar condiciones extremas (organismos extremófilos) como la temperatura, la presión o elevadas concentraciones de solutos (Singh, 2005; Nichols, 2005; Zalar y cols., 2011).

El desarrollo de mohosidad sobre alimentos suele pues ocasionarse en lugares cerrados, tales como cámaras, bodegas y secaderos, propios de la industria cárnica y quesera, dada la presencia de mohos y esporas en el ambiente y en las superficies (paredes, suelo y techo). La contaminación fúngica del aire tiene cada vez más importancia, desde el punto de vista de los riesgos para la salud, que se originan por las mismas esporas o por sus metabolitos microbianos (Fischer y Dott, 2003). Además, se considera un problema de especial relevancia, por constituir una enfermedad ocupacional o riesgo laboral en las industrias de elaboración de productos curados (jamón, embutidos y quesos) (Palmas y Meloni, 1997; Boisnault y cols., 2005), produciendo afecciones respiratorias e incluso alergias causadas por esporas de *Penicillium*, *Aspergillus* y *Mucor* (Palmas y Meloni, 1997).

Así, como se ha comentado, entre los productos que más frecuentemente son contaminados por los mohos se encuentran el jamón o los embutidos curados, que son sometidos a procesos de secado y maduración en instalaciones cerradas, sobre las que, habitualmente, no pueden realizarse tareas diarias de higienización. Esto es debido a la imposibilidad de trasladar toda la producción a otro lugar y a que los desinfectantes convencionales no pueden ser utilizados en presencia de alimentos. Consecuentemente estos locales tan solo se higienizan de modo efectivo tras periodos más o menos dilatados, al vaciarse cámaras o secaderos, lo que explica que en estos locales suelen presentarse elevados recuentos microbianos y fúngicos en superficies y ambientes, lo que puede transmitirse a los alimentos presentes. De hecho, resulta usual encontrar elevados recuentos de mohos tanto en las superficies como en el aire de cámaras, bodegas y secaderos y así lo han puesto de manifiesto diversos estudios en los que se ha analizado la contaminación fúngica del ambiente y de las superficies (Fente Sampayo, 2002; Skaar, 2004).

Mohos y esporas llegan a través del aire hasta la superficie de quesos, jamones o embutidos. Una vez en la superficie, las características del sustrato, rico en nutrientes y con una actividad de agua adecuada para el desarrollo de los diferentes hongos, hace que éstos proliferen con facilidad, llegando a observarse de forma visible sobre el producto (manchas coloreadas) y ocasionando olores y sabores anómalos, y cambios en la textura, que provocan una pérdida de calidad considerable e incluso el rechazo total del producto por parte del consumidor. Además esto origina incrementos de costes, debidos al cepillado imprescindible del producto, mermas asociadas, tratamientos de prevención con aditivos, disminución del valor comercial, etc. La aplicación de temperaturas de refrigeración es un factor limitante del desarrollo de la alteración bacteriana de los alimentos, sin embargo, numerosos géneros fúngicos pueden crecer a temperatura de refrigeración. Por este motivo, *Cladosporium herbarum* es la especie que

generalmente se observa en las paredes de las cámaras de refrigeración, a pesar de su limpieza y desinfección regular (Moss, 1999).

Los hongos pueden incidir adversamente en la salud humana mediante tres procesos: alergia, infección y toxicidad (Jarvis, 2002; Fisher y Dott, 2003; Singh, 2005). Sólo un número limitado de géneros de hongos son reconocidos como patógenos para el ser humano, entre ellos *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Coccidioides*, *Histoplasma* y *Cryptococcus* (Singh, 2005).

Los hongos comúnmente encontrados en carnes y aves son *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Monilia*, *Monascus*, *Mortierella*, *Mucor*, *Neurospora*, *Oidium*, *Oosproa*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Thamnidium* (USDA, 2010). Estos hongos pueden encontrarse también en otros alimentos.

En el caso del jamón curado, la población mayoritaria de mohos pertenece a los géneros *Penicillium* y *Aspergillus/Eurotium*, aislándose con menor frecuencia especies de los géneros *Alternaria*, *Aurobasidium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Paecylomyces*, *Syncephalastrum* y *Trichoderma*. El género dominante hasta mediada la etapa de maduración en bodega suele ser *Penicillium*, pero durante los últimos meses de la maduración este es desplazado por especies pertenecientes a los géneros *Aspergillus/Eurotium* (Ventanas, 2001).

3. Implicación de la contaminación cruzada en las Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETAs)

La transferencia bacteriana conocida como “contaminación cruzada” es un término general que hace referencia a la contaminación directa o indirecta, por parte de microorganismos, desde una matriz contaminada (alimentos, superficies de trabajo u operarios, entre otras) a otra matriz no contaminada. Por otro lado, el término “recontaminación” hace referencia a la contaminación de los alimentos después de haber sido sometidos a un tratamiento higienizante (Carrasco y cols., 2012). La contaminación cruzada juega un papel importante en la transmisión de patógenos a productos frescos. Un estudio realizado por la Organización Mundial de la Salud en 1995 (OMS, 2000), en el ámbito europeo, determinó que el 25% de los brotes de toxiinfecciones alimentarias estaban asociados a contaminaciones cruzadas, donde intervenían, como factores determinantes, superficies contaminadas, prácticas higiénicas ineficientes y la falta de higiene por parte de los manipuladores. Maukonen y cols. (2003) exponen que los microorganismos patógenos pueden

introducirse en el proceso de elaboración, siendo transferidos de un alimento a otro, y llegar a los productos finales a través de contacto directo, el personal de la fábrica (manipuladores de alimentos), las superficies que intervienen en el proceso, el aire del área de elaboración y las materias primas. Así pues, la vigilancia y control de la contaminación microbiana de las superficies es de especial relevancia, pues en las vías de contaminación se han visto implicadas superficies, equipos y/ o utensilios contaminados que entran en contacto directo con el alimento (Tabla 3).

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

Tabla 3: Brotes de origen alimentario por bacterias patógenas causados por un manejo inadecuado, principalmente contaminación cruzada e higiene insuficiente (Modificado de Reij y Den Aantrekker, 2004).

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

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

Los patógenos pueden estar presentes en las manos de un alto número de manipuladores de alimentos y, si se suma un bajo nivel de barreras, estos pueden ser, además de al producto, fácilmente transferibles a superficies que contactarán con alimentos. Allí podrían sobrevivir durante largos periodos de tiempo, siendo incluso viables después de la limpieza y desinfección, constituyendo una importante fuente de contaminación, lo que aumenta el peligro de contaminaciones cruzadas, con el consiguiente riesgo para la salud pública (Humphrey y cols., 1994; De Cesare y cols., 2003; Reij y Den Aantrekker, 2004; Tood y cols., 2010).

Hay muchos ejemplos de enfermedades alimentarias en las que las superficies y la manipulación han estado implicadas en la transmisión de patógenos. Entre otros, podemos destacar el brote ocurrido en el noroeste de la Costa del Pacífico en EEUU en 1993: algunos manipuladores de carne cruda trabajaban muy cerca de la zona de ensaladas frescas, lo que ocasionó una contaminación cruzada entre diferentes alimentos de la barra de ensaladas, causando un brote por *E.coli* O157:H7 (Jackson y cols., 2000). De forma similar, en 2007 una sola lechuga estuvo implicada en un brote por campylobacteriosis en Dinamarca. Este brote se originó a partir de pollo contaminado por el patógeno, que a su vez contaminó la lechuga de forma cruzada durante su elaboración (Andersen, 2007).

El origen de los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos en Europa se concentra en los hogares, ocupando el primer puesto, con un 37%. La causa principal se debe a la inadecuada manipulación y preparación de los alimentos, algo que coincide con el segundo origen de las ETAs: restaurantes, cafés y bares, con un 28,6% (Figura 4), y que, en su gran mayoría, han sido causadas por *Salmonella*. Por tanto, de nuevo hablamos de las contaminaciones cruzadas como algo a

prevenir (Anderson y cols., 2004; Kusumaningrum y cols., 2004; EFSA, 2009), aunque esta causa suele estar subestimada, puesto que no hay técnicas específicas para su detección. Para garantizar la prevención adecuada, un tema clave a tener en cuenta es la educación del consumidor. El riesgo de prácticas inseguras en la manipulación de alimentos y una higiene inadecuada son factores imposibles de controlar si no existe el concepto, previamente aprendido, en los consumidores (Van Asselt y cols., 2009; Carrasco y cols., 2012).

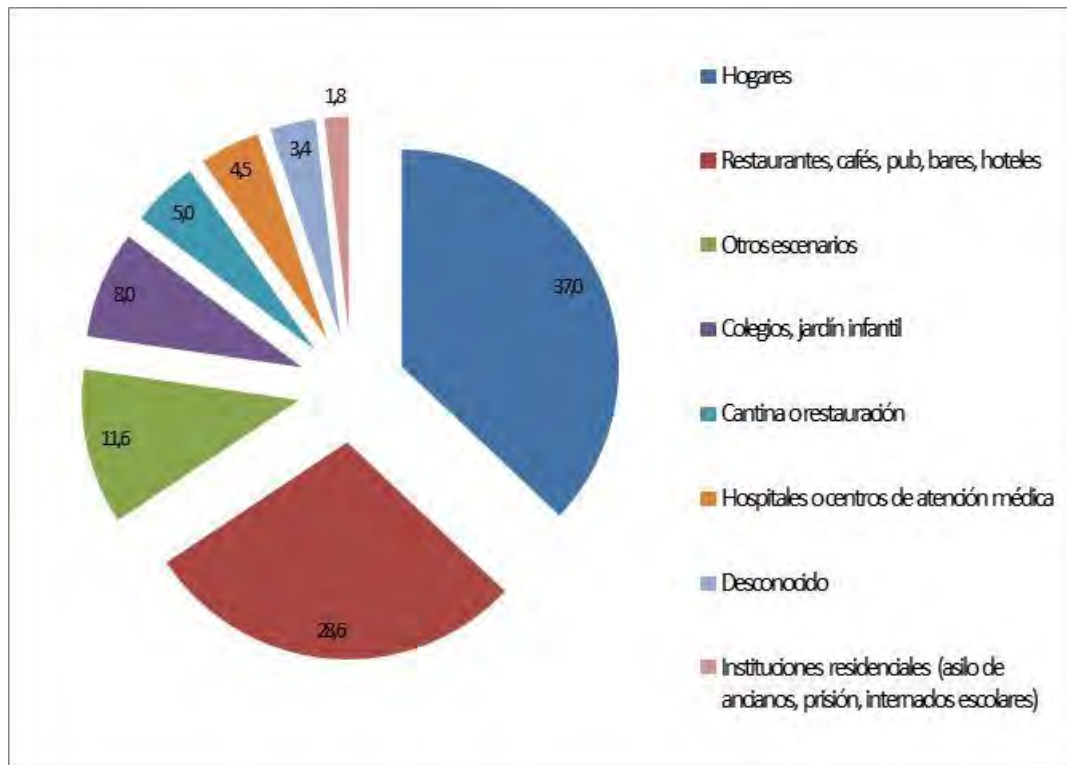


Figura 4: Distribución de los sectores implicados en brotes verificados de origen alimentario. Datos del 2007 donde están incluidos 2025 brotes sucedidos en 19 países miembros de la Unión Europea (EFSA, 2009).

Los platos preparados son una de las principales fuentes de riesgo de las ETAs, ya que pueden estar involucrados en eventos de contaminación cruzada debidos, no sólo a los manipuladores, sino también a utensilios, equipos y superficies, frecuentemente empleados en diferentes procesos (tablas de corte, mesas o encimeras donde se manipulan alimentos, cortadoras eléctricas con cuchillas de acero inoxidable, etc.) (EFSA, 2009).

Una fuente adicional de contaminación cruzada o de incremento de carga microbiana, fuera del ámbito estricto de las industrias, puede darse en las operaciones de transporte de alimentos. En la red de transporte y distribución de los alimentos podrían enfatizarse la necesidad de seguridad (en especial el aseguramiento de la refrigeración) y prevención de la contaminación cruzada

(Anónimo, 2001; Anónimo, 2003). La legislación vigente y los estándares de calidad, exigen que los equipos de transporte de alimentos, sean construidos permitiendo una apropiada limpieza y desinfección, mientras que los materiales utilizados en el interior (revestimientos interiores, probables superficies de contacto) deben ser impermeables, no tóxicos, de fácil limpieza y resistencia a la corrosión, astillado o descamado (Anónimo, 2003; Anónimo, 2005).

4. Superficies alimentarias

Las superficies o materiales en contacto con alimentos son todos aquellos objetos destinados a entrar en contacto directo o indirecto con los productos alimenticios (superficies desde las cuales existe un vertido sobre el alimento o sobre superficies que contactan con alimentos). Entre estas superficies también se incluyen utensilios y equipos. Como materiales de estas superficies encontramos el vidrio, papel, metales, plásticos, maderas, envases, mesas de proceso y utensilios de cocina (Hui, 2003; AECOSAN, 2014). Es de esperar a lo largo de la cadena alimentaria, que sobre las superficies, los microorganismos propios de los alimentos, del personal de trabajo y del medio ambiente (algunos con potencial patogénico), estén presentes (Verran y cols., 2008).

La retención de microorganismos sobre las superficies es indeseable, pues su presencia implica una biotransferencia potencial, que hace relación a la habilidad de ser transferidos desde un sustrato inerte a otro tipo de sustrato (hacia el alimento, el manipulador u otras superficies), cuyo resultado podría dar lugar a la transmisión y multiplicación de la contaminación desde la superficie afectada (Verran, 2002). De hecho, las superficies son una de las vías de contaminación de alimentos más frecuentes, tanto en la industria alimentaria, como en la restauración colectiva y en el hogar (Kusumaningrum y cols., 2003; Green-Brown, 2013). Los resultados, según estudio sobre 49 países (850 millones de personas), presentados en el séptimo informe (1993-1998) del programa de Vigilancia de la OMS para el control de las enfermedades transmitidas por los alimentos en Europa, revelaron que, de 17.157 brotes donde se identificaron las causas, el 17% fue atribuido a un manejo inadecuado, debido principalmente a la contaminación cruzada, al procesamiento inadecuado, a la higiene insuficiente y a la reutilización de despojos, y además a varios factores ambientales, siendo los más frecuentes la contaminación del personal o de equipos y el uso inadecuado de salas. Por otro lado, el 15% de los brotes fue atribuido al uso inadecuado de materia prima contaminada, tanto microbiológica como químicamente (Tirado y Schmidt, 2001).

Las superficies con muchos defectos de dimensión y distribución (perforaciones, pozos, grietas, soldaduras, articulaciones, uniones o poros) tienen poca facilidad de limpieza, siendo más propensas a permanecer con suciedad y, por ende, a ser un reservorio de microorganismos, debido a la cantidad de sitios de retención (Taylor y cols., 1998). Por otra parte, Hood y Zottola (1997) señalan, evaluando la situación de cuatro industrias cárnicas, que los desagües de las salas de trabajo proveen de un excelente medio de cultivo a los microorganismos para la formación de biofilms. Ruckerl y cols. (2014) hablan de la dificultad de erradicar una cepa de *L. monocytogenes* de los desagües de una empresa quesera durante un periodo de estudio de tres años, quizá en parte por la humedad adicional debida a la limpieza frecuente, pero, obviamente, ineficaz.

Varios factores muestran la influencia de retención de microorganismos sobre superficies orgánicas e inorgánicas: topografía (Whitehead y Verran, 2006; Verran y cols., 2010a), presencia de varios residuos de alimento y química general de la superficies (Whitehead y cols., 2006; Bernbom y cols., 2009; Verran y cols., 2010b), tipo de material involucrado (Teixeira y cols., 2008) y propiedades externas de la superficie del microorganismo involucrado (Liu y cols., 2007).

4.1. Requerimientos de las superficies alimentarias

Un aspecto crucial es el mantenimiento de la higiene de las instalaciones industriales, siendo clave el control de las superficies de trabajo, pues si no son correctamente higienizadas pueden dar lugar a la presencia de biofilms que actúen como focos continuos de exposición a bacterias patógenas y alterantes.

Uno de los argumentos decisivos al escoger materiales para líneas o equipos de procesado de alimentos, junto con sus propiedades mecánicas y anticorrosivas, es la de poseer condiciones higiénicas, tales como baja rugosidad de la superficie, alta limpiabilidad (facilidad de limpieza), alta desinfectabilidad, humectabilidad (determinada por la hidrofobicidad) y baja vulnerabilidad al desgaste. Todo ello influenciará la capacidad de las células para adherirse a una superficie (Van Houdt y Michels, 2010). Hay artículos que han comparado la eficacia de la higienización según el tipo de material a limpiar. Los materiales comúnmente utilizados en la industria de alimentos incluyen cementos recubiertos con resinas, plásticos, caucho, vidrio o acero inoxidable. De dichos materiales, el acero inoxidable es el más ampliamente usado para la fabricación de equipos y utensilios, demostrando ser altamente higiénico (Holah y Thope, 1990; Van Houdt y Michels, 2010). De especial importancia para la industria cárnica son, además del acero inoxidable

(componente habitual de útiles y máquinas en el procesado cárnico -cuchillos, mesas, picadoras, amasadoras, embutidoras, cutters, ganchos de colgado de carnes... -), los materiales plásticos, en especial polietileno de alta densidad, habitual en las tablas de corte de carne de salas de despiece.

También pueden adquirirse tablas de corte domésticas en PVC (cloruro de polivinilo). El PVC es por otra parte, junto con el acero inoxidable, componente habitual de tuberías de conducción de fluidos alimentarios o material de depósitos líquidos. Khamisse y cols. (2012) comparan la carga bacteriana de superficies de acero inoxidable y PVC en una sala de despiece de vacuno, antes y después de la limpieza y desinfección, concluyendo que es más efectiva la limpieza de acero inoxidable que la limpieza de materiales de PVC.

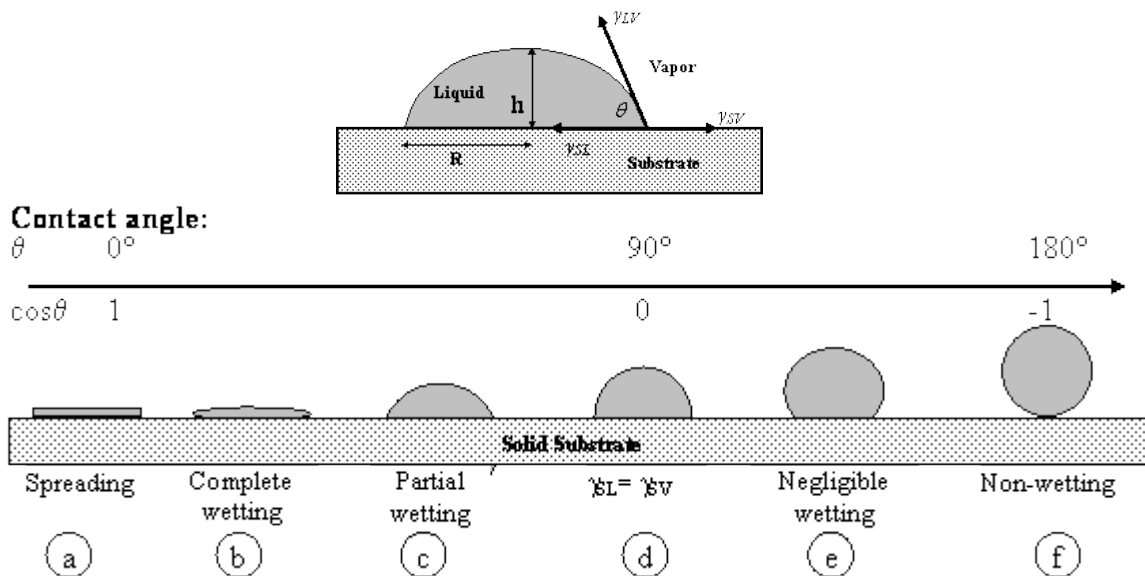
Como se sabe por su uso generalizado en nuestro país, en el ámbito doméstico igualmente se emplean las consabidas tablas de madera, prohibidas para empleo en industrias alimentarias. De modo sorprendente algunas publicaciones se decantan a favor del empleo de madera, demostrando que el uso de plástico en tablas de corte no es empíricamente mejor (Pretcher y cols., 2002; Boursillon y Rietmüller, 2005). Hay que considerar que es muy común localizar tablas de polietileno para corte muy deterioradas en las industrias. Goh y cols. (2014) incluso señalan, estudiando la transmisión de *L. monocytogenes* en tablas de corte hacia muestras de pollo cocinado colocadas encima, que esta era mayor en tablas de polietileno que en tablas de madera.

Las superficies deben ser diseñadas higiénicamente, evitando grietas y espacios muertos, para que un programa efectivo de limpieza y desinfección sea el método de control fundamental de las vías de contaminación de dichas superficies (Gibson y cols., 1999), ya que, para su limpieza, han de ser accesibles, planas, lisas y duras. El desgaste normal de las superficies alimentarias es inevitable, por lo tanto es necesario elegir una apropiada limpieza y desinfección para eliminar de ellas los microorganismos y la suciedad (Flint y cols., 1997). Para evaluar la naturaleza higiénica de una superficie, se utiliza el valor de la rugosidad media (R_a), un parámetro estadístico que describe el promedio de las ondulaciones con respecto a un eje central (Verran y cols., 2001; Whitehead y Verran, 2006). Chaturongkasumrit y cols. (2011) indican que las superficies de contacto directo con alimentos son la principal causa de contaminación cruzada en las líneas de procesado, en especial las cintas de transporte. Estos autores evaluaron el efecto de la rugosidad de cintas de transporte de poliesteruretano en la formación de biofilms de *Listeria monocytogenes* en industrias de carne de pollo en Tailandia, demostrando que, efectivamente, la rugosidad debe considerarse un indicador de la vida útil de las cintas de transporte. Parece por tanto obvio que la topografía juegue un papel importante en la limpiabilidad de las superficies, e incluso en la adhesión bacteriana mediante los sitios de protección que alojarían a los microorganismos evitando el estrés por cizallamiento (Jullien y cols., 2002; Jones 2009). Sin embargo, algunos estudios

(Hüsmark y Rönner, 1990; Barnes y cols., 1999) han fracasado en demostrar la relación entre los valores de R_a y la adherencia bacteriana y/o la facilidad de limpieza de la superficie.

Dentro de la industria de alimentos, el valor de R_a debe ser inferior de 0,8 micrometros (Flint y cols., 1997) y tal parámetro se utiliza para denotar una superficie adecuada para ese fin. Las propiedades de las superficies alimentarias han sido tenidas en cuenta por las autoridades legisladoras en cuanto a la determinación de las especificaciones de topografía de la superficie. Por ello, cada país desarrolla y aplica su normativa. Por ejemplo el "Standard US 3-A Sanitary Standard 01-07" (1990) de los EEUU, especifica que las superficies que entran en contacto directo con los alimentos requieren un grado de acabado nº 4, con un valor de R_a inferior de 0,8 micrometros, y deben estar libres de grietas y hendiduras (Frantsen y Mathiesen, 2009). Sin embargo, el desgaste y la abrasión pueden afectar el valor de la R_a de manera impredecible, y hemos de pensar que la reposición de superficies en la industria alimentaria implica la inversión correspondiente, lo cual está sujeto a la cuenta de resultados de las empresas y a la percepción e insistencia de responsables de producción y calidad, ambos aspectos variables según las distintas compañías. Es importante entonces eliminar adecuadamente la suciedad de las superficies alimentarias, garantizando procesos eficaces de limpieza (Anónimo, 2010).

Por otra parte, la influencia de la humectabilidad de la superficie sobre la higiene puede variar dependiendo de las cepas microbianas, sustratos y medios de suspensión (Hüsmark y Rönner, 1990; Flint y cols., 1997). La medida del ángulo de contacto, utilizando agua desionizada, es un método para definir la hidrofiliidad o hidrofobicidad de un material, también denominado humectabilidad.



Figuras 5 A y B (Njobuenwu y Oboho, 2007): Indican un ambiente en el cual una gota está en contacto con una superficie sólida, todo inmerso en un fluido externo (aire). En este sistema el ángulo de contacto se denota con la letra griega θ (ver en figura superior), que denota la situación del fluido 2 con respecto a

la superficie sólida. Si $\theta < 90$ grados el sólido es mojado por el líquido -casos a, b y c; si $\theta > 90$ grados no hay humectación -caso d-, mientras que $\theta = 0$ -caso a- y $\theta = 180$ grados -caso f-, denotan las situaciones extremas de completa o nula humectabilidad respectivamente.

Las superficies sobre las cuales se deja caer de agua y esta muestra un ángulo de contacto θ (*tita*) cerca de los 90° son definidas como hidrofóbicas, mientras que aquellas con bajo ángulo de contacto se describen como hidrofílicas. Si el ángulo de contacto está cerca de 150° , la superficie mostrará características de superhidrofobicidad, comúnmente conocido como “efecto lotus”. El caso opuesto también puede ocurrir, cuando se observa que casi no hay ángulo de contacto, tales superficies son definidas como superhidrofílicas (Wang y Jiang, 2007).

La universidad Metropolitana de Michigan ha estado investigando sobre las propiedades de las superficies higiénicas, particularmente sobre el acero inoxidable, para observar cómo mejorar su diseño afectando así la retención de residuos de alimentos y el reservorio de microorganismos (Anónimo, 2010).

Otro parámetro a tener en cuenta son las energías libres superficiales. Son muchos los estudios que han tratado este tema y la relación que implican estas energías respecto a la condición higiénica de las superficies (Jullien y cols., 2002).

Por último, otra de las características relevantes de las superficies en contacto directo con productos alimenticios, es la presencia de una película que mejore las propiedades de la superficie y, en consecuencia, afecte a la adhesión bacteriana (Hüsmark y Rönner, 1990; Mettler y Carpentier, 1998). La adhesión de las bacterias a las superficies es termodinámicamente favorable si la energía libre total de adhesión es negativa. Por lo tanto, si las superficies alimentarias tienen carga negativa, repelen las células microbianas porque su carga neta de superficie celular es negativa (Teixeira y cols., 2005; Jansen y Kohnen, 1995).

5. Higienización en la industria alimentaria. El problema de los biofilms.

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

los alimentos para el consumo nacional e internacional. El Codex de los Principios Generales de Higiene Alimentaria, en su última revisión, incluye directrices para la aplicación del sistema de APPCC (Codex Alimentarius, 2003).

Los criterios microbiológicos desempeñan un papel importante en la verificación global de cómo está funcionando un sistema APPCC (Sharma y Anand, 2002). Un sistema efectivo de APPCC involucra la identificación, evaluación y control de los peligros significativos para la seguridad del alimento (Bacon y Sofos, 2003; Maukonen y cols., 2003). Uno de esos peligros puede ser la contaminación de las superficies en contacto con los alimentos, especialmente si ha habido formación de agregados microbianos adheridos a las superficies de trabajo, conocidos como biofilms (Maukonen y cols., 2003)

El APPCC en las industrias agroalimentarias es una propuesta cuyo objetivo fundamental es gestionar, de la mejor manera posible, la seguridad de los alimentos a lo largo de la cadena de transformación de los mismos hasta el consumidor (Champiat y cols., 2001). Uno de los mayores peligros en la producción alimentaria continuará siendo la contaminación microbiológica, y es aquí donde el APPCC está siendo adoptado internacionalmente para garantizar la seguridad alimentaria (Vanne y cols., 1996). Esforzarse en establecer unas Buenas Prácticas de Fabricación (BPF), un adecuado APPCC y entrenar al personal es necesario en las industrias de alimentos para prevenir la entrada y remanencia de *Listeria monocytogenes* en el medio productivo (Halberg Larsen y cols., 2014).

Las operaciones sanitarias en una planta procesadora de alimentos contemplan i) el mantenimiento general de las instalaciones, ii) las sustancias usadas en la limpieza y desinfección, y un almacén de materiales tóxicos, iii) las fumigaciones, iv) la higienización de las superficies de contacto con los alimentos, y v) el almacenaje y manejo de los utensilios y equipos portátiles limpios (Hui, 2003). Existen muchos factores involucrados y una variedad de técnicas que deben ser usadas para efectuar esta tarea, entre las cuales se encuentran: i) la naturaleza química del limpiador y desinfectante, ii) el equipo y procedimiento de higiene, iii) la tecnología y microbiología concernientes al alimento, iv) las superficies de contacto con el alimento, y v) el uso de metodologías rápidas para controlar la higiene (Carsberg, 2003). La selección de detergentes y desinfectantes en la industria alimentaria depende de la eficacia, seguridad y capacidad de aclarado del agente, así como de si es corrosivo o afecta a los parámetros sensoriales del producto (Wirtanen y Salo, 2003).

Se entiende por higienización el tratamiento que reduce la población microbiana a niveles que se juzgan no perjudiciales para la salud pública. Su diferencia con la desinfección es que la

higienización implica una acción de limpieza, no imprescindible en la desinfección (García, 1989). Según Socías (1992), la higiene debe contemplarse como una etapa básica del proceso productivo, considerada como un requisito previo del sistema APPCC. Sin embargo, los biofilms microbianos no han sido especialmente destacados en el sistema APPCC, y la topografía y características de los biofilms en los ambientes de procesado de alimentos y el desarrollo de un plan de saneamiento, deberían ser considerados como pre-requisitos en el sistema APPCC. Al mantener un sistema APPCC actualizado, con la evaluación de biofilms en las plantas de alimentos, se proporcionará una información más clara de la contaminación y ayudará en el desarrollo de sistemas de procesado libres de biofilms en la industria de alimentos (Shi y Zhu, 2009).

La aplicación regular de procedimientos de limpieza y desinfección es una estrategia común empleada para el control de la implantación de patógenos en el equipamiento o en los propios productos (Jahid y Ha, 2012). El propósito de la implementación de un sistema de higiene es eliminar cualquier microorganismo patógeno y de alteración, sobre todas las superficies alimentarias (Hui, 2003). Este sistema debe basarse en un plan de acción con varias etapas, empleando un producto de limpieza y un agente desinfectante. Es así como algunos métodos físicos, tales como cepillos mecánicos; agentes químicos, como detergentes y enzimas biológicas, pueden aplicarse a un medioambiente industrial libre de biofilms (Kumar y Anand, 1998; Shi y Zhu, 2009).

Los conceptos de limpieza y desinfección son difícilmente separables en una industria alimentaria. La eliminación de la suciedad como objetivo de la limpieza significa a la vez la destrucción de la fracción principal de los gérmenes presentes. La principal misión de la desinfección, la destrucción de gérmenes, tampoco es exclusiva de los agentes desinfectantes. Las operaciones de limpieza, sobre todo las que se realizan a pH y temperatura elevadas, tienen actividad bactericida (Widbrett, 2000). Por otra parte es común el empleo de agentes espumantes promocionados también como desinfectantes (podemos ver referencias al respecto en webs de casas como Proquimia, Sealed-Air/ Diversey, Diasa, Sucitesa, etc. -en general todos los fabricantes de productos de limpieza y desinfección industrial-), que resultan muy atractivos para el industrial pues evitan una de las operativas del proceso de limpieza, con el consiguiente ahorro de costes de personal.

Además, los procesos de limpieza y desinfección en la industria alimentaria pueden tener otros propósitos (Lelieveld y cols., 2003):

- . Incrementar la vida útil y prevenir el daño de los equipos y superficies.
- . Proporcionar un ambiente de trabajo seguro y limpio para los empleados.

. Presentar una imagen favorable a las posibles visitas, demostrando así una buena gestión.

Las etapas del plan de higiene son (Wildbrett, 2000; Anónimo, 2000):

-Preparación del lugar: etapas preliminares que coinciden generalmente con las últimas operaciones de la fase de producción. Su objetivo es retirar todo aquello que pueda disminuir la accesibilidad o la eficacia de las etapas posteriores.

-Prelavado (preenjuague): etapa de limpieza previa que se realiza con agua fría o caliente, según el tipo de suciedad y el tipo de producto limpiador. El prelavado tiene como finalidad eliminar restos groseros de materiales alimenticios de las líneas de producción. Se debe evitar la aplicación de sistemas de alta presión, que podría dispersar las partículas hacia otras áreas de proceso (vía impulsión directa, vía gotas o microgotas ambientales. (Carpentier -2009- indica que las bacterias psicrótrofas pueden ser transferidas de superficies a carnes o de carnes a superficies tanto por contacto directo como vía aerosoles. Burfoot y cols. -2003- señalan que las operaciones de limpieza en las industrias de alimentos producen gotas aerotransportadas que pueden portar microorganismos de uno a otro sitio).

-Limpieza: se realiza mediante la aplicación mecánica de un agente limpiador o detergente y su finalidad es desprender y llevar en suspensión la suciedad adherida, visible o no, la cual podría favorecer el crecimiento de microorganismos.

-Aclarado: empleo de agua limpia a baja presión para la eliminación, tanto de la suciedad en suspensión, como del producto de limpieza.

-Desinfección: se aplica un agente desinfectante de forma manual o mecánica que reduce la microbiota remanente en las superficies y elimina los microorganismos patógenos.

-Aclarado final: Se utiliza agua potable para arrastrar los residuos de desinfectante empleados, evitando que se contaminen los alimentos.

-Secado: se debe realizar en la medida de lo posible, ya que el agua, además de favorecer el crecimiento microbiano, puede servir de vehículo diseminador si existen microorganismos presentes. El objetivo principal consiste en limitar la recontaminación y/ o el crecimiento microbiano.

Por otra parte, para la limpieza y desinfección de circuitos, tanques, depósitos, pasteurizadores, equipos de dosificación, llenado y envasado, etc. presentes en algunas industrias alimentarias que trabajan con fluidos, se emplean circuitos cerrados (sistemas CIP, "cleaning in place"), en los que se produce la circulación de líquidos o disoluciones limpiadoras a través de los equipos y

maquinaria a limpiar; los desinfectantes son distribuidos por gravedad o por bombas de flujo dentro de los equipos (Holah, 1995). La eficacia del CIP se basa en considerar que los residuos de tipo proteico generan espumas, que causan una disminución en la presión de lavado y en la energía cinética de la aspersion o el flujo de agua, de modo que, para evitar este efecto, los detergentes tienen una composición, en su mayoría, inorgánica, principalmente coadyuvantes y tensioactivos con poder espumante limitado (Altmajer-Vaz, 2004).

Estos sistemas, presentan ventajas por tratarse de un sistema automatizado, como el ahorro en personal y en la cantidad de agua y productos utilizados, aunque también presentan inconvenientes y problemas de formación de biofilms, con el agravante de que es mucho más difícil detectarlos al tratarse de sistemas cerrados. Liu y cols. (2014) señalan que, ante la dificultad para garantizar la esterilidad de las tuberías mediante las técnicas CIP tradicionales, ineficaces para la eliminación de biofilms, comienzan a emplearse enzimas en la limpieza de tal equipamiento (ver en Figura 6 la comparativa de actuación). En su estudio emplean *N-acetilmuramida glicanohidrolasa*, comparando su eficacia frente a técnicas tradicionales evaluando el agua circulante a su salida mediante Bart test y mediante fluorescencia con el *Clean-Trace™ ATP detector*, demostrando así la mayor eficacia del empleo de la enzima. En Figura 6 se presenta imagen del modo de actuación enzimático frente al tradicional CIP.

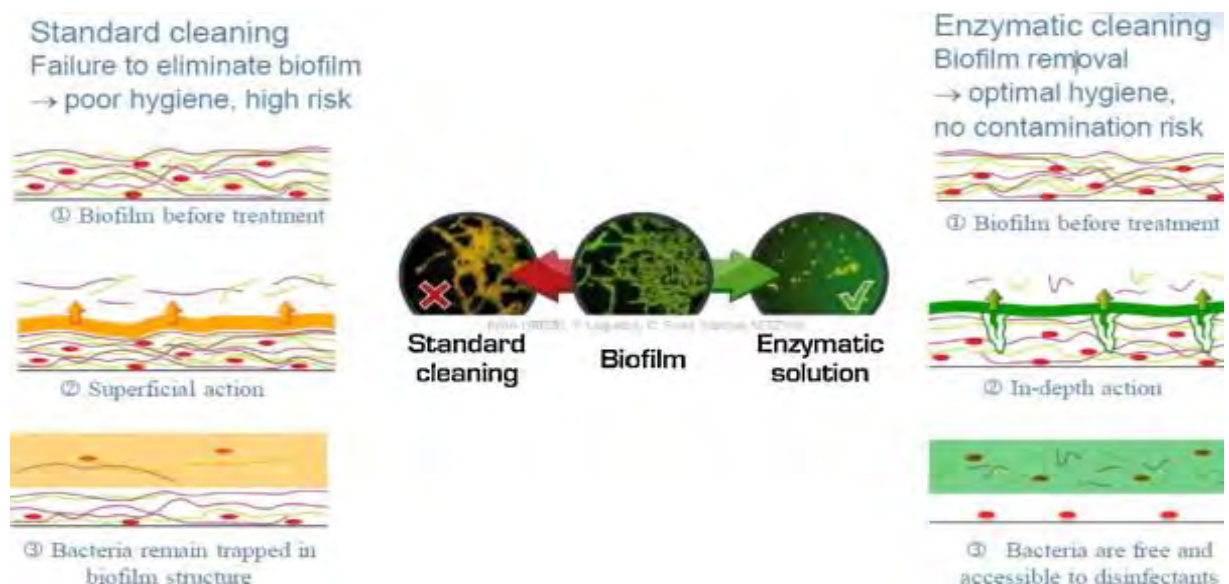


Figura 6: Comparación de la efectividad entre CIP tradicional y técnicas de limpieza enzimáticas (Liu y cols., 2014).

Austin y Bergeron (1995) extraen como resultados de su ensayo la conclusión de que los biofilms se desarrollan en las juntas de conducciones y equipos a pesar del empleo de métodos CIP para limpieza. Desde un punto de vista tecnológico, hoy día se sabe que los biofilms pueden ocasionar en los circuitos reducción del flujo de líquidos, reducción de la transmisión del calor, pérdidas energéticas, bloqueo de los poros de membranas y la corrosión de metales. En resumidas cuentas, todo ello se traduce en pérdidas económicas para las industrias.

Los factores que afectan a la eficacia de la limpieza son: i) las sustancias orgánicas interferentes, ii) la composición del limpiador, iii) la concentración del limpiador, iv) la temperatura, v) el tiempo de contacto, y vi) la velocidad o fuerza aplicada (Grönholm y cols., 1999; Stanfield, 2003) y el modo de agitación de la zona contaminada (Carsberg, 2003). Además, en un programa de seguridad alimentaria existen otros factores que contribuyen a una higienización total (Carsberg, 2003), tales como el tipo de material superficial presente en las industrias, la presencia o no de biofilms, la calidad microbiológica del agua empleada, la corrección de las secuencias de enjuague, el tiempo empleado en la limpieza, la existencia de instrucciones/ procedimientos y la frecuencia de la higienización. Incluso habría que remitirnos a la propia concepción de la industria, pues las estrategias para eliminar los biofilms en la industria de alimentos incluyen el diseño del lay-out de la planta, la elección de los materiales y equipamiento, y la correcta elección de detergentes y desinfectantes complementados con los adecuados métodos físicos de limpieza (Kumar y Anand, 1998).

Los métodos estándar de limpieza empleados en muchas industrias de procesado de alimentos, tales como limpieza álcali-base y ácido-base, son solamente adecuadas en la eliminación de la matriz del biofilm polimérico extracelular. Hay estudios que demuestran que algunos detergentes son bactericidas y algunos desinfectantes pueden despolimerizar los exopolisacáridos (EPS), permitiendo así la separación del biofilm de la superficie (Holah y cols., 1990). Cuando se optimizan los parámetros del proceso de limpieza y desinfección, tales como la formulación apropiada, concentración, tiempo de contacto, temperatura y energía cinética de flujo, se mejora drásticamente el resultado final.

La eliminación de biofilms es facilitada, además, por la aplicación de fuerzas mecánicas sobre la superficie durante la limpieza (Wirtanen y cols., 1996). La energía o acción mecánica es necesaria en el proceso de limpieza para separar la suciedad de las superficies, atacar los biofilms, dividirlos y romperlos, para finalmente mantenerlos en suspensión para evitar su redeposición. Esta acción mecánica se debe realizar sin dañar las superficies, ya que las abrasiones producidas podrían llegar a ser grandes reservorios de biofilms. La energía mecánica se puede aportar de diferentes modos: proyectando agua a presión, mediante fregado manual o automático y por circulación de líquidos.

Para optimizar cada uno de ellos es necesario realizar una serie de investigaciones, y así poder alcanzar el objetivo final, la eliminación del biofilm de todo tipo de superficies. Se deben realizar estudios para determinar las presiones de las proyecciones de agua más óptimas, sin olvidar el tiempo de aplicación y el grado de inclinación de la aplicación, para conseguir mayor fuerza de impacto y destruir en biofilm, pero sin ayudar a su dispersión y aumentar así la contaminación. Este tipo de estudios son, sin embargo, raramente aplicados en las industrias de alimentos, y nunca en las PyMEs.

Otros tratamientos alternativos para la eliminación de biofilms son los campos magnéticos, los ultrasonidos y la radiación ionizante. Esta última podría emplearse en los tratamientos de higienización sobre gran variedad de productos y superficies de contacto alimentario. La inactivación mediante plasma atmosférico se basa en especies reactivas al oxígeno y generación de radicales libres, vía descargas incandescentes que inactivan los microorganismos (Wirtanen y cols., 1996; Kumar y Anand, 1998). El empleo de plasma activado (mediante descargas eléctricas) de agua, PAW, es otra de las posibilidades de inactivación microbiana (Kamgang-Youbi y cols., 2009).

Las enzimas y las bacteriocinas también han demostrado ser estrategias de biocontrol eficaces, colaborando en la extracción de biofilms (Bridier y cols., 2014; Kumar y Anand, 1998). Compuestos naturales extractados de plantas aromáticas y aceites esenciales están siendo igualmente evaluados también por su potencialidad para erradicar biofilms, siendo eficientes para penetrar en su estructura (Bridier y cols., 2014).

Otro modelo en estudio para la eliminación de biofilms es el fundamentado en emplear bacterias propulsadas por flagelos con efecto tunelador para perforar paredes del biofilm, lo que facilita la acción posterior de los desinfectantes (Houry y cols. 2012).

5.1. Limpieza

La limpieza es la operación donde se elimina, de una determinada superficie, la suciedad visible o invisible que pueda presentar, previniendo la acumulación de residuos que lleguen a potenciar el crecimiento de microorganismos. La acción de separar la suciedad del sustrato, poniéndola en una solución o dispersión, se denomina detergencia (Leveau y Bouix, 2002). Se realiza mediante detergentes, escogidos considerando el tipo de alimento a procesar y la suciedad que puede llegar a generar, las propiedades físico-químicas de las superficies donde se elaboran, así como el

crecimiento microbiano sobre las superficies y equipos de proceso (Troller, 1993). Los agentes limpiadores generalmente incluyen componentes que mojan y penetran en la suciedad, lo que facilita su movilización (Wilbrett, 2000).

El objetivo primario del proceso de limpieza es la eliminación de productos residuales. Indirectamente la eliminación de estos residuos es un primer punto crítico en el control de biofilms. La elección de los métodos adecuados para la rotura y eliminación, mecánica o química de la matriz exopolisacárida es esencial para el éxito en el control del biofilm en la industria de alimentos, ya que la matriz protege los microorganismos contra los efectos de los detergentes y desinfectantes (Blenkisopp y cols., 1992; Zottola y Sasahara, 1994).

Los principios básicos de una adecuada limpieza incluyen los siguientes fundamentos (Stanfield, 2003):

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

El proceso de limpieza puede remover hasta un 90% o más de los microorganismos asociados a una superficie, pero no puede por sí solo eliminarlos (Gibson y cols., 1999). Sin embargo, un procedimiento de limpieza efectivo debe fragmentar la matriz exopolisacárida del biofilm, de tal manera que los desinfectantes accedan a las células viables (Chmielewski y Frank, 2003).

Es necesario e indispensable un tratamiento de limpieza conveniente para llevar a cabo una desinfección eficaz, debido a que algunos productos residuales podrían inactivar el agente desinfectante y los microorganismos sobrevivirían a dicho tratamiento (Mostert y cols., 2005).

Existen tres características fundamentales que debe tener un producto de limpieza:

- Poder quelante: capacidad de secuestrar los minerales e impedir que cristalicen, precipiten e incrusten en los materiales con los que contactan.
- Poder desengrasante: capacidad para dispersar y emulsionar grasas.
- Poder dispersante: capacidad de disgregar las partículas de la suciedad y mantenerlas en suspensión.

La mayoría de los productos químicos limpiadores empleados en la industria alimentaria son compuestos alcalinos, actuando como detergentes capaces de romper las proteínas por acción de iones hidroxilo. A su vez saponifican las grasas y a altas concentraciones pueden actuar como bactericidas (Lelieveld y cols., 2003). Además, pueden ser empleados en combinación con agentes secuestrantes (quelantes) y humectantes aniónicos (compatibles con limpiadores ácidos o alcalinos). La limpieza con agentes quelantes, especialmente el EDTA, es más efectiva que la limpieza con ácido en la remoción de biofilms (Wirtanen y cols., 1996). Sin embargo, cuando se requiere la eliminación de residuos específicos sobre las superficies, como incrustaciones de capas de proteínas, depósitos de minerales o incrustaciones lácticas, se hace necesario el empleo de detergentes ácidos (Widbrett, 2000). Por otro lado, los agentes humectantes no iónicos son utilizados especialmente por su buen comportamiento para la eliminación de suciedad grasa por solubilización y emulsificación, y por su actividad antiespumante (Chmielewski y Frank, 2003; Bajpai y Taylor, 2007). Otra alternativa importante, tanto a nivel biológico como medioambiental, es el uso de enzimas, capaces de catalizar reacciones de hidrólisis de moléculas complejas (proteínas y lípidos, entre otros), generando estructuras simples y de fácil eliminación (Atmajer-Vaz, 2004).

5.2. Desinfección

Para evitar los riesgos de la contaminación microbiológica de los alimentos, es importante que las superficies de todos los equipos y útiles que se utilizan, así como los locales de elaboración y de almacenamiento y las superficies sin contacto directo con los alimentos, se encuentren libres de contaminación microbiológica. Mediante la desinfección se eliminan microorganismos patógenos y se reducen los alterantes hasta un nivel seguro. La desinfección es pues definida como el tratamiento de las superficies y equipos, utilizando medios físicos o químicos, para la eliminación total de patógenos y reducir la cantidad de microorganismos presentes a un nivel seguro y/o prevenir el desarrollo microbiano en la superficie durante el periodo de producción, evitando así su transferencia al producto y al consumidor (Holah, 1995; Lelieveld y cols., 2003; Mostert y cols., 2005). Para una adecuada desinfección, primero debe asegurarse el contacto directo de la solución desinfectante con los microorganismos. A este respecto, la finalidad de las operaciones de limpieza es hacer accesibles los microorganismos a los productos desinfectantes (Widbrett, 2000).

La eficacia de la actividad antimicrobiana de la mayoría de los desinfectantes puede ser alterada debido a varios factores (McDonnell y Russell 1999; Stanfield, 2003):

a. La concentración del desinfectante. En general, si bien hasta cierto punto, el incremento de la concentración está usualmente relacionado al incremento exponencial de la efectividad. A mayor concentración de desinfectante mayor es la muerte microbiana (Holah, 1995).

b. La temperatura de la solución. Comúnmente la mayoría de los desinfectantes incrementan su actividad a mayor temperatura. Deben tener la capacidad de actuar en un rango de temperatura desde los 5°C a los 55°C, teniendo en cuenta que un aumento en la temperatura incrementa la actividad del compuesto químico (Holah, 1995; Herruzo, 2000).

c. El pH de la solución. Influye notablemente sobre la efectividad de los desinfectantes. Por ejemplo, los yodóforos y el cloro disminuyen en su efectividad con el aumento del pH.

d. El tiempo de exposición. El tiempo requerido para llevar a cabo la destrucción de microorganismos dependerá también de las poblaciones de los microorganismos presentes, la susceptibilidad diversa al desinfectante, la adhesión celular, la formación de esporas, etc. Cuanto más dure la exposición más organismos serán destruidos. El tiempo más usualmente elegido debe estar en torno a los 5 minutos, durante el cual deben ser capaces de asegurar un efecto biocida (Holah, 1995).

e. La carga orgánica. Presencia de microorganismos o residuos alimentarios. A una mayor carga microbiana se requiere mayor concentración de desinfectante o mayor tiempo de contacto (Herruzo, 2000). La presencia de materia orgánica reduce el efecto de los desinfectantes, debido a la reacción química o estructural que pueda ocurrir (Holah, 1995), de ahí la importancia de las operaciones previas de las fases previas de la limpieza y de la acción del detergente.

f. Composición de la población microbiana. Los microorganismos, en función de su estructura celular, composición y fisiología, presentan diferencias en su susceptibilidad o su respuesta ante los antisépticos y desinfectantes (McDonnell y Russell, 1999).

g. Tipo de superficie: La naturaleza, calidad y accesibilidad de las superficies alimentarias, así como de los materiales, determinan la aptitud para la limpieza y desinfección de los mismos (Anónimo, 2001b).

Es de esperar que los productos de limpieza y desinfección estén libres de microorganismos indeseables y deben ser seguros y apropiados para el alcance de los objetivos deseados (Stanfield, 2003). Sin embargo, aunque los desinfectantes han sido desarrollados para destruir

microorganismos, estos han sido encontrados en soluciones debido a su habilidad para formar cepas resistentes y al efecto protector de los biofilms (McDonnell y Russell, 1999; Wirtanen y Salo, 2003). Algunos estudios han descrito la presencia de *Pseudomonas* sp. en soluciones concentradas de yodo y *Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *Flavobacterium meningosepticum* y *Pantoea agglomerans* en soluciones de amonio cuaternarios y aldehídos (Wirtanen y Salo, 2003).

Es importante mencionar que incluso una cuidadosa limpieza y desinfección no da lugar a una planta de procesamiento “estéril” (Bagge-Ravn y cols., 2003), por lo que es indispensable una elección y uso adecuado de los productos limpiadores y el empleo de desinfectantes efectivos sobre los microorganismos adheridos a las superficies para minimizar la contaminación de los alimentos, aumentar su vida útil y reducir los riesgos de enfermedades alimentarias (Wirtanen y Salo, 2003). En ocasiones los usuarios tienen expectativas no realistas acerca del espectro de actividad del desinfectante aplicado. La mayoría de los empleados en superficies abiertas no eliminan esporas, y la aplicación de la desinfección se convierte así en un proceso de selección para esos microorganismos.

5.2.1. Requisitos de los desinfectantes

Un desinfectante es un biocida que destruye o inhibe el crecimiento de los microorganismos sobre superficies u objetos inanimados (McDonnell y Russell, 1999). El término biocida es cada vez más usado para describir compuestos con actividad antiséptica, desinfectante o, algunas veces, conservante (Russell, 2002). A nivel legislativo, los tipos de productos biocidas se reúnen en 4 grupos principales: desinfectantes, conservantes, control de plagas y otros productos biocidas. La desinfección, como etapa final de un programa de higienización, está diseñada para eliminar residuos de productos y cuerpos extraños, además de reducir el nivel de microorganismos patógenos y de alteración para asegurar, tanto la calidad como la seguridad del alimento (Taylor y cols., 1999).

Teniendo en cuenta la diversidad de microorganismos a eliminar y las distintas superficies donde deben actuar los agentes desinfectantes, estos deben cumplir las siguientes propiedades para que su empleo sea eficaz y seguro (García, 1989; Widbrett, 2000; Wirtanen y Salo, 2003):

1. No debe transmitir olores ni sabores extraños a los alimentos.
2. Baja toxicidad por inhalación o irritantes para la piel a la dosis de empleo.
3. No alterar las superficies a tratar (no corrosivo).

4. Amplio espectro de acción bactericida de efecto prolongado a las condiciones de usos (tiempo de contacto, temperatura, pH, grado de contaminación).
5. Estables frente a residuos orgánicos y aguas duras.
6. Solubles en agua garantizando su eliminación con el aclarado.
7. No generar resistencia.
8. Respetuosos con el medio ambiente.
9. Bajo coste.

Los biocidas están regulados en la Unión Europea desde el año 1998, según la Directiva 98/ 8. En ella se señalan las condiciones para que las empresas puedan presentar los recursos a las comisiones de la UE, con el fin de evaluar aspectos concernientes a la sustancia concreta que se quiere comercializar, incluyendo, obviamente, su toxicidad y eficacia. Una vez aprobados los biocidas, los estados miembros dispondrán que no sean comercializados ni utilizados en su territorio a menos que hayan sido autorizados en virtud de la legislación vigente del país, que ha de crear un registro nacional, donde se expongan los biocidas permitidos con su correspondiente uso.

5.2.2. Tipos de desinfectantes en la industria alimentaria

Existe una gran variedad de desinfectantes empleados en la industria de alimentos que, por lo general, pueden contener uno o varios principios activos. Además, contienen otras sustancias como álcalis, inhibidores de la corrosión y formadores de complejos, que permiten mejorar sus propiedades de aplicación (Kiermeier y cols., 2000).

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

La Tabla 4 muestra los diferentes mecanismos de acción de los principales desinfectantes aprobados para su uso en la industria alimentaria. Los productos más comúnmente utilizados son los componentes que liberan cloro, los compuestos de iodo (yodóforos), los compuestos de amonio cuaternario (QACs), los alcoholes, los aldehídos, peroxígenos, los anfóteros, biguanidas, bisfenoles y metales pesados (Criquelion y cols., 2002; Lelieveld y cols., 2003; Stanfield, 2003; Wirtanen y Salo, 2003).

Desinfectante	Objetivo	Modo de acción
Halógenos	ADN, proteínas, enzimas	Inhibición de la síntesis de ADN, oxidación de grupos tioles a disulfuros. Sulfóxidos y disulfóxidos
Yodófos	Ácidos nucleicos, proteínas, membranas celulares	Altera las membranas celulares, precipita los ácidos nucleicos y actúa disminuyendo los requerimientos de oxígeno de microorganismos aerobios, posee poderosa actividad germicida.
QACs	Membrana citoplasmática	Daños generales en la membrana involucrando la bicapa fosfolipídica. En bajas concentraciones afecta la integridad de la membrana, a altas concentraciones causa coagulación del citoplasma. Inducción de fugas de aminoácidos.
Alcoholes	Membrana plasmática	Desnaturalización de proteínas.
Aldehídos	Pared celular y membrana celular	Entrecruzamiento de proteínas de la pared celular y la membrana externa.
Peroxígenos	Efectos sobre el ADN	Inhibición de síntesis de DNA por formación de radicales libres hidroxil (OH), los cuales oxidan los grupos tioles de enzimas y proteínas.
Derivados de metales pesados	Interacción con grupos tiol	Enzimas vitales de membrana. Los iones de los metales interactúan con los ácidos nucleicos. Ruptura de ADN.
Biguanidas	Membrana citoplasmática y plasmática	Interacción con la membrana citoplasmática de bacterias y plasmática de levaduras.
Bisfenoles	Bicapa fosfolipídica	Interacción con las enzimas de la membrana citoplasmática, afectando la permeabilidad.
Anfóteros	Proteínas	Síntesis proteica con falsos aminoácidos.

Tabla 4: Principales desinfectantes y su mecanismo de acción (Modificado por Denyer y Stewart, 1998; McDonnell y Russell, 1999; Wirtanen y Salo, 2003; Mostert, 2005).

a) Halógenos

El cloro gaseoso, hipoclorito de sodio y los derivados clorados, en presencia de agua, producen ácido hipocloroso (HClO), que es el que les confiere la actividad desinfectante (Criquelion y cols., 2002; Leveau y Bouix, 2002), y que está considerado como el biocida más potente en mezcla acuosa (Johansson, 2007). Poseen varios inconvenientes, como pueden ser su riesgo de corrosión, sensibilidad a las materias orgánicas e inestabilidad ligada a la temperatura y al pH, con generación de compuestos perjudiciales para el medio ambiente (Criquelion y cols., 2002; Lelieveld y cols., 2003).

b) Yodóforos

En ellos se incluyen compuestos minerales (yoduro de potasio) y orgánicos (yodóforos). Son ampliamente utilizados para higienizar equipos y superficies de procesamiento de alimentos (Mostert y cols., 2005). Su principal ventaja es su amplio espectro de actividad (bacterias, hongos, virus); como inconvenientes más importantes encontramos la coloración que producen sobre los materiales plásticos o sobre la piel, su inestabilidad ligada a la temperatura y su elevado coste. El uso principal de estos compuestos es como antiséptico y sólo la forma yodófora es utilizada como desinfectante de superficies, ya que es más segura química y toxicológicamente (Mostert y cols., 2005).

c) Compuestos de amonio cuaternario

Principios activos muy empleados, como desinfectantes o como antisépticos. Sus propiedades son aprovechadas en desinfección estática de materiales, desinfección de equipos, de superficies por pulverización y de tuberías (Criquelion y cols., 2002; Leveau y Bouix, 2002). Dentro de sus ventajas cabe destacar su baja toxicidad, su estabilidad en amplios rangos de pH y temperatura y que no son corrosivos. Entre sus desventajas figuran su alto poder espumante y su falta de acción frente a virus (Criquelion y cols., 2002).

d) Alcoholes

Principalmente se utilizan etanol e isopropanol. Debido al elevado coste, poder disolvente y carácter volátil, son utilizados en pequeñas aplicaciones, como en puntos de difícil acceso de los equipos o en limpieza rápida de superficies y balanzas (McDonnell y Russell, 1999; Mostert y cols., 2005). Tienen un amplio espectro de acción antimicrobiana contra células microbianas vegetativas, virus y hongos; pero no contra esporas bacterianas y su actividad fungicida es reducida (McDonnell y Russell, 1999; Leveau y Bouix, 2002; Mostert y cols., 2005).

e) Aldehídos

Los más comúnmente utilizados de entre los aldehídos son formaldehído y glutaraldehído. El formaldehído posee un espectro antimicrobiano homogéneo sólo a concentraciones elevadas. No es corrosivo, tienen una amplia actividad en desinfección por vía aérea, es fácil de enjuagar y es económico; como inconvenientes están su olor desagradable, su poder lacrimógeno y los posibles riesgos tóxicos por inhalación (Criquelion y cols., 2002). Por otra parte el glutaraldehído es empleado en combinación con otros principios activos, como el formaldehído y los amonios cuaternarios, para desinfección de tuberías, depósitos y equipos (Criquelion y cols., 2002; Leveau y Bouix, 2002).

f) Peroxígenos

Ácido peracético, peróxido de hidrógeno y ozono son los principales agentes liberadores de oxígeno (oxidantes), siendo el ácido peracético el de mayor eficiencia conocida en términos de actividad antimicrobiana. Se trata de un desinfectante eficaz en un amplio espectro (bacterias, hongos, virus y esporulados), que no es espumante y se aclara fácilmente. Sus principales desventajas radican en la inestabilidad con la temperatura, la sensibilidad a materias orgánicas y sus vapores irritantes (Criquelion y cols., 2002). El peróxido de hidrógeno, que actúa mediante un mecanismo de acción basado en la generación de radicales libres OH, tiene actividad particularmente frente a esporas, es más activo sobre bacterias Gram positivas que sobre bacterias Gram negativas, y aún más sobre bacterias anaerobias, no provistas de catalasa, que sobre aerobias (McDonnell y Russell, 1999; Leveau y Bouix, 2002). Su empleo puede resultar problemático pues puede ocasionar daño ocular serio en caso de incidente con el personal. El ozono tiene efecto sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, esporas bacterianas y fúngicas, pero su desventaja radica en su toxicidad, pues a concentraciones elevadas es tóxico para el hombre, ocasionando afecciones del tracto respiratorio (Guzel-Seydim y cols., 2004; Pascual y cols., 2007).

g) Anfóteros

Los anfóteros tienen buenas propiedades detergentes y esterilizantes (Lelieveld y cols., 2003). Presentan actividad antimicrobiana contra bacterias, hongos virus y esporas, a concentraciones de principio activo extremadamente débiles (Criquelion y cols., 2002; Lelieveld y cols., 2003). Como ventajas destacan la ausencia de olor, baja toxicidad y escasa sensibilidad a materias orgánicas (Criquelion y cols., 2002).

h) Biguanidas

El clorhidrato de polihexametileno biguanida, dado su bajo espectro antimicrobiano, se asocia con otros principios activos y es empleado como desinfectante en general para la industria de alimentos, desinfección de circuitos de forma dinámica y, más comúnmente, en desinfección de piscinas (McDonnell y Russell, 1999; Leveau y Bouix, 2002). La clorhexidina es una de las más empleadas como antiséptico, especialmente en el lavado de manos, presenta buena actividad frente a bacterias y levaduras, pero su eficacia se ve muy afectada por la presencia de materia orgánica (McDonnell y Russell, 1999; Mostert y cols., 2005).

i) Bisfenoles

Triclosán y hexaclorofenol son los más utilizados. El triclosán se aplica como capa antimicrobiana en material de embalaje y cintas transportadoras (Mostert y cols., 2005). Se cree que su actividad se ejerce sobre la membrana citoplasmática, en primera instancia inhibiendo la toma de nutrientes esenciales, y luego produciendo lisis y liberación de los compuestos celulares (McDonnell y Russell, 1999). Los bisfenoles exhiben un amplio espectro, son activos frente a bacterias, hongos, algas y esporoestáticos hacia esporas bacterianas; aunque tienen poca eficacia contra *Pseudomonas aeruginosa*. Son considerados desinfectantes de nivel intermedio (McDonnell y Russell, 1999; Johansson, 2007).

5.3. Importancia del secado

El proceso de secado tiene una importancia crítica, pues podría estar implicado en maximizar la reducción de las bacterias (Montville y cols., 2002). Después de realizar las etapas de limpieza y desinfección, es recomendable una buena ventilación y/o la aplicación de aire que permita el secado de equipos, líneas de procesado y todas las superficies en general, para prevenir la proliferación de algún microorganismo viable remanente sobre las superficies (Wirtanen y Salo, 2003).

Varios estudios han demostrado que el secado de las superficies tiene un efecto bactericida, aunque la efectividad de esta acción depende de la naturaleza del organismo y estado en que se encuentra, el tiempo de secado, condiciones de temperatura, suciedad presente y humedad ambiental (Hirai, 1991; Janning y cols., 1994; MacEldowney y Fletcher, 1998). Aunque se disminuya la proliferación de microorganismos, algunas bacterias tolerantes y/ o formadoras de

esporas tienen la habilidad de permanecer en condiciones de sequedad durante un periodo de tiempo prolongado. El secado de superficies es altamente recomendable para facilitar la erradicación de microorganismos como *L. monocytogenes* (Rückeri y cols., 2014). *S. aureus* fue recuperado de superficies de acero inoxidable contaminadas con esponjas durante al menos 4 días cuando el nivel de contaminación inicial era elevado o moderado (por encima de 10^2 ufc/ cm^2) (Kusumaningrum y cols., 2003). Humphrey y cols. (1994) observaron que tras batir huevos contaminados artificialmente la supervivencia de *Salmonella enteritidis* en superficies de formica era de 24 h.

6. Adherencia bacteriana en superficies alimentarias. Biofilms

6.1. Biofilms

Existen dos estados bacterianos: el estado planctónico (las bacterias flotan libremente) y sésil (las bacterias están adheridas). En las últimas décadas ha ido creciendo la percepción de que las bacterias no se encuentran en el medio ambiente en forma libre o planctónica, sino que la gran mayoría se encuentran en forma sésil, formando parte de una estructura mayor, donde los diversos microorganismos establecen relaciones y dependencias (Frank y Chmielewski, 1997). Esta percepción ha constituido el punto de partida para investigar más acerca de las propiedades físicas y químicas de estas estructuras, denominadas biofilms. El crecimiento de biofilms en instalaciones de procesamiento de alimentos favorece la contaminación microbiológica de los productos procesados y pueden contener tanto microorganismos patógenos como alterantes. Por ejemplo *Pseudomonas* spp., bacteria alterante, a menudo se encuentra localizada en superficies y equipos de la industria alimentaria (Wirtanen y cols., 2001).

Algunos microorganismos patógenos pueden atacar, crecer y formar biofilms sobre superficies, equipos y entornos alimentarios. Por otra parte la industria láctea y, en general, aquellas industrias que trabajan con fluidos alimentarios, tienen un problema serio con respecto a la adhesión llamado "biofouling", que consiste en la formación de depósitos de capa de células vivas y sus productos de descomposición sobre una superficie de contacto con un medio líquido (Trachoo, 2003).

Hay varias teorías con respecto a la adhesión de los microorganismos. Mientras algunas se basan en las fuerzas de Lifshitz-Van der Waals, como también las fuerzas de atracción y repulsión, otras se inclinan por la teoría de la termodinámica, basada en la energía libre de adhesión, derivadas de las energías libres de superficie de la célula y de la superficie del sustrato. De otra parte, también se afirma que los apéndices de las superficies celulares o la excreción de adhesivos ayudan a la fijación, en mayor número, que las consideraciones estrictamente termodinámicas (Busscher y cols., 1997).

Los biofilms se definen como comunidades complejas de microorganismos y polímeros extracelulares, fijas a una superficie sobre la que se forman, que pueden presentar una única especie o un abanico de especies diferentes (Costerton, 1995; Davey y O'Toole, 2000; Kraigsley y cols., 2002). Estas comunidades de microorganismos se adhieren a las superficies y van construyendo con materiales poliméricos que ellos mismas generan, estructuras o matrices organizativamente complejas que protegen a los microorganismos del medio ambiente y sus condiciones adversas (variaciones de temperatura, agentes higienizantes, etc.). Debido a la asociación de estas estructuras con la resistencia y la persistencia de las bacterias bajo diferentes condiciones, es importante conocer las características diferenciales para el entendimiento del biofilm y las posibles estrategias a seguir para su control.

Un biofilm es pues una población de células creciendo adheridas a una superficie o, entre ellas, en agregados y embebidas en una matriz exopolisacárida (Lewis, 2001; Ravishankar y Juneja, 2003). Los biofilms se encuentran anclados a una superficie e incrustados en sustancias poliméricas extracelulares (EPS) producidas por ellos mismos (Kumar y Anand, 1998). Las EPS pueden contener polisacáridos, proteínas, fosfolípidos, ácidos teicoicos y nucleicos, y otras sustancias poliméricas hidratadas hasta con un 97% de agua (Sutherland, 2001; Chmielewski y Frank, 2003). Un sustrato sólido, agua y algunos nutrientes son suficientes para permitir la construcción de una fortaleza microbiana, el llamado biofilm. Matrices orgánicas gelatinosas consistentes en complejas mezclas de biopolímeros autogenerados aseguran la cohesión de estas estructuras biológicas y contribuyen a su resistencia y persistencia (Bridier y cols., 2014). Esta matriz madre actúa como una "concha" contra el estrés medioambiental y agentes antimicrobianos. Los principales componentes de este material gelatinoso son agua y biopolímeros (Flemming and Wingender, 2010). ADN extracelular también ha sido identificado y detectado en biofilms tanto de bacterias Gram-negativas como de Gram-positivas biofilms (Rice y cols., 2007; Izano y cols., 2008).

Lejos de ser simples agrupaciones tridimensionales de células idénticas, los biofilms están compuestos por sub-poblaciones heterogéneas con comportamientos distintos que contribuyen al éxito global del biofilm (Bridier y cols., 2014). El biofilm puede pues estar constituido por

monocultivos, por diversas especies, o por una mezcla de fenotipos de una especie dada, según los microorganismos colonizadores (McDonnell y Russell, 1999). Un creciente número de estudios de investigación ha demostrado que los biofilms multiespecies se muestran más resistentes a la actividad antimicrobiana que los biofilms monoespecie correspondientes, gracias a su estructura más compleja (Kumar y Anand, 1998; McDonnell y Russell, 1999; Burmølle y cols., 2006; Brooks y Flint, 2008; Luppens y cols., 2008; Simoes y cols., 2009; Teh y cols., 2010; Van der Veen and Abee, 2011; Giaouris y cols., 2013). Se ha demostrado que el patógeno *Escherichia coli* O157:H7 produce 400 veces más biomasa cuando coexiste en biofilms con *Acinetobacter calcoaceticus* que presentándose como monocultivo bajo las mismas condiciones ambientales (Habimana y cols., 2010).

Mientras que el modo de crecimiento planctónico es importante para la propagación de bacterias, los biofilms son necesarios para permitir a la bacteria persistir y resistir las condiciones adversas del medio. La capacidad para formar biofilms no parece restringirse a algunos grupos específicos de microorganismos y se considera que, bajo condiciones ambientales adecuadas, la inmensa mayoría de las bacterias pueden sobrevivir dentro de los biofilms (Donian, 2002; Thomas y Nakaishi, 2006).

Una de las primeras evidencias públicas sobre la existencia de un biofilm, fue presentada por Duguid, Anderson y Campbell (1966), demostrando la adhesión de *Salmonella* sobre superficies alimentarias. Antes, Zobell (1943), ya publicó el primer estudio científico al respecto. Desde entonces se han publicado numerosos ensayos que describen la habilidad de los microorganismos patógenos para formar biofilms, entre los que se encuentran, por ejemplo, *Yersinia enterocolítica*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli* O157:H7 (Shi y Zu, 2009).

Aunque las industrias cárnicas llevan a cabo procedimientos de limpieza y desinfección, estos no son totalmente efectivos ante la presencia de biofilms y pueden inducir la selección de fenotipos resistentes (Simoes y cols., 2010). En la industria es posible encontrar biofilms en diversas líneas de procesado alimentario. También se han aislado de los sistemas de conducción de aire, extractores, transportadores, sistemas de refrigeración, suelos, desagües y en superficies de contacto con los alimentos. Por ejemplo, *Listeria monocytogenes* forma biofilms en las rejillas y desagües de los suelos, tanques de almacenamiento, carretillas de mano, bandas transportadoras y otros materiales que están en contacto con los alimentos (Shi y Zhu, 2009). En definitiva, podemos encontrar biofilms en todos los medios donde existan bacterias, únicamente necesitan un entorno hidratado y una mínima presencia de nutrientes, porque pueden desarrollarse sobre superficies hidrófobas o hidrófilas, bióticas o abióticas, ya que los biofilms constituyen formas de resistencia, al calor, a los compuestos microbicidas y a condiciones adversas de humedad o

ausencia de nutrientes. La tasa de crecimiento en el interior del biofilm es lenta por lo cual requieren de una baja disponibilidad de nutrientes, esto implica que un alto porcentaje de la población se encuentra en la fase de desarrollo estacionario, lo cual hace que sean más resistentes a la acción de agentes antimicrobianos, que en la fase de desarrollo exponencial (Kiepek-Pearson y Karatan, 2005).

La superficie sobre la cual se desarrolla el biofilm tiene importancia en la firmeza de éste para adherirse y también para ser destruido. Pan y cols. (2006), demostraron que, por ejemplo, sobre acero inoxidable *L. monocytogenes* formaba un biofilm más grueso que sobre teflón, sin embargo, eran más fáciles de eliminar del acero inoxidable.

6.2. Implicaciones de la formación del biofilm

La formación de biofilm en medioambientes de procesos de alimentos es de especial importancia, ya que tienen la capacidad para actuar como fuentes persistentes de contaminación microbiana, que pueden conducir a la alteración del alimento y/o a la transmisión de enfermedades (Van Houdt y Michiels, 2010). Varios estudios han realizado su enfoque en la microestructura de los biofilms. Una de las técnicas más útiles es la microscopía de epifluorescencia, ya que permite observar el crecimiento sobre superficies, tales como plásticos, acero inoxidable o caucho (Trachoo, 2003). La aplicación de esta tecnología incluye la determinación de células viables, las células en biofilm, formación de microcolonias, morfología de las células, pH del biofilm y distribución química dentro del biofilm. Esta información es esencial para entender cómo algunos patógenos sobreviven a las condiciones de las plantas alimentarias y ha sido utilizada como soporte para desarrollar y mejorar los problemas de diseño, intervención y prevención (Trachoo, 2003).

Desde un punto de vista tecnológico, la formación de biofilms en los equipos industriales puede liderar serios problemas de higiene y pérdidas económicas, ya que, por ejemplo en la industria láctea, los microorganismos en biofilm catalizan reacciones químicas y biológicas, causando corrosión en las tuberías y tanques de almacenamiento metálicos. Al mismo tiempo pueden reducir la eficacia de transferencia de calor y aumentar la resistencia en los fluidos (Vieira y cols., 1993; Blascheck y cols., 2007). Los biofilms pueden ocasionar reducción del flujo de líquidos, reducción de la transmisión del calor, pérdidas energéticas, bloqueo de los poros de membranas y la corrosión de metales (Sharma y Anand, 2002).

6.3. Formación del biofilm

La existencia de bacterias patógenas sobre los alimentos o superficies que están en contacto con ellos incrementa el riesgo de seguridad alimentaria. Es por ello que el mecanismo de formación del biofilm, en las industrias alimentarias, se ha convertido en un punto importante de estudio en los últimos años (Shi y Zhu, 2009). El desarrollo de un biofilm puede ocurrir sobre casi todas las superficies y en cualquier medio ambiente en el que existan microorganismos viables presentes. En la mayoría de los casos, los microorganismos se adhieren a sustratos sólidos que pueden ser vivos o inanimados y/o a las formas inorgánica y orgánica, un requisito esencial para su supervivencia y reproducción (Kumar y Anand, 1998).

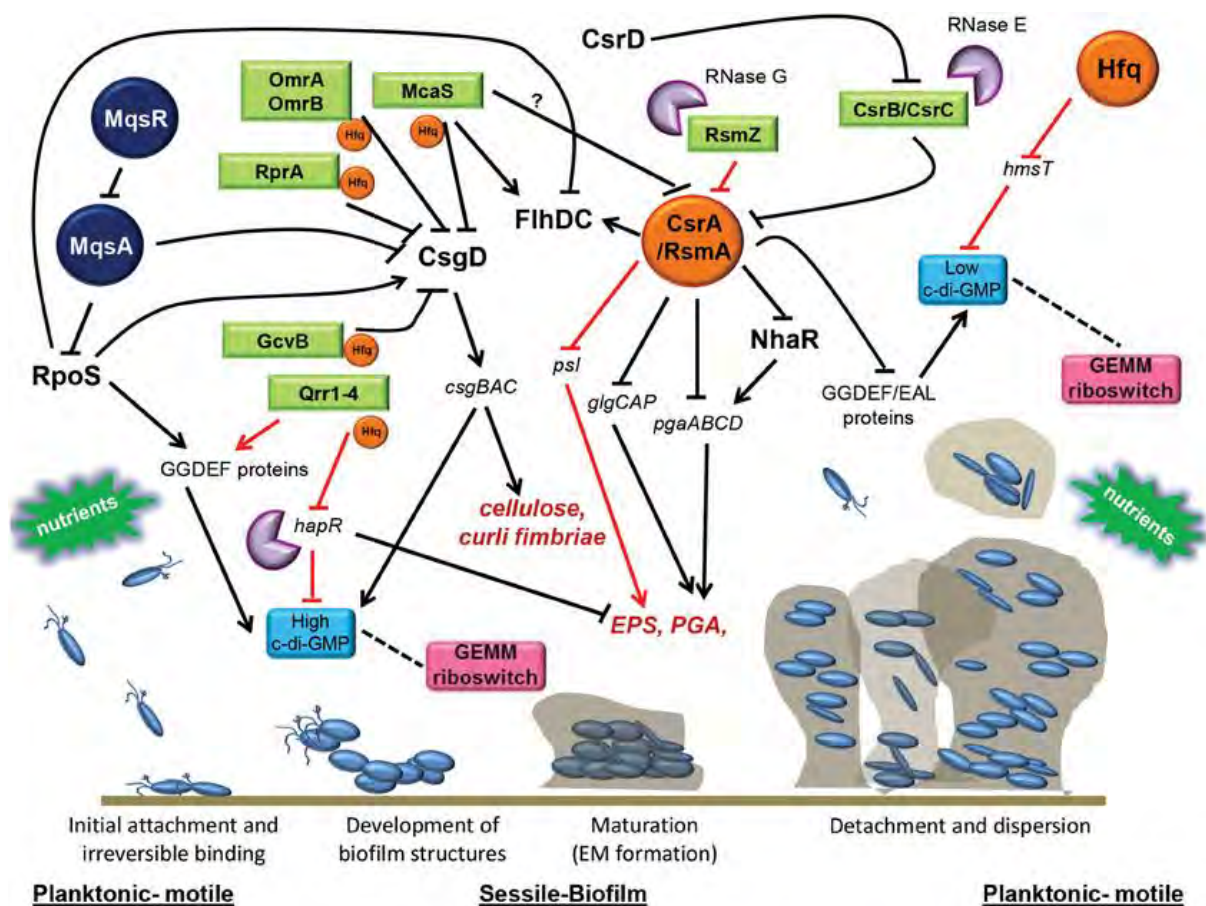


Figura 7: fases de desarrollo de un biofilm (Martínez y Vadyvaloo, 2014)

Las fases de desarrollo de un biofilm, mostradas en la Figura 7, son:

A. Acondicionamiento (ataque inicial): En los entornos de procesado de alimentos donde existe un incremento en el nivel de nutrientes remanentes sobre la superficie alimentaria, se facilita de modo considerable la adhesión bacteriana. El biofilm bacteriano empieza a formarse cuando alguna célula individual se adhiere inicialmente a una superficie. La capacidad de adhesión de los microorganismos a un sustrato depende de factores ambientales, como la temperatura y el pH, y de factores genéticos que codifican las funciones motrices, la sensibilidad ambiental, las adhesinas y otras proteínas (Costerton y cols., 1995; Chmielewski y Frank, 2003). Las características de la superficie sobre la cual se desarrolla el biofilm tienen importancia en la firmeza de éste para adherirse y también para ser destruido (Pan y cols., 2006). A este respecto, la microtopografía de la superficie alimentaria es igualmente importante en la retención de bacterias, en particular si la superficie se compone de canales profundos y hendiduras que atrapen las bacterias (Kumar y Anand, 1998).

B. Adsorción y fijación (inicio de desarrollo estructural): el proceso de adhesión se da en dos fases, una primera reversible seguida de otra irreversible. La fase reversible es la unión débil de la bacteria al sustrato. Actúan fuerzas de Van der Waals y fuerzas electrostáticas e interacciones hidrófobas. Durante la unión reversible las bacterias siguen mostrando movimientos brownianos y se pueden eliminar de manera sencilla con una suave limpieza (Mittelman, 1998; Chmielewski y Frank, 2003), que debe ser aplicada de modo rápido (Carpentier y Cerf, 1993) para impedir la persistencia.

La segunda fase, irreversible, es dependiente del tiempo, y resulta del anclaje de los apéndices celulares y/o de la producción de polímeros extracelulares. Las bacterias se unen activamente a las superficies por medio de apéndices, como los flagelos, pilis, adhesinas y cápsulas bacterianas. La alta energía libre y las superficies húmedas promueven la adhesión bacteriana, formando microcolonias de unión irreversible, donde las células ya no presentan movimiento browniano. A diferencia de la etapa de disposición de la superficie, el tiempo para que se produzca la adhesión celular depende de la especie bacteriana y los sustratos presentes en las superficies (Marshall, 1992; An y Friedman, 1998; Chmielewski y Frank, 2003). En esta fase las bacterias sintetizan la matriz de exopolisacáridos para establecer un contacto físico entre las células y la superficie. Una vez se ha establecido, las células bacterianas se multiplican dando lugar a microcolonias y posteriormente al biofilm. Durante el proceso de adhesión las bacterias cambian su fenotipo y llegan a ser básicamente diferentes respecto a su forma libre planctónica, de modo que se produce la expresión de genes específicos, se desarrollan cambios y alteraciones en su morfología y cambia su tasa de crecimiento (Chmielewski y Frank, 2003). En cuanto a la matriz de

exopolímeros no está perfectamente definida, aunque algunos autores han demostrado que contiene polisacáridos o glicoproteínas de distintos azúcares, como glucosa, fructosa, manosa, N-acetilglucosamina y otras sustancias. También pueden contener proteínas libres, fosfolípidos y ácidos nucleicos o teicoicos. (Chmielewski y Frank, 2003).

Existen diferentes factores que afectan a la adhesión, desarrollo y estructura del biofilm, dentro de los cuales se pueden mencionar los siguientes (Chmielewski y Frank, 2003):

- . Las propiedades de la superficie.
- . La disponibilidad de nutrientes.
- . La composición de la comunidad microbiana.
- . La disponibilidad de agua.
- . La interacción interespecífica.
- . El transporte celular.
- . La temperatura.

Todas estas características juegan un papel importante en el cambio fenotípico, desde las células planctónicas a la forma sésil. Otros factores, como el uso de alcohol u otros agentes desinfectantes, así como la presencia de múltiples microorganismos pueden mejorar la adhesión y maduración del biofilm (Chmielewski y Frank, 2003; Garret y cols., 2008; Shi y Zhu, 2009; Van Houdt y Michiels, 2010).

C. Evolución y maduración del biofilm.

Si las condiciones son adecuadas para un crecimiento suficiente del biofilm, por naturaleza desarrollará una estructura organizada. A este proceso se le llama mutación. Un biofilm maduro puede consistir en una simple capa de células, en un polímero extracelular poroso o en múltiples capas de microcolonias sueltas o embebidas por las sustancias poliméricas extracelulares (Chmielewski y Frank, 2003). En cuanto se forma la película de células sobre la superficie, se inicia la producción de exopolisacáridos (EPS). La composición general de la EPS bacteriana comprende polisacáridos y proteínas, que representan del 75 al 89% de la composición y, en menor cantidad, ácidos nucleicos, lípidos, fosfolípidos y sustancias húmicas (Simoes y cols, 2010). Los EPS ayudan al anclaje de las células a la superficie y estabilizan la colonia de las fluctuaciones del medioambiente (Characklis y Marshall, 1990). En un biofilm maduro la mayor parte de su volumen está ocupado por la matriz, laxamente organizada, alrededor de unas pocas bacterias (5-25% del biofilm), matriz

que proporciona una cubierta gelatinosa y deslizante con un considerable volumen de agua disponible.

La secuencia de unión de diferentes especies bacterianas influye en la composición del biofilm resultante. La población inicial que se une puede cambiar las propiedades de la superficie, y así las que vienen después se pueden adherir vía asociación célula a célula. En algunos casos la unión de unas segundas especies puede incrementar la estabilidad de la población del biofilm (McEldowney y Fletcher, 1998). Hood y Zottola (1997) demostraron que *L. monocytogenes* era más propensa a adherirse al acero en presencia de *Pseudomonas fragi*. Las cargas negativas de las superficies bacterianas son contrarias a la adhesión bacteriana, debido a las fuerzas de repulsión electrostáticas. Sin embargo, las superficies de las células bacterianas poseen hidrofobicidad debido a las fimbrias, flagelos y sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Por ello la importancia de los flagelos, para transportar las células a un sitio de fijación especial con la superficie, mientras que los pili y las fimbrias son importantes para la adhesión y colonización, probablemente porque ayudan a superar la barrera de repulsión electrostática (Shi y ZHU, 2009; Simoes y cols., 2010). Las EPS confieren propiedades hidrofílicas a las células bacterianas y son un componente importante de la membrana externa bacteriana, la cual juega también un papel en la fijación inicial a la superficie (Shi y Zhu, 2009).

A medida que madura el biofilm, se adapta a los nutrientes presentes en la película de acondicionamiento y en los fluidos circundantes, al oxígeno y a los cambios poblacionales, formando microcolonias discretas separadas por canales de agua. La densidad estructural de la matriz se incrementa en el núcleo mientras que las capas superiores permanecen porosas (Bishop, 1997). Las bacterias con un metabolismo más activo permanecen en la superficie de las capas de la matriz del biofilm, cerca de los canales de agua, cuyo número se reduce con la edad del biofilm; en un biofilm joven se han detectado cerca de un 80% de células viables, y tan sólo un 50% en un biofilm maduro (Carpentier y Cerf, 1993; Sharma y Anand, 2002). Los canales de agua permiten la dispersión y el intercambio de sustancias orgánicas, cationes y metabolitos. Los nutrientes se atrapan y concentran en la matriz del biofilm y se mueven por esta difusión (Davey y O'toole, 2000).

Algunos estudios han observado que los EPS proporcionan protección contra las condiciones adversas que pueden existir sobre los microorganismos del biofilm, mediante la concentración de nutrientes, previniendo el acceso de biocidas y la desecación, secuestrando metales y toxinas. Todo esto dificulta su movilización, requiriendo la aplicación de fuerzas como lavados, raspados sobre la superficie o la ruptura química de las fuerzas de fijación, a través de la aplicación de

enzimas, detergentes surfactantes, desinfectantes y calor (Carpentier y Cerf, 1993; Sauer, 2003; Simoes y cols., 2010; Van Houdt y Michiels, 2010).

D. Disgregación y dispersión del biofilm. Liberación de células que podrán colonizar otras superficies.

Aunque los biofilms hayan alcanzado una estructura altamente organizada, con la presencia de sustancias químicas en el medio circundante y condiciones que faciliten la alteración de las propiedades de los propios biofilms o del sustrato, las bacterias se desprenden de la matriz y entran en el flujo de corriente. La disgregación es un proceso discreto, por lo que ocurre una separación periódica de partículas relativamente grandes de biomasa (células y nutrientes). Posteriormente puede volver a comenzar el proceso de desarrollo del biofilm en un lugar diferente (Kumar y Anand, 1998; Simoes y cols., 2010).

7. Resistencia bacteriana

Si un microorganismo o especie sobrevive o crece en una concentración más alta de desinfectante que otro microorganismo o especie, se dice que tiene una mayor resistencia. Es importante distinguir entre una respuesta al estrés, la cual suele ser reversible, y en una adaptación que origina una resistencia muy estable y transmisible (Langsrud y cols., 2003). La resistencia a cualquier agente microbiano es un proceso continuo que puede proceder de mutaciones espontáneas o transmisión de genes resistentes aportados por otras bacterias. Aunque la mutación bacteriana ocurre en forma natural y bajo varias condiciones ambientales, puede incrementar su frecuencia bajo condiciones de estrés y bajo concentraciones subinhibitorias de antibiótico. La presencia de antimicrobianos en el medio ambiente dará lugar a la selección de bacterias mutantes más resistentes que poseen una modificación ventajosa frente a la acción de antibióticos (Lagaron y cols., 2012).

Las variantes fenotípicas que sobreviven a un tratamiento antimicrobiano, pueden constituir entre el 0,1 y el 1% del biofilm de la población del posterior biofilm regenerado (Chambless, 2006).

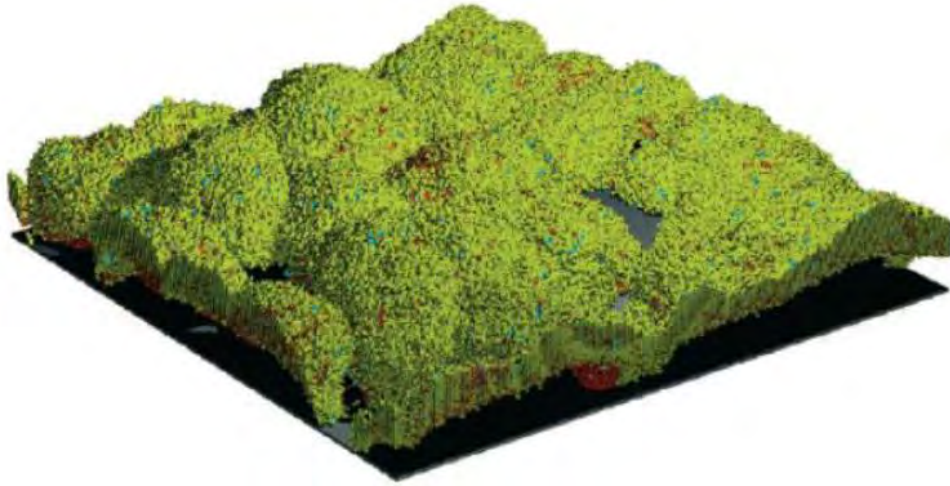


Figura 8: Simulación informatizada (según el programa BacLAB) de un modelo de biofilm regenerado. Los puntos verdes simbolizan bacterias de nuevo asentamiento, los rojos bacterias muertas, los azules bacterias resistentes, que habrían servido de base para la regeneración del biofilm tras un tratamiento desinfectante no determinante (Chambless, 2006).

La naturaleza de la resistencia bacteriana puede ser intrínseca, o adquirida por mutación o adquisición de plásmidos o transposones (McDonnell y Russell, 1999). La resistencia intrínseca es demostrable en las bacterias Gram negativas, esporas bacterianas, micobacterias y estafilococos (bajo ciertas condiciones).

La resistencia adquirida y mediada por plásmidos está más ampliamente asociada con compuestos de mercurio y otras sales metálicas (McDonnell y Russell, 1999). La transferencia de plásmidos dentro del biofilm puede ocurrir, en un alto grado, debido a la proximidad tan marcada existente entre células. Esta transferencia es beneficiosa para las células ya que el intercambio de ADN puede conllevar la realización de funciones útiles que mejoren su supervivencia (Van Houdt y Michiels, 2010).

7.1. Resistencia bacteriana intrínseca

Los mecanismos de resistencia intrínsecos son una propiedad natural, de la célula bacteriana cromosómicamente controlada, lo que le permite evadir la acción de los agentes antimicrobianos. Los posibles mecanismos de resistencia han sido propuestos propuestos por McDonnell y Russell (1999) y se recogen en Tabla 5.

TIPO DE RESISTENCIA	BACTERIA	AGENTE BIOCIDA	MECANISMO DE RESISTENCIA
Impermeabilidad	Bacteria Gram-negativa	QACs, triclosán, diaminas	Barrera en su membrana externa que puede impedir la adsorción del agente biocida; el glicocalis puede estar involucrado
Impermeabilidad	Micobacteria	Clorhexidina, QACs, glutaraldehído	La pared celular cerosa dificulta la entrada del biocida
Impermeabilidad	Esporas bacterianas	Clorhexidina, QACs, fenólicos	La capa de la espora y la corteza presenta una barrera para la entrada de los biocidas
Impermeabilidad	Bacteria Gram-positiva	Clorhexidina	El glicocalis y los mucoexopolisacáridos pueden ser la causa de la reducción de la difusión del antiséptico
Inactivación	General	Clorhexidina	La distribución de la molécula de clorhexidina puede ser la causante de la resistencia

Tabla 5: Mecanismos de resistencia intrínseca en bacterias hacia los antisépticos y desinfectantes (McDonnell y Russell, 1999).

Para que un agente antimicrobiano actúe, en primer lugar la capa externa de la célula debe ser superada. La naturaleza y composición de estas capas externas dependen del tipo de microorganismo y de si actúan como una barrera permeable. Alternativamente, la síntesis de enzimas puede producir cierta degradación del agente antimicrobiano (McDonnell y Russell, 1999).

Por otra parte, Peleg y cols. (2010) indican 8 mecanismos de resistencia bacteriana individual a los antibióticos (Figura 9). En general los sistemas de resistencia bacteriana se basan en evitar que el antibiótico acceda a su diana y lo dañe, y en la evolución han aparecido diversos mecanismos para que eso ocurra:

1. Pérdida de porinas

Las porinas son proteínas localizadas en la membrana de la bacteria encargadas de transportar sustancias al interior de la célula. Una forma de resistencia consiste en la pérdida por parte de la célula de las porinas.

2. Beta-lactamasas

Algunas bacterias poseen beta-lactamasas, proteínas con actividad enzimática capaces de romper enlaces químicos de compuestos beta-lactamínicos, entre los que se incluyen algunos antibióticos.

3. Bombas de extrusión de antibióticos

Algunas bacterias obtienen la resistencia a antibióticos produciendo elevados niveles de bombas de extrusión, proteínas transmembranas que permiten exportar el antibiótico fuera de la célula.

4. Enzimas que modifican químicamente a la enzima y la inactivan

Algunas enzimas consiguen entrar en la célula, sin embargo algunas cepas son capaces de producir otras enzimas que las modifican químicamente, evitando que éstas reconozcan su diana.

5. Mutaciones en la diana específica del antibiótico

Mutaciones en la diana (“cerradura”) hacen que el antibiótico (“llave”) ya no sea capaz de reconocerla. Algunas de estas mutaciones implican la inactivación de la diana lo que hace que la célula no sea viable. **Mutaciones en los ribosomas**

Los ribosomas son dianas de algunos antibióticos. Algunas cepas han desarrollado mutaciones en las regiones de interacción del antibiótico con el ribosoma, lo que los hace invisibles a estos compuestos.

7. Mutaciones en la estructura del liposacárido (LPS)

Los lipopolisacáridos son un conjunto de polímeros complejos que forma parte de la membrana externa de las bacterias Gram -. Algunos antibióticos son capaces de interactuar con el LPS, desestabilizarlo e impedir su correcta síntesis. Mutaciones estructurales del LPS impide esta unión.

8. Desvíos alternativos

Algunos antibióticos son capaces de inhibir específicamente la actividad de algunas enzimas esenciales para la célula. Sin embargo algunas enzimas pueden mutar o bien recuperar la actividad enzimática perdida por la acción del antibiótico promoviendo un desvío de la ruta que permitirá sobrevivir la célula.

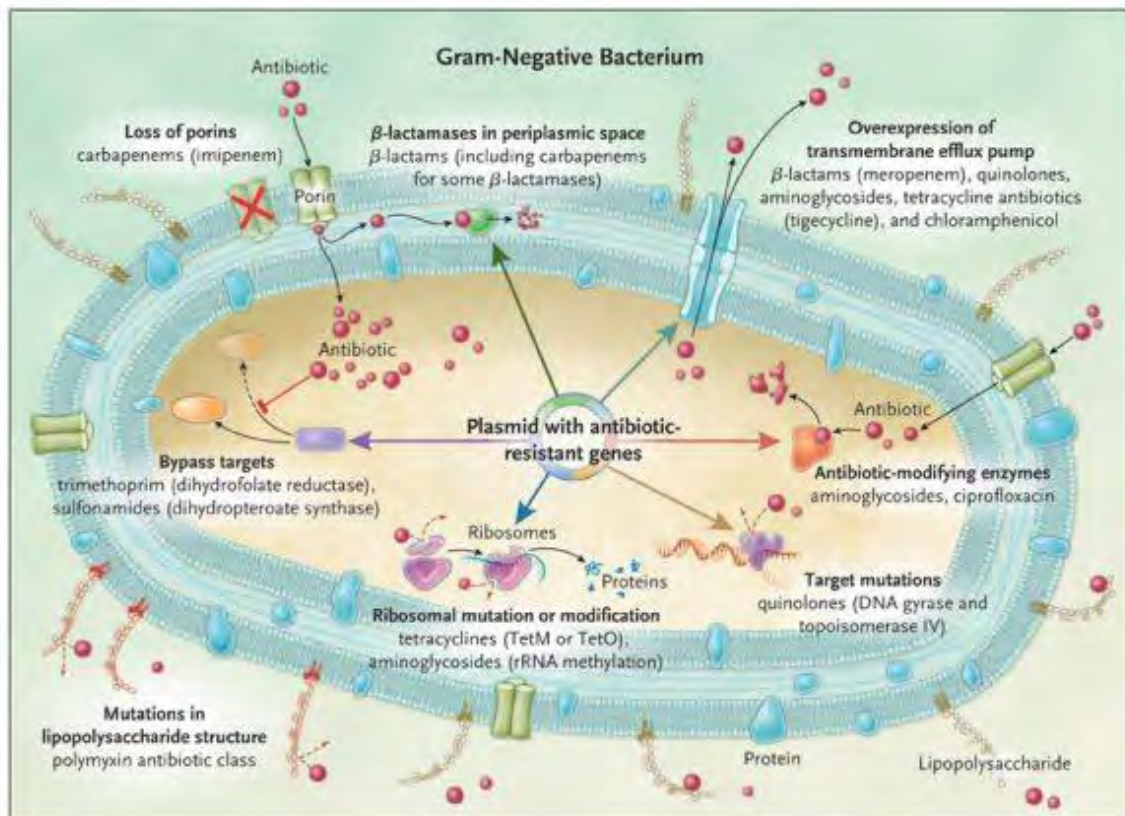


Figura 9: Imagen de mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos (Peleg y cols., 2010).

Por encima de esta resistencia individual, los biofilms son el ejemplo más importante de cómo la adaptación fisiológica juega un papel en conferir resistencia intrínseca (McDonnell y Russell, 1999). Se ha observado que las células adheridas o formando parte de un biofilm, son más resistentes a la acción desinfectante que sus células planctónicas, es decir, en su forma libre, suspendidas (Bower y Daeschel, 1999). Ryu y Beuchat (2005), demuestran como la resistencia de *Escherichia coli* O157:H7 al cloro incrementa significativamente cuando las células forman biofilms. Patógenos como *Listeria monocytogenes* presentes en biofilm multiespecies pueden incrementar su protección frente a la desinfección (Norwood y Gilmour, 2000; Van der Veen y Abee, 2001). La producción de polisacáridos extracelulares (EPS) puede limitar la eficacia de los desinfectantes, y por ello los biofilms mixtos pueden jugar un papel en la persistencia de *Listeria monocytogenes* si otros organismos productores de EPS están presentes en el biofilm (Bremer y cols., 2001 and Carpentier y Cerf, 2011). Holah y cols. (1990) describieron un método de prueba desinfectante en superficie de acero inoxidable para tres bacterias (*P. aeruginosa*, *S. aureus* y *Proteus mirabilis*) y evaluaron doce desinfectantes. Los resultados indicaron que las bacterias adheridas a la superficie en biofilms fueron hasta 10 veces más resistentes a todos los

desinfectantes evaluados y entre 10 y 100 veces más resistentes a siete de los biocidas en pruebas de suspensión. Wirtanen y Salo, 2003, probaron el efecto bactericida de cuatro desinfectantes comerciales (peróxido de hidrógeno, alcohol, hipoclorito y persulfato) sobre biofilms de diferentes bacterias (*L. innocua*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. infantis*, *S. choleraesuis* y *B. cereus*) crecidos en superficies de acero inoxidable, observando claramente la protección de los biofilms contra los desinfectantes.

Aunque se han postulado muchos mecanismos para explicar la reducción de la susceptibilidad de los organismos sésiles a los antimicrobianos, cada vez es más evidente que la resistencia del biofilm es multifactorial. Los mecanismos de protección del biofilm parecen ser distintos de aquellos que son responsables de resistencia a los antibióticos convencionales (Glinel y cols., 2012). En primer lugar, la matriz EPS retrasa o impide la acción de los antimicrobianos, ya sea por la limitación de la difusión o por la interacción química con las proteínas y los polisacáridos extracelulares (Simões y cols., 2010). Por otra parte, las células que se encuentran en lo profundo del biofilm, exhiben una disminución en la tasa de crecimiento debido a los gradientes de oxígeno y nutrientes (Brown y cols., 1988). Esto resulta en un estado casi inactivo (hibernación) que a su vez se convierte en un aumento de resistencia hacia los biocidas (Gilbert y cols., 1990; Evans y cols., 1991; Van Houdt y Michiels, 2010). Por ello, cuando las células se desprenden del biofilm ya no presentan la misma resistencia y rápidamente son susceptibles a los antimicrobianos (McDonnel y Russell, 1999; Blaschek y cols., 2007).

Otro posible mecanismo de resistencia del biofilm a los biocidas puede radicar en que algunas de las células del biofilm son capaces de detectar los cambios generados por el biocida y desarrollar activamente la respuesta de protección al estrés más eficazmente que las células platónicas (Van Houdt y Michels, 2010; Szomolay y cols., 2005). Por ejemplo, cuando biofilms de *P. aeruginosa* son expuestos a monoclaminas, la segunda dosis es menos efectiva que la primera (Sanderson y Stewart, 1997; Van Houdt y Michels, 2010). La preocupación de la industria alimentaria por la higiene ha ocasionado un aumento del empleo de agentes químicos de desinfección y es posible que esto a su vez haya contribuido a hacer emerger la resistencia de los microorganismos a los desinfectantes. En general, la bacteria aislada después de la desinfección, es más resistente, y representa un potencial problema (Langsrud y cols., 2003)

Chambless y cols. (2006) proponen cuatro mecanismos de resistencia a antibióticos por parte de los complejos de biofilms, que pueden verse en la Figura 10.

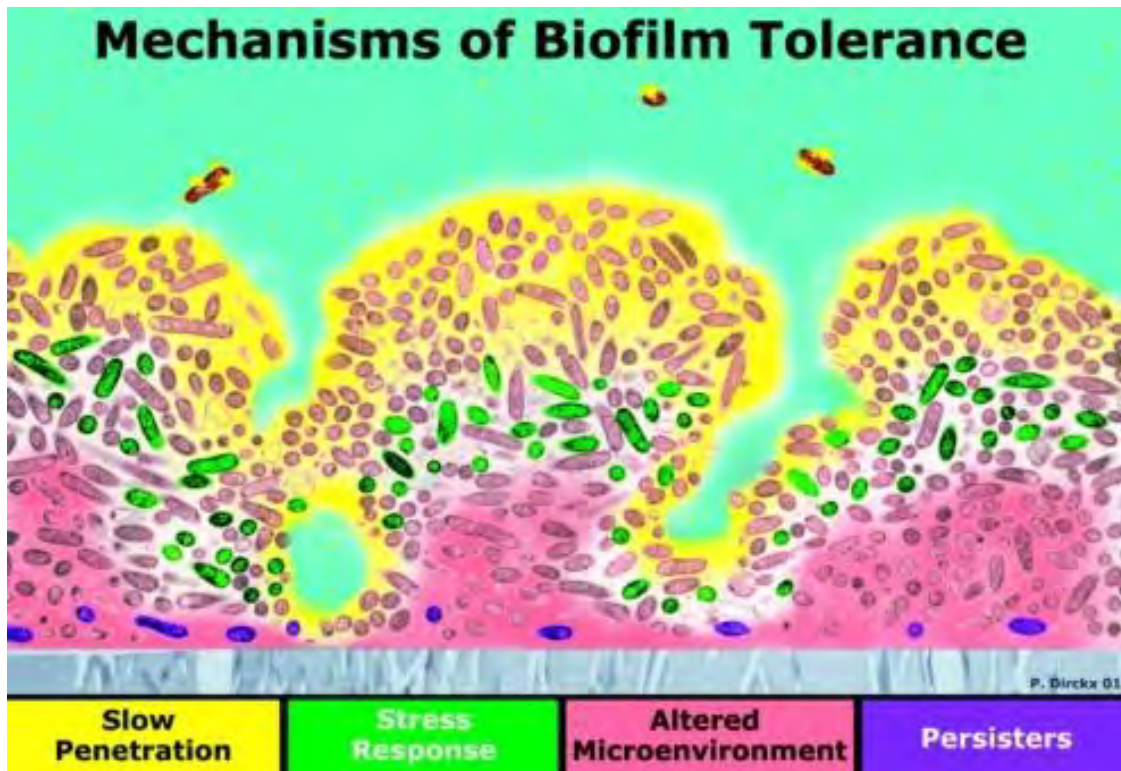


Figura 10: Cuatro posibles mecanismos de resistencia bacteriana en biofilm formado sobre una superficie atacada (en gris). (Chambless, 2006): 1) Dificultar la penetración de biocidas en zonas externas del biofilm (en amarillo), 2) Generar una respuesta al estrés por parte de algunas bacterias (en verde), 3) Alterar el medioambiente del biofilm como respuesta (zona rosa) y 4) bacterias resistentes por diferenciación fenotípica (en morado).

Todos estos mecanismos de resistencia que plantean los biofilms, hacen que su eliminación, dentro de las plantas de procesamiento de alimentos, se convierta en un desafío (Brooks y Flint, 2008). Así, considerando la alta resistencia de los microorganismos en biofilm hacia los inhibidores, se hace necesario aumentar la concentración de desinfectantes, lo que conlleva ocasionar daños importantes al medioambiente y a considerar el concepto de la multi-resistencia. En este contexto la prevención de la formación de un biofilm es claramente preferible a un tratamiento estratégico de eliminación (Glinel y cols., 2012). Por ello, ha de determinarse una adecuada frecuencia de desinfección (y monitorizar su eficacia, especialmente en zonas propensas al desarrollo de biofilms) 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 Michels, 2010).

En resumen, se pueden mencionar a los factores intrínsecos de resistencia bacteriana como los más significativos, siendo los más importantes la habilidad de esporular y el efecto protector de los

biofilms. Quizá en estos casos no sea correcto hablar de “resistencia”, sino de “tolerancia”, que se define como el desarrollo de los efectos protectores que permiten al microorganismo sobrevivir en presencia de un agente activo (McDoneell y Russell, 1999).

Sidhu y cols. (2001) distinguen entre tolerancia y resistencia en su estudio sobre el comportamiento de 320 cepas de bacterias ácido lácticas a la acción de cloruro de benzalconio, empleado como agente desinfectante en industrias de alimentos. Para Pickett y Murano (1996) no hay relación entre tolerancia y resistencia tras comprobar que la exposición a dosis subletales de la mayoría de tipos de detergentes no aumentaba la habilidad de las células bacterianas para generar resistencia a niveles letales.

Otros autores distinguen entre resistencia y persistencia. Earnshaw y Lawrence (1998), Holah y cols., (2002), Kastbjerg y Gram (2009) y Lourenço y cols. (2009) no encuentran relación, aunque sus estudios se han llevado a cabo en todos los casos con bacterias planctónicas, y los resultados podrían diferir para bacterias ligadas a las superficies. Una cepa puede ser considerada como presumiblemente no persistente cuando es aislada una sola vez en muestreos mensuales durante un año consecutivo (Halberg Larsen y cols., 2014). Las más importantes enfermedades de origen alimentario en cuantía y severidad son debidas a patógenos con la habilidad de persistir en la producción primaria o en las instalaciones de la producción secundaria (Halberg Larsen y cols., 2014).

En cuanto a si la resistencia a la adherencia es mayor para una sola especie que para un biofilm mixto, Midelet y Carpentier (2002) sugieren, tras evaluar la adherencia de *Listeria monocytogenes* sola y de una combinación de esta con *Kokuria varians* CCL56, que tal adherencia es mejor para *Listeria monocytogenes* en solitario, tal vez por la interacción de las especies entre sí.

Kakurinov (2014), habla de pseudo-resistencia o resistencia aparente cuando un microorganismo se muestra resistente a cierto tipo de biocida, pero cuando el mismo microorganismo es colocado en un ambiente libre del biocida, la resistencia desaparece. Expone que hay dos causas que pueden provocar la resistencia aparente: condiciones de estrés interactuantes (como pH y polaridad del medio) o una incorrecta selección y aplicación de los desinfectantes.

Por otra parte, según Langsrud y cols. (2003), la resistencia a los desinfectantes puede, en la mayoría de los casos, ser prevenida mediante la aplicación de procedimientos efectivos de limpieza y desinfección.

7.2. Resistencia microbiana adquirida

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

8. Métodos de verificación para el control microbiológico e higiénico de las superficies.

Los sistemas de detección para el control microbiológico de superficies son imprescindibles, para poder evaluar y determinar si la población microbiana existente o residual se encuentra en un nivel aceptable y si se han destruido los microorganismos indeseados. Los resultados obtenidos se relacionarán con parámetros como la limpieza de la superficie o la calidad del producto alimenticio (Fung, 2002; Leveau y Bouix, 2002).

Así, el manejo de sistemas de detección de microorganismos puede ser importante en la gestión de la seguridad alimentaria y, en cuanto al criterio de selección de los análisis y su aplicación, se debe tener en consideración su utilidad, limitaciones y ventajas (ICMSF, 2011). En su revisión, Bari y Kawasaki (2014) indican no obstante que, en cuanto a la selección de un apropiado método de análisis microbiológico, debe hacerse la observación de que no existe metodología 100% sensible y específica que pueda proveer de resultados fiables a coste comedido.

8.1. Inspección visual

La inspección visual tras limpieza y desinfección, establecida regularmente por muchas industrias de alimentos (conocida como inspección preoperativa) nos puede indicar si quedan restos de materia orgánica macroscópicos, pero en la mayoría de las operaciones no es suficiente y por ello ha de recurrirse a pruebas más sensibles (Moore y Griffith, 2002). Las técnicas de muestreo de superficies son imprescindibles, especialmente si se relacionan los resultados obtenidos con parámetros como la limpieza de la superficie o la calidad del producto alimenticio (Fung, 2002).

8.2. Métodos clásicos de laboratorio

Tradicionalmente, la valoración de una superficie se realiza mediante métodos microbiológicos como el hisopado (con hisopos o esponjas) seguido de un cultivo microbiano, la aplicación-impronta o las aguas de enjuague (PDA, 1998; Maukonen y cols., 2003). Estos análisis tradicionales estandarizados para la detección de microorganismos patógenos se basan en el enriquecimiento y aislamiento de colonias sospechosas sobre un medio sólido usando medios de diagnóstico, usualmente seguido de identificación bioquímica o serológica. Tales métodos tradicionales, aunque fiables, requieren desde varios días a una semana para la obtención de resultados (Malorny y cols., 2003b), pues precisan periodos de incubación microbiana, lo que los hace inapropiados como herramientas de vigilancia rápida para el APPCC (Maukonen y cols., 2003).

8.2.1. Hisopado o esponjado

El hisopado consiste en arrastrar un hisopo de algodón estéril (habitualmente sumergido en diluyente también estéril) por encima de la superficie a analizar. Posteriormente se resuspenden en un medio adecuado de recuperación y cultivados en medios de crecimiento adecuados (Lelieveld y cols., 2003). El método tiene como ventaja que es adaptable a gran variedad de superficies, posee una amplia disponibilidad y su coste es relativamente bajo (Mostert y cols., 2005). Por otro lado, sus desventajas radican, además de en las variaciones individuales en la forma de aplicarla, en la incapacidad del hisopo para recuperar todos los microorganismos de la

superficie con eficacia, ya sea porque se encuentren adheridos (biofilm) o por quedar retenidos en el propio hisopo, obteniendo resultados erróneos al disminuir el recuento total. Por estos motivos existe gran variabilidad en los resultados y no suelen ser reproducibles (Holah y cols., 1988; Leileveld y cols., 2003; Mostert y cols., 2005).

El método del esponjado se basa igualmente en el frotado de la superficie a examinar, en este caso con una esponja humedecida en una solución diluyente estéril. No obstante, se intentan localizar sistemáticas para el frotado más eficientes. Gómez y cols. (2012) evalúan y comparan la eficacia de dos procedimientos diferentes de muestreo ambiental, mediante la esponja clásica de celulosa, y mediante un mini-rodillo de fibra de lana. En una primera fase, se inoculan con 4 cepas diferentes de *L. monocytogenes* aisladas de productos cárnicos dos superficies de acero inoxidable y una tabla de corte de polietileno. El mini-rodillo logra recuperar más cantidad de microorganismos en las superficies de acero inoxidable, aunque muestra peores resultados en la tabla de polietileno. La segunda parte del estudio se lleva a cabo en 26 industrias cárnicas donde se muestrean 60 superficies en contacto con alimentos para la detección de *L. monocytogenes*, aerobios mesófilos y enterobacterias, obteniendo recuentos similares con los dos métodos para *L. monocytogenes* y aerobios mesófilos, y algo superiores con el mini-rodillo para enterobacterias. Se concluye que el mini-rodillo supone un procedimiento de muestreo conveniente para su aplicación en superficies.

Khamisse y cols., 2012, comparan la carga bacteriana de superficies de acero inoxidable y PVC en una sala de despiece de vacuno, antes y después de la limpieza y desinfección, concluyendo que el hisopado para análisis de superficies, permite recoger tan sólo entre el 2 y el 27% de la carga bacteriana real.

8.2.2. Aplicación-impronta

Los métodos de aplicación-impronta utilizan placas de contacto de agar estéril, como las Rodac o *slides* (laminocultivos), que se hacen contactar con la superficie a evaluar (Mostert y cols., 2005). Su desarrollo ha permitido abreviar algunos inconvenientes del cultivo microbiano convencional, principalmente en términos de preparación (Russell, 2000; Silbernagel y Lindberg, 2002; Ingham y cols., 2003). La desventaja de esta técnica es que sólo es eficaz en superficies planas, lisas y con recuentos microbianos bajos, pues no es posible hacer diluciones. El método de contacto es fácil de usar, pero presenta además otros factores limitantes, como el posible no desprendimiento bacteriano de las superficies, ya que existen células y esporas que, con habilidad para adherirse a una superficie en periodos de tiempo cortos, no se desprenden fácilmente (Mafu y cols., 1990). Es

el caso de los biofilms, para los que previamente a la aplicación de la técnica debe romperse su estructura (Pontrefract, 1991; Boer y Beumer, 1999).

Kusumaningrum y cols. (2003) compararon la recuperación de 4 microorganismos (*Bacillus cereus*, *S. aureus*, *Salmonella enteritidis* y *Campylobacter jejuni*) inoculados sobre superficies de acero inoxidable a tres diferentes concentraciones (10^3 , 10^5 y 10^7 ufc/ 100 cm²). Observaron que un 18-20% fue recuperado al emplear hisopado, mientras que al usar una placa de contacto Rodac los niveles de recuperación fueron dependientes del microorganismo de prueba. *B. cereus* en un 18% y *Salmonella* en un 23%, pero para *Campylobacter* fue sólo de un 7%.

8.2.3. Aguas de enjuague

Las muestras de agua de enjuague pueden ser evaluadas a intervalos de tiempo durante la limpieza hasta completar el proceso de higienización. Al realizar este muestreo se debe considerar el momento adecuado, la localización y el volumen evaluado. Suele emplearse este método en sistemas cerrados higienizados por procedimientos “clean in place” (CIP), para los que usualmente es determinada la carga microbiana usando el enjuague (Griffiths, 1997). Entre las ventajas destaca que la sistemática es adaptable para un control en línea, no es molesta, es menos dependiente de la técnica que el hisopado y además permite el muestreo de superficies de áreas mayores y únicas. Su desventaja principal radica en que puede ser que la sensibilidad de la prueba sea menor debido a que la distribución de los contaminantes no sea homogénea. Por tanto, el volumen del agua de enjuague es crítico para asegurar la interpretación correcta de los resultados (PDA, 1998).

Una forma sencilla de evaluar esas aguas de enjuague es someterlas a una filtración en membrana, que después se colocará en un adecuado medio de cultivo para determinar el número de microorganismos presentes (Kakurinov, 2014).

8.2.4. Extracción de microorganismos de fracciones de superficies

Si es posible su realización, esta aplicación se basa en tomar un fragmento de la superficie a evaluar, colocarlo en una solución salina normal y agitarlo, con o sin perlas de vidrio o por sonicación, para desprender los microorganismos que se encuentren adheridos a la superficie (Christian y cols., 1983; Sattar y cols., 2001; Traoré y cols., 2002; Christison y cols., 2007; Gerba y Kennedy, 2007; Fijan y Sostar-Turk, 2010; Sivakumar y cols., 2010). Estos tres métodos de

extracción de microorganismos de la superficie son equivalentes en la recuperación, pero la agitación con perlas de vidrio permite extraer completamente las bacterias cuando estas se encuentran dentro de un biofilm (Lindsay y Von Holy, 1997).

Actualmente algunos fabricantes de composiciones y metodologías de higienización, trabajan en pos de facilitar esta “extracción” de superficie alimentaria a evaluar para recuperar mayoritariamente la carga microbiana presente. Un buen ejemplo de esto son los SCH (“sensores de control de higiene”), que la casa Itram tiene en el mercado (pueden verse en su página web). Los SCH, discos inoxidables integrados en una platina, se instalan de forma fija en las superficies alimentarias, así presentan la misma exposición a los procesos industriales, procedimientos de limpieza, etc., que cualquier superficie alimentaria. La posibilidad de ser retirados fácilmente para su análisis por distintas metodologías (según conveniencia del laboratorio) y extraerse al máximo la contaminación adherida (mediante agitación con perlas de vidrio incidentes sobre esta superficie, para asegurar el desprendimiento de posibles biofilms), nos permite evaluar de un modo mucho más real (básicamente *in situ*) la contaminación industrial y la higienización. Además, se presentan en un soporte de 3 sensores, es decir, podemos disponer de 3 muestras, lo que permite poder realizar un seguimiento de la evolución temporal en el control de un mismo punto.

8.3. Aplicación de métodos rápidos

Las principales limitaciones de las técnicas de análisis convencionales provienen de la necesidad de enriquecimiento de la muestra (debido a que los límites de detección no son lo suficientemente bajos), como hemos visto en el apartado 8.2, de las tasas de recuperación de bajas, según se indica en 8.2.1. y, según se indica también en ese apartado, del tiempo prolongado necesario para la culminación del análisis (que hace completamente inviable la respuesta industrial rápida o *in situ*). Además el tamaño de superficie evaluado es limitado (salvo que se incurra en costes desmesurados del muestreo), que ha de ser regular (superficie plana y lisa) para la aplicación de alguno de los métodos. Por otra parte la complejidad de estos ensayos, con métodos manuales de recuento también complejos, hace necesaria la tenencia de un laboratorio propio en las industrias o el recurrimiento a laboratorios externos.

Para certificar la seguridad integral del abastecimiento de alimentos se requieren pues métodos modernizados, enfocados a una supervisión rápida, eficaz y precisa de la higiene, la identificación de peligros biológicos y la valoración de la calidad del producto (Chen, 2003). Dichos métodos

permiten el control del proceso de elaboración y la vigilancia de la eficacia de los sistemas de higienización, para poder así aplicar las medidas correctoras oportunas en el mismo momento que se efectúan las determinaciones (Holah y cols., 1988; Boer y Beumer, 1999). Se requiere que tales métodos posean una sensibilidad similar o mayor que los convencionales, y que sean robustos y confiables, con una especificidad que minimice resultados falsos-positivos (Keith, 1997).

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

Estos métodos incluyen, entre otros, ensayos basados en anticuerpos, en amplificación genética, en detección de Adenosina Trifosfato (ATP) y técnicas microscópicas (Teufel y Redl, 2006; Nugen y Baeumner, 2008).

8.3.1. Sistema automatizado TEMPO

Los métodos tradicionales empleados para conocer la cantidad de microorganismos en una muestra requieren la lectura manual y subjetiva de colonias presentes en las placas. La Asociación Francesa de Normalización (AFNOR) otorgó el certificado de acreditación del sistema TEMPO, en el año 2013, para la enumeración de la biota aerobia mesófila, teniendo en cuenta como referencia de validación la Norma EN ISO (Octubre 2003): Microbiología de los alimentos -Protocolo para la validación de métodos alternativos, y como método de referencia la Norma EN ISO 4833: Directrices generales para la enumeración de microorganismos - método por el recuento de colonias obtenidas a 30°C. El sistema está basado en el fundamento tradicional del recuento estadístico por la técnica del Número Más Probable (NMP). Al ser automatizado asegura resultados rápidos, estandarizados y exactos, y minimiza el factor de variabilidad del operario, incrementando la uniformidad de resultados. Permite la enumeración de la flora ambiental en 24 h y realizar hasta 500 tests al día.

El sistema TEMPO está compuesto de viales, tarjetas, TEMPO filler y dos estaciones de trabajo: una estación de preparación (TEMPO Prep) y una estación de lectura (TEMPO Reader).

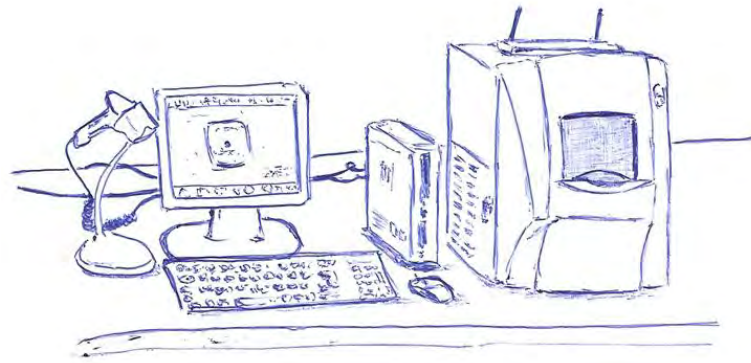


Figura 11: Estación de lectura TEMPO de la casa Biomérieux.

8.3.2. Microscopía de epifluorescencia directa

La microscopía de epifluorescencia directa (DEM) es una técnica de microscopía idónea para examinar la adhesión celular y formación de biofilms en superficies alimentarias, porque permite la detección selectiva y específica de moléculas en concentraciones pequeñas para cuantificar y demostrar la viabilidad de los microorganismos que permanecen en las superficies de contacto con alimentos, incluso tras la aplicación de tratamientos de higienización aparentemente satisfactorios (Pontefract, 1991; Yuste, 2005), donde los objetos de interés fluorescen y permiten marcar virtualmente cualquier aspecto de los sistemas biológicos (Lichtman y Conchello, 2005).

Los primeros investigadores que adoptaron la DEM como sistema de control de la higiene de superficies fueron Holah y cols. en 1988. Describieron la DEM por filtración como una técnica que permite cuantificar y demostrar la viabilidad de los microorganismos que permanecen en las superficies de contacto con alimentos en menos de 30 minutos (Holah y cols., 1988; Pontefract, 1991). Los recuentos celulares por microscopía directa dan un resultado, al menos en una unidad logarítmica, mayor que el método de cultivo convencional (Holah y cols., 1988). Esto puede deberse a que la bacteria no crece bajo condiciones tales como las de la placa del método de cultivo o a que un número mayor de bacterias permanecen sobre la superficie después del hisopado (Wirtanen y Salo, 2003).

La fluorescencia es una característica que exhiben algunos átomos o moléculas denominados fluoróforos, que tienen la capacidad de absorber la luz de una determinada longitud de onda y emitirla a una longitud de onda mayor (Herman, 1998; Li y cols., 2004; Petty, 2007). El fluoróforo es promovido a un estado de energía alta (estado excitado) seguido por la emisión de luz (fotones), de una longitud de onda más larga y de una intensidad más baja que la de la luz absorbida debido a la pérdida de energía vibracional al medio ambiente, conocida como

fluorescencia (Li y cols., 2004; Petty, 2007). Esta fluorescencia ocurre cuando el electrón excitado regresa a una órbita de baja energía y emite un fotón de luz, el componente aparece brillante sobre un fondo oscuro (Takekuchi y Frank, 2001; Mostert y cols., 2005).

Para la cuantificación de células viables y no viables se utilizan sistemas de recuento automatizados, basados en programas informáticos de análisis de las imágenes obtenidas. Se puede extraer una valiosa cantidad de información (área, diámetro, perímetro, etc.) en poco tiempo, mediante la ordenación de una serie de parámetros (Maukonen y cols., 2003). Las imágenes analizadas se pueden almacenar en un soporte informático para ser reevaluadas o interpretadas desde otros puntos de vista, incluso por otros laboratorios (Rodrigues y cols., 2001).

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

La aplicación de la microscopía de epifluorescencia fue utilizada por Wirtanen y cols., (1996), para determinar el área de cubrimiento de los biofilms formados por diferentes microorganismos (*Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Pediococcus inopionatus*, *Pseudomonas fragi* y *Pediococcus inopinatus*) sobre muestras de acero inoxidable. Las muestras fueron lavadas y teñidas con naranja de acridina durante dos minutos para luego ser observadas al microscopio.

Los microscopios de fluorescencia, dependiendo de la luz incidente, se clasifican en dos grupos: los de transmisión de luz y los de fluorescencia de luz incidente o epi-iluminación. Los microscopios de fluorescencia de transmisión de luz requieren una alineación cuidadosa del condensador de luz y de las lentes de los objetivos, para evitar interferencias entre la luz de excitación y la fluorescencia emitida, mientras que en el microscopio de luz incidente, el condensador es también el objetivo, por lo tanto sólo existe una trayectoria óptica al detector y la alineación es perfecta (Takeuchi y Frank; 2001). Otra de las características del microscopio de epifluorescencia es el uso efectivo de un segundo filtro, llamado espejo dicróico, diseñado para reflejar la luz de longitud de onda más corta mientras transmite la luz de onda más larga (Figura 12); siendo éste una de las ventajas del microscopio de fluorescencia de luz transmitida (Herman, 1998; citado por Li y cols., 2004). Los

elementos principales del microscopio de epifluorescencia son pues: i) Filtro de excitación, su función de seleccionar la luz de la longitud de onda incidente, ii) espejo dicroico, tiene la propiedad de reflejar la luz de ciertas longitudes de onda y dejar el paso de otras, iii) filtro de emisión, es el filtro que selecciona la luz de la longitud de onda fluorescente. Las posibles fuentes de luz corresponden a lámparas halogenadas de tungsteno, mercurio de alta presión, xenón, combinación de lámpara o láser de mercurio y xenón, capaces de emitir la energía de la excitación en diversas longitudes de onda (Herman, 1998).

La microscopía láser de escaneo confocal (CSLM) tiene algunas ventajas sobre la microscopía de epifluorescencia. La CSLM es una versión mejorada del microscopio de epifluorescencia, que crea un plano de foco fino para obtener secciones ópticas o escaneo XZ. Estas secciones ópticas, a continuación, se agrupan en un software para generar una imagen reconstituida tridimensional (Palmer y Sternberg, 1999).

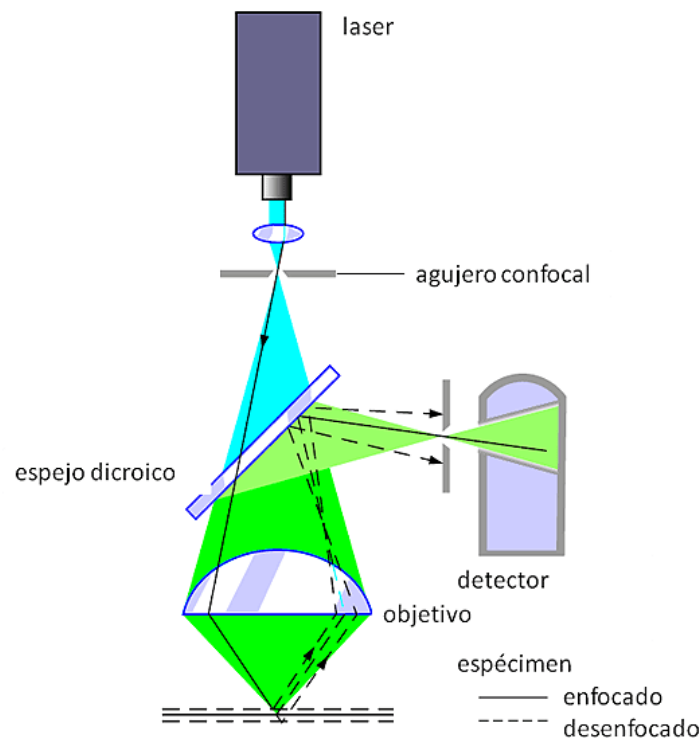


Figura 12: Esquema del microscopio confocal y el trayecto de luz. El rayo láser (luz azul) es filtrado por un agujero y un espejo dicroico; luego es enfocado mediante un lente objetivo sobre el espécimen y estimula la fluorescencia presente en el mismo (luz verde). La fluorescencia es recolectada por el objetivo y dirigida al espejo dicroico, que la refleja y dirige hacia un detector. Un segundo filtro con agujero se coloca frente al detector y sólo deja pasar la luz proveniente del plano de enfoque (línea continua). La fluorescencia fuera de foco de las zonas que están por encima y por debajo del plano de enfoque (en líneas discontinuas) no pasa por el agujero y por lo tanto no formará parte de la imagen. (Olschewski, 2000).

8.3.3. Pruebas inmunológicas

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

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

Keith (1997) realizó un estudio donde comparó el ensayo VIDAS con el método de cultivo convencional para la detección de *Salmonella* en muestras de leche, suero y productos con maltodextrinas, y la detección global obtenida fue del 96% y 97% para VIDAS y método de cultivo convencional, respectivamente.

8.3.4. Pruebas enzimáticas

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

8.3.4.1. Principio de bioluminiscencia

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

8.3.4.2. Ventajas y limitaciones

Actualmente la bioluminiscencia es usada ampliamente para llevar a cabo una valoración rápida de las condiciones de procesamiento y de la carga microbiana en los alimentos. En contraste con la técnica del hisopado, la medida de ATP no evalúa únicamente la contaminación microbiana, sino además la limpieza de los equipos y superficies del procesamiento de alimentos (Chen, 2003). Los ensayos de bioluminiscencia tienen la ventaja de que pueden ser suficientes cuando en una empresa predomina el interés por el seguimiento general de la higienización, sin necesidad del aislamiento, recuperación e identificación de bacterias específicas (Gracias y McKillip, 2004). El ensayo presenta algunas limitaciones, pues algunos factores pueden influir en la reacción, como pH, temperatura, presencia de inhibidores de la enzima (detergentes) y otros (Boer y Beumer, 1999). Además, algunos limpiadores y desinfectantes pueden incrementar o extinguir la señal de bioluminiscencia ocasionando resultados falsos (Velázquez y Feirtag, 1997), y, por otra parte si se requiere que el ensayo detecte únicamente microorganismos se debe diferenciar el ATP microbiano del ATP somático. El ATP no se encuentra solamente en células microbianas vivas, sino también en otras células no microbianas, a las que se denomina células somáticas, con una simple capa de membrana, que forman parte integrante del alimento. Los productos alimenticios y las bebidas, por ejemplo, pueden contener células, como células de frutas en zumos de frutas, que contienen importantes cantidades de ATP -ATP somático- (Dallos, 2008; Rijckx, 2011). Se debe pues diferenciar el ATP, ya sea por filtración o destrucción del somático, lo cual extiende el tiempo del ensayo y disminuye la sensibilidad (Maukonen et al., 2003). Algunos autores han descrito límites de detección con el uso del ATP para estimar el recuento total de células viables entre 10^4 y 10^5 ufc/ml (Vanne y cols., 1996; Corbitt y cols., 2000) y otros de 10^3 - 10^4 ufc/ml (Chen, 2003). También hay que diferenciar el ATP libre, en residuos de material orgánico, no contenido dentro de las

células (Dallos, 2008). 3M MLS incluye un paso para reducir la cantidad de células somáticas y ATP libre para permitir una detección precisa de ATP microbiológico (contaminante); esto se logra usando una enzima que degrada el ATP llamada ATPasa (Dallos, 2008).

No es de esperar una excelente correlación entre la técnica del hisopado y la del ATP, debido a la presencia de residuos alimentarios y a la aparición de esporas sin replicar o microorganismos lesionados (Griffiths, 1996). Costa y cols. (2006) hicieron un estudio para valorar los procedimientos de limpieza y desinfección en superficies de contacto (acero inoxidable) en una industria láctea y no encontraron correlación entre las unidades relativas de luz (URL) y los recuentos tradicionales para clasificar las superficies, aunque los autores sugirieron que el ATP por bioluminiscencia proporciona una herramienta apropiada y complementaria para controlar los procedimientos de higienización. Murphy y cols. (1998), al evaluar superficies de contacto con la leche post-pasteurización, después de la limpieza y antes de la desinfección del sistema, encontraron que la microbiología convencional fue más sensible que la bioluminiscencia cuando los niveles de ATP fueron bajos (< 100 URL). Además se detectó ATP no microbiano de las películas residuales de leche libres de microorganismos. Poulis y cols. (1993), evaluando la eficacia de la limpieza en industrias de alimentos, encuentran una pobre relación entre las determinaciones microbianas tradicionales y la determinación mediante ATP bioluminiscencia (combinada con la determinación de la contaminación no microbiana en las superficies muestreadas). Carrascosa y cols. (2012), en la evaluación de cinco industrias queseras, detectan con la metodología ATP un porcentaje de superficies inaceptables del 47,7%, frente al 41% con placas de contacto y el 34,2% con laminocultivos.

8.3.5. Métodos basados en la amplificación molecular

A finales de los años ochenta la hibridación del ADN se consideró para desarrollar métodos de enumeración cuantitativos y muy específicos, además con un tiempo de análisis corto. Su implementación es significativa en los métodos de pruebas de diagnóstico molecular, especialmente los que incorporan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Cockerill y Reischl, 2002).

La PCR es una técnica usada para la amplificación del ADN *in vitro*. El ensayo se lleva a cabo en un termociclador de ADN que proporciona ciclos repetidos de cambios de temperatura. Durante esos ciclos y en un periodo de tiempo corto pueden ser amplificados niveles muy bajos de ADN diana a millones de copias (Chen, 2003). La PCR se ha convertido en la técnica de amplificación de los ácidos nucleicos de uso general (Mackay, 2004). La introducción de la PCR en los diagnósticos

microbiológicos ha sido establecida por los laboratorios de investigación como una alternativa valiosa a los métodos de detección tradicionales (Malorny y cols., 2003b).

Salim Ammor y cols. (2004), realizan una identificación fenotípica y mediante técnicas de biología molecular de 88 cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de un embutido curado. Ya en la introducción explican que el primer método no es suficiente para una identificación inequívoca, mientras que la biología molecular proporciona precisión y rapidez. La caracterización por ambas vías condujo a una coincidencia en la identificación del 83% de las cepas.

8.3.5.1. PCR convencional

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

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

molecular conocido (bases de datos), son comparadas para asignar el peso molecular al amplicon medido.

- iv) La cuarta fase se realiza para confirmar que el producto amplificado fue correcto y específico para el ácido nucleico diana esperado. Muchos de los nuevos formatos eliminan la tercera etapa y sólo realizan esta cuarta confirmatoria, utilizando formatos como *Southern blot* o ensayos de captura de hibridación enzimática.

Las pruebas de PCR convencional requieren por tanto al menos 2 a 3 días de laboratorio para completarse (Rodríguez-Lázaro y cols., 2003).

8.3.5.1.1. Limitaciones de la PCR convencional

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

A pesar de que la amplificación *in vitro* del ADN por PCR es una herramienta poderosa en el diagnóstico microbiológico, el método produce resultados inconsistentes entre laboratorios expertos y otros usuarios debido a la carencia de validación internacional y de protocolos estándares, además de a la calidad variable de reactivos y equipos. En 1990 la Comisión Europea autorizó un proyecto de investigación denominado "FOOD-PCR" enfocado a solucionar esta problemática, para validar y estandarizar el uso de la PCR convencional para la detección de los cinco patógenos más importantes en alimentos: *Campylobacter* spp. termófilo, *E. coli* O157, *Y. enterocolítica*, *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. (Malorny y cols., 2003a; Malorny y cols., 2003c). Algunos métodos estándares sugeridos por el proyecto FOOD-PCR han sido adaptados para el uso de la PCR en tiempo real, por ejemplo, el sistema de PCR convencional validado internacionalmente para la detección y cuantificación de *Salmonella* spp. (*gen invA*) usando sonda TaqMan® (Hein y cols., 2006).

8.3.5.2. PCR en tiempo real

La técnica PCR en tiempo real (RTi PCR) se desarrolla con la finalidad de superar el problema mencionado. Propone establecer una relación entre la concentración de ADN diana y la cantidad

de producto de la PCR generado por la amplificación (Weighardt, 2003). Es un sistema que monitoriza la reacción a medida que tiene lugar; el término “PCR en tiempo real” implica que los amplicones pueden ser detectados en tiempo real, es decir, después de cada ciclo de PCR (Cockerill y Reischl, 2002; Uhl y cols., 2002).

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

8.3.5.2.1. Introducción del control interno de amplificación

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

8.3.5.2.2. Ventajas y limitaciones de la PCR en tiempo real

Las principales ventajas son (Klein, 2002; Rodríguez-Lázaro y cols., 2003):

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

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

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

Estudios más recientes de la RTi-PCR incluyen la combinación de varios métodos de preparación de la muestra, cuya finalidad es separar y concentrar los microorganismos diana, separar las partículas de la matriz alimentaria y eliminar del alimento las sustancias inhibidoras de la reacción que pueden ocasionar resultados falsos negativos (Notzon y cols., 2006; Fukushima y cols., 2007). Los métodos son aplicados previamente a la RTi PCR, métodos tales como la separación inmunomagnética (Notzon y cols., 2006), la inmunocaptura mediante flujo continuo, FTI (Yuk y cols., 2006; Warren y cols., 2007) o la centrifugación con soluciones de distintos gradientes de densidad, BDC (Fukushima y cols., 2007).

A pesar de que la aplicación de la PCR en tiempo real es frecuente para muestras alimentarias y ambientales, a nivel de superficies no hay demasiados trabajos. Entre ellos, podemos mencionar los estudios donde se aplicó RTi-PCR para detectar y cuantificar aerosoles de endosporas de *Bacillus subtilis* subespecie *niger* como biocontaminante (Buttner y cols., 2001) y en la detección de una bacteria simulante (*Erwinia herbicola*) de agentes biológicos relacionados con el bioterrorismo, como *Yersinia pestis* y *Francisella tularensis* (Buttner y cols., 2007). Estos autores evaluaron varios métodos de muestreo de superficies y demostraron la habilidad de la RTi-PCR cuantitativa para incrementar la detección y enumeración de biocontaminantes sobre superficies de diversos materiales. Por otra parte, Martinon y cols. (2012) realizaron un estudio con el fin de cuantificar mediante PCR en tiempo real, la cantidad de células viables de *E. coli*, *S.aureus* y *L. monocytogenes* recogidas a partir de torundas o frotis aplicados en superficies donde se han procesado alimentos contaminados de forma artificial con dichos microorganismos. Los resultados mostraron que no existen diferencias significativas entre los recuentos en placa y los análisis con PCR en tiempo real, con lo que se demostró este método puede ser aplicado para la enumeración

de células viables en superficies que entran en contacto con alimentos con altas cargas microbianas o para realizar un seguimiento de la eficacia en la desinfección de superficies.

8.3.6. Espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR)

Adicionalmente a lo expuesto, otra alternativa que se estudia en la actualidad, de forma más reciente, es la aplicación de la espectroscopía, en concreto de la tecnología NIR. Si bien esta tecnología es conocida, se ha empleado fundamentalmente para la determinación de parámetros físico-químicos en muestras procesadas para el correspondiente análisis, y, hasta el momento, hay pocas iniciativas de investigación que analicen la eficiencia de esta tecnología en el control de patógenos en muestras de alimentos sin tratar mediante picado o triturado, y básicamente son casi inexistentes los que evalúan las posibilidades de aplicación en la determinación de contaminación superficial. Por otra parte los modelos matemáticos aplicables a la calibración de la metodología NIR son variados, complejos y en continua evolución.

Según indica Wells Moncada en su tesis (2006), “la técnica NIR fue aplicada por primera vez al análisis de carne en 1968, por Ben-Gera y Norris, quienes, utilizando medidas de transmitancia, obtuvieron la composición química de productos cárnicos, y desde entonces han sido publicados numerosos trabajos en torno a este tema”. Por ejemplo, como refiere Wells, entre otros estudios, “Ding y cols. (1999) utilizaron la técnica de la espectroscopía NIR para diferenciar origen de la carne de pollo -broilers y pollos chinos locales-, utilizando muestras de muslo y pechuga picadas y sin picar, con piel y sin ella” y -dice Wells- “Alomar y cols. (2003) utilizaron NIR como herramienta discriminante para separar diferentes músculos (*Longissimus*, *Semitendinosus* y *Supraspinosus*), diferentes razas (Friesian y Hereford) y diferentes tipificaciones de animales bovinos”.

Por otra parte, el propio Wells (2006) trabaja en la caracterización físico-química de carne de cordero, previamente molida, González-Redondo y cols. (2010) indagan en la composición química de carne de conejo mediante la tecnología citada una vez las muestras han sido picadas, Prieto y cols. (2006) aplican tecnología NIR para estimar parámetros indicativos de la calidad de carne de vacuno a partir de muestras también picadas, Solís y cols. (2001) evalúan la composición del lomo de cerdo ibérico con esta tecnología a partir de muestra igualmente triturada.

En cuanto a la determinación microbiológica en sí, Ellis y cols. (2002), evalúan, con buenos resultados, la carga microbiana de pechugas de pollo mediante espectroscopía infrarroja aplicando la transformada de Fourier. Lin y cols. (2004), emplean la metodología para la detección cuantitativa rápida de la carga microbiana de carne de cerdo. Horváth y cols. (2008) analizan de

modo no destructivo lonchas enteras de carne de cerdo mediante técnica NIR (y los oportunos modelos matemáticos de calibración y corrección), determinando su frescura y carga microbiana, durante su periodo de almacenamiento. El ensayo corrobora el potencial de la técnica NIR para monitorizar la pérdida de frescura y la carga microbiana de las muestras de carne. Girón Hernández y Grau Meló (2009), desarrollan una técnica de análisis con la finalidad de evaluar el estado de frescura de carne de pollo fileteada, y además envasada, de forma no destructiva mediante el empleo de un método multiespectral de onda corta que abarca el espectro del infrarrojo cercano (SW-NIR). Después de cada captura de imagen, se hacen determinaciones fisicoquímicas y microbiológicas (Humedad, actividad de agua, pH, nitrógeno básico volátil total y unidades formadoras de colonias -ufc/g-) para predecir la degradación bioquímica de las muestras. Los resultados obtenidos mostraron cómo los parámetros físico-químicos y microbiológicos que mejor explicaron la pérdida de frescura fueron pH, N-VBT y ufc/g con un R^2 de predicción de 0,998, demostrando que SW-NIR puede ser una herramienta en el control de la frescura de la carne de pollo fileteada y envasada (aunque son necesarios sucesivos estudios a fin de profundizar en la técnica y obtener una herramienta totalmente fiable y aplicable al sector, advierten los autores).

ASINCAR (Asociación de Industrias Cárnicas del Principado de Asturias) también trabaja con la misma metodología para determinar la microbiología de alimentos, como puede deducirse de la publicitación de sus proyectos Vuchek y Meatchek en la “Jornada de Centros Tecnológicos” (Anónimo, 2014), para los que refiere la “Incorporación de tecnologías rápidas *on line* para el control microbiológico y de la vida útil, en alimentos envasados y/o en fresco, mediante la tecnología NIR portátil. Identificación de origen de piezas cárnicas en fresco y en elaborados cárnicos”. Natalia Prado (identificada como personal de ASINCAR en el programa de presentación del XIX Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos en la Universidad de Zaragoza en 2014, donde figura la ponencia “Evaluación del uso de la tecnología VIS-NIR para el control *in situ* de la calidad microbiológica de la carne fresca de pollo”) y colaboradores (2011), emplean metodología NIR para cuantificar aerobios mesófilos, enterobacterias y bacterias ácido lácticas en carne de cerdo envasada y sin envasar.

Riikka y Åsmund Rinnan (2007) aplican la técnica NIR para el análisis de tierras, concluyendo que dicha técnica puede ser usada para predecir su contenido orgánico y la biomasa fúngica.

Boziaris (2014), expone estudios para la diferenciación de bacterias Gram positivas (*L. monocitogenes*, *B. subtilis* y *B. cereus*) y Gram negativas (*E. coli* y *Salmonella* spp.), basándose en su espectro NIR en la región 1.200-1.350 nm, analizando en superficies de inoxidable pocillos conteniendo muestras bacterianas.

8.3.7. Medidas eléctricas. Impedancia

Una aplicación relativamente reciente de la impedancia eléctrica es el monitoreo automático de impedancia en microbiología. La aplicación de la impedancimetría en microbiología se conoce clásicamente como “microbiología de impedancia” (MI), o, como la recientemente incorporada, “espectroscopía dieléctrica”. Es un conjunto de técnicas que permiten monitorear, detectar, cuantificar y aún identificar microorganismos en muestras provenientes de la industria o la práctica médica. Consiste en realizar mediciones de las componentes de impedancia (por ejemplo conductancia, capacidad, módulo de impedancia o ángulo de fase) empleando el método bipolar, o el tetrapolar, con electrodos sumergidos en una celda que contiene un medio de cultivo inoculado que es mantenido a temperatura constante. Para muestras muy contaminadas, que son críticas en un medio industrial o clínico, la impedancimetría proporciona aumentos en la velocidad de detección de contaminación de 2 a más de 30 veces (Felice, 1995).

Pueden encontrarse en el mercado equipos para la detección de microorganismos, basándose en su actividad metabólica, mediante impedancia electrónica. El método de impedancia detecta entre 1 y 10^8 microorganismos/ml entre 5 y 50 horas, con una excelente repetibilidad ($< 3\%$ Coeficiente Variación) (Fernández, 2008).

Álvarez, y cols. (2005) evalúan muestras de superficies de una industria cárnica, recogidas mediante hisopado después de las operaciones de higienización, con el equipo “Bactometer M128”, de la casa Biomérieux y comparan los resultados con la medición tradicional empleando medios de cultivo y recuento en placa. Realizados ajustes para optimizar la neutralización de residuos de desinfectantes en las muestras, se obtiene una buena correlación entre ambos métodos ($r^2 > 0,9$).

Cuenca Díaz (2011), analiza los espectros de impedancia de tres tipos de jamones. Las mediciones se realizaron en medio líquido (sobre el filtrado obtenido para la detección de cloruros) y en la matriz sólida (directamente en muestra de jamón). En general, se observó mayor correlación entre las medidas de impedancia realizadas en medio sólido y los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos que cuando las determinaciones se realizaron sobre matriz líquida. Se emplearon tres electrodos distintos: aguja coaxial, electrodo doble y punta de flecha. Sólo en el caso de las bacterias ácido lácticas la predicción obtenida con la aguja coaxial en medio líquido fue superior a la observada en medio sólido. De los tres electrodos, la aguja coaxial fue la que mostró mejor correlación con los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos, excepto para enterobacterias y cloruros, en los que los mejores resultados se obtuvieron con el electrodo doble.

La MI es un método indirecto, no se mide directamente la presencia de células sino su actividad metabólica. De ahí el interés por la medición directa de la población celular mediante el monitoreo de las propiedades dieléctricas de los organismos en sí mismos. Equipos como el “Biomass Monitor”, de la casa Aber Instruments, se basan en este fundamento (Felice, 1995).

8.3.8. Métodos rápidos orientativos

Como sustitutos de la percepción visual, pero igualmente rápidos y poco menos económicos, en los últimos años aparecen en el mercado productos que, pulverizados sobre las superficies, cambian su coloración y/ o emiten burbujeo ostensible en presencia de contaminación. Pueden verse, por ejemplo, las características del producto “Biofinder”, de la compañía Itram Higiene, en sus páginas comerciales. Esto permite al industrial conocer de modo inmediato y absolutamente económico si las operaciones de limpieza se han realizado aparentemente con eficacia, empleando un método de inspección más fiable que la simple percepción visual. Estas metodologías no permiten sin embargo la cuantificación de la carga contaminante.

9. Diseño de industrias y superficies de contacto con los alimentos. Nuevos enfoques para reducir la carga microbiana de las superficies

En la medida de lo posible, el diseño y la disposición interna de los establecimientos alimentarios deben permitir las buenas prácticas de la higiene alimentaria, incluyendo la protección contra la contaminación cruzada, entre y durante las operaciones alimentarias (Codex Alimentarius, 2003). Para comenzar, un diseño higiénico de plantas de fabricación de alimentos debe incluir una serie de barreras de protección del producto del medioambiente y de las actividades ajenas a la manipulación del alimento en sí, y, ya en el área de producción de alimentos, debe predecirse la separación de zonas de productos intermedios y finales entre sí y con áreas de mantenimiento, ensayos de calidad, etc. (Holah, 2014). El estatus de contaminación de las líneas de procesado y equipos está influenciado por la compartimentación de las líneas de procesado: con escasa compartimentación es mayor la contaminación por *Listeria monocytogenes*. La separación entre áreas de materia prima cruda y las de post-tratamiento con calor es especialmente importante para salvaguardar el estatus de no contaminación de estas últimas áreas (Lundén y cols., 2003). Ruckeri y cols. (2014), exponen cómo, después del entrenamiento del personal, el establecimiento

de un correcto flujo de producción y una estricta compartimentación de las áreas de higiene, se redujo a cero la presencia *Listeria monocytogenes* en superficies de contacto con alimentos, partiendo de un 4,7% de positivos (en cintas de transporte, equipos de loncheado, mesas, etc.) en una industria de elaboración de queso fresco.

En cuanto a los sistemas de ventilación, hay que poner un énfasis especial en la calidad del aire interior para la preservación de los alimentos, sin olvidar el aumento de la preocupación en cuanto a sus posibles efectos nocivos sobre la salud (Cowan y cols., 2003).

En cuanto al empleo de materiales de construcción de instalaciones o de conformación de equipos y materiales, las bacterias pueden degradar superficies poliméricas, utilizando sus componentes como fuente de alimento, llegando a producir tinciones de las superficies, picaduras y malos olores. Los polímeros también pueden proveer una superficie de crecimiento y proliferación de organismos patógenos (Eversdijk y cols., 2012). No es posible identificar un material resistente al ataque bacteriano apropiado para todos los fines (Faille y Carpentier, 2009), pero, en estudios comparativos el acero inoxidable ha demostrado ser el material con menor adherencia de microorganismos o el de más fácil limpieza (Midelet y Carpentier, 2002; Somers y Wong, 2004; Rodriguez y McLandsborough, 2007). Por el contrario, la persistencia bacteriana se ha asociado al empleo de materiales porosos (Mead y Scott, 1994), y, además, dado que la facilidad de ser limpiados es crucial cuando se escogen materiales, los porosos deben ser evitados. Por todos estos motivos se están estudiando diferentes formas de prevenir el crecimiento de microorganismos en los materiales.

La fijación microbiana a las superficies es un proceso bastante rápido, y por tanto no es factible industrialmente (el descenso de productividad sería excesivo) limpiar y desinfectar continuamente para evitar tal adhesión, si bien debe determinarse cuidadosamente una frecuencia para evitar la maduración del biofilm y la acumulación de materia orgánica absorbida (nutrientes). Las propiedades higiénicas de las superficies de los materiales pueden verse alteradas por modificaciones específicas, para que sean intrínsecamente antibacterianas y/o menos susceptibles a la fijación (Mettler y Carpentier, 1998). Así, se han realizado estudios con capas de recubrimiento que disminuyen la fijación de ciertos microorganismos, o estudios para la incorporación de metales de transición catalíticos dentro de superficies de polímero, promoviendo la formación de especies reactivas al oxígeno, como los peróxidos y los persulfatos. Un programa de control eficaz se basa, evidentemente, en los sistemas de detección adecuados para monitorizar la colonización bacteriana de las superficies y el control de los biofilms en estados tempranos del desarrollo (Simoës y cols., 2010).

Una cantidad significativa de estudios se han dirigido hacia la ingeniería, química o enzimática, de superficies en contacto con alimentos y/o de alto riesgo, desarrollando materiales antimicrobianos para prevenir o inhibir el crecimiento, proliferación y formación de biofilms de microorganismos patógenos (Shi y cols., 2004; Adamopoulos y cols., 2007; Cao y cols., 2009). Por ello se utilizan ya diferentes agentes antimicrobianos en gran variedad de superficies, tales equipos médicos y de hospitales, purificación de agua, procesado, almacenamiento y transporte de alimentos, y en general en una amplia gama de materiales relacionados con la industria, el medioambiente, la higiene y algunas aplicaciones bioprotectoras (Cao y cols., 2009).

A nivel de materiales utilizados en el ámbito alimentario, existen algunos que poseen un efecto bacteriostático sobre algunos microorganismos patógenos, es el caso del caucho que actúa sobre *L. monocytogenes* (Trachoo, 2003). En la evaluación de la supervivencia de aerosoles de *Pseudomonas fluorescens* y *Enterococcus faecalis* sobre superficies inertes, se apreció que el tipo de material presentó un efecto significativo sobre la supervivencia de los microorganismos, obteniendo como resultados, según el crecimiento bacteriano, de mayor a menor: acero inoxidable, vidrio y PVC. El efecto letal del PVC se debe a su elevada reactividad, gracias a sus sitios oxidantes, a la liberación de ácido clorhídrico y a la presencia de aditivos (Robine y cols., 2000).

9.1. Agentes antimicrobianos

Los biocidas son agentes antimicrobianos que poseen efectos tanto bactericidas como bacteriostáticos. Son utilizados en gran variedad de plásticos y materiales poliméricos, ya sea depositando una capa protectora bactericida (basados en la inmovilización o liberación de sustancias) (Glinel y cols., 2012), como dentro de la misma matriz polimérica (Nichols, 2005; Cao y cols., 2009). El convertir los polímeros inherentemente en antimicrobianos puede ayudar a mantener baja la población microbiana presente, reduciendo así el riesgo de contaminación cruzada y la posibilidad de transmisión de infecciones, de gran importancia en ambientes como hospitales, industrias de alimentos y lugares de consumo (Jones, 2009). Por otra parte, la aplicación de polímeros antimicrobianos disminuye los problemas medio ambientales que acompañan al empleo frecuente de agentes limpiadores y desinfectantes y mejoran por otra parte su eficiencia (Cen y cols., 2003).

Alternativamente, los materiales pueden ser impregnados con agentes antimicrobianos, como antibióticos, compuestos de amonio cuaternario o iones de plata o yodo, que se liberan

gradualmente a través del tiempo en la solución que los rodea con el objetivo de eliminar los microorganismos (Tiller y cols., 2001). En las últimas décadas han sido aplicados biocidas de bajo peso molecular, tales como el clorhidrato de fenol, derivados de isotiazolona que liberan cloro N-halaminas, así como las sales y complejos de metales (normalmente Zn, Ag y Cu) (Malachová y cols., 2011). De los óxidos metálicos, el TiO₂, ZnO, MgO y CaO son de particular interés, pues son estables bajo condiciones de proceso complejas (pHs extremos, elevadas o bajas temperaturas, altas concentraciones de solutos, etc.) (Zhang y cols., 2007). En muchos de estos casos es posible sustituir una sustancia de bajo peso molecular por agentes antimicrobianos macromoleculares (Seyfriedsberger y cols., 2006).

La adición de componentes químicos bioactivos en los polímeros se ha empleado tradicionalmente para prevenir la degradación de plásticos (decoloraciones, piques, manchas, etc.). Más recientemente, y también como añadido en previsión de la degradación, para dotar al material de un efecto externo antimicrobiano o higiénico que evite la proliferación microbiana que puede, de otra manera, consumir nutrientes del polímero o adaptarse y crecer sobre la superficie (Nichols, 2005; Eversdijk y cols., 2012).

Un amplio rango de estos productos antimicrobianos ya se está comercializando, incluso en aplicaciones domésticas como utensilios de cocina, tubos, filtros de aire, contenedores, etc.; así como en las áreas de envasado de alimentos o en medicina, al poder añadirse a envases, guantes, catéteres y vendajes para quemados, entre otros (D'Arcy, 2001).

Generalmente existen dos tipos de agentes antibacterianos, los orgánicos y los inorgánicos. Los orgánicos están representados por antibióticos y compuestos orgánicos complejos y los inorgánicos se agrupan en sales o iones metálicos (Liu y cols., 2007).

9.1.1. Sistemas orgánicos

Dentro de los biocidas orgánicos tenemos, entre otros, los siguientes: péptidos antimicrobianos, revestimiento basado en la contra-autoinducción molecular, revestimiento con base en aceites esenciales y revestimientos basados en enzimas bacteriolíticas (Jones, 2009). Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son secretados por numerosos organismos vivos (microorganismos, vegetales, insectos, peces, anfibios y mamíferos) para su protección contra microorganismos invasivos. Estos péptidos impermeabilizan las membranas y pueden actuar específicamente contra microorganismos patógenos (Glinel y cols., 2012).

Existen sistemas de base orgánica, donde se incluyen las moléculas organometálicas, las cuales fundamentan su actividad en la migración de pequeñas moléculas desde la matriz polimérica hacia la superficie donde se forma una película que induce a un efecto antimicrobiano del polímero. La migración, desde el depósito del biocida, ocurre como resultado del movimiento de las moléculas a un gradiente de baja concentración fuera del material, fenómeno impulsado por las diferencias inherentes de compatibilidad entre los antimicrobianos orgánicos y los sustratos poliméricos en los cuales se dispersan (Jones, 2009). El film resultante en la superficie del polímero es rellenado por aditivo, que sólo difundirá cuando se limpia o lava la superficie o cuando el aditivo se pierde en el medioambiente. El beneficio de este modo de acción es que puede tener una elevada tasa de actividad e interactuar con gran número de bacterias rápidamente. Sin embargo, se afecta a la vida útil de la actividad biocida del material, al ser lixiviado el compuesto activo con el tiempo e ir vaciándose el aditivo del depósito (D'Arcy, 2001).

Una de las limitaciones de las tecnologías orgánicas incluye la falta de aprobación legal para contacto con alimentos, debido a la movilidad y la solubilidad de estos aditivos que podría resultar en la afectación del propio alimento. Por tanto, a la hora de elegir un sistema en contacto directo con alimentos, la tecnología de base inorgánica es la más aceptada (Jones, 2009).

Otro aspecto a considerar con estos sistemas orgánicos es el efecto de la temperatura, que puede influir en la tasa de migración y en la longevidad del sistema activo. Los productos de PVC representan buenos ejemplos donde los sistemas orgánicos son empleados con éxito para proteger contra la degradación microbiana, pero solamente unos pocos biocidas tienen la estabilidad térmica requerida para soportar el riguroso proceso del plástico. Los grupos más comunes de antimicrobianos organometálicos utilizados actualmente son los basados en isotiazolinona (OIT), triclor-hidroxi difenil éter, piritionato de zinc y los materiales basados en arsénico, tales como oxybisfenoxarsina (OBPA), aunque su uso fue restringido en el año 2009, debido al deterioro del medioambiente y a la percepción del mercado con respecto a su perfil de toxicidad a largo plazo (D'Arcy, 2001; Jones, 2009).

9.1.2. Sistemas inorgánicos

Los biocidas inorgánicos utilizan iones de metales como agente biocida activo que, una vez incorporados en la matriz del polímero, se mantienen almacenados dentro, disponibles durante la vida útil del producto, para una liberación gradual hacia la superficie, proporcionando una actividad antimicrobiana continua y duradera (D'Arcy, 2001). Los metales y óxidos metálicos han atraído mucho la atención en las últimas décadas dada su habilidad para soportar condiciones

rigurosas de proceso. Los iones de metales más comúnmente empleados son los de plata, cobre o zinc; de los óxidos metálicos el TiO_2 , ZnO , MgO y CaO son de particular interés, ya que se consideran materiales seguros de baja toxicidad (Zhang y cols., 2007, Jones 2009). Mientras exista migración de iones, desde la matriz al exterior del polímero, estos sistemas de liberación aseguran una reposición constante en la superficie (Jones, 2009). La estabilidad de estos sistemas inorgánicos (aunque algunos se ven afectados por la decoloración) abre un amplio rango de usos en polímeros que pueden beneficiarse con estos aditivos (D'Arcy, 2001; Jones, 2009). Una de las variaciones en estos sistemas inorgánicos basados en iones metálicos son las nanopartículas, desarrolladas principalmente para explorar la posibilidad de poder ofrecer una liberación rápida de iones, como consecuencia de una mayor proporción de radio de partícula (Cheng y cols., 2007).

La nanotecnología es una de las áreas actuales más populares para la investigación en básicamente todas las disciplinas técnicas (Paul y Robeson, 2008). Nos referimos a un material nanoestructurado cuando (Giménez Torres, 2011): i) El material está constituido por partículas primarias nanométricas y presentan una elevada uniformidad (homogeneidad) de tamaños, estructuras, etc. ii) Estas nanopartículas primarias dan lugar a estructuras secundarias ordenadas (denominadas nanoestructuras). La aparición, en las últimas décadas, de la nanociencia y la nanotecnología presenta oportunidades para la exploración del efecto bactericida de las partículas de metales (Ruparelia y cols., 2008). La nanobiotecnología ha emergido de la integración de la nanotecnología y la biotecnología, para desarrollar tecnología biosintética y compatible con el medio ambiente (Rai y cols., 2009). El efecto bactericida de las nanopartículas de metales ha sido atribuido a su pequeño tamaño y su gran superficie en relación al volumen, lo cual les permite interactuar de cerca con las membranas celulares (Ruparelia y cols., 2008).

La ciencia y tecnología de los polímeros está inmersa en la nanotecnología, incluyendo polímeros basados en biomateriales, nanopartículas que liberan medicamentos, partículas en mini-emulsión, películas poliméricas ensambladas capa a capa, nanofibras o mezcla de polímeros y nanocompuestos. Dentro del campo de los nanocompuestos existen diversos temas de trabajo actual, incluyendo compuestos reforzados, propiedades barrera, resistencia a la llama, propiedades electro-ópticas, aplicaciones cosméticas y propiedades bactericidas, entre otras (Paul y Robeson, 2008).

Entre las numerosas nanopartículas que han sido utilizadas como agentes funcionales en polímeros, las de plata representan el más codiciado material, debido principalmente a su carga eléctrica, óptica, catalítica y, particularmente, a su propiedad antimicrobiana, la cual está bien establecida y ampliamente investigada principalmente en sistemas coloidales (Dallas y cols., 2011). Las nanopartículas de cobre tienen un prometedor futuro como agente bactericida, especialmente

en ámbitos hospitalarios y clínicos, sin embargo, otras nanopartículas como las de platino, oro, níquel, hierro, sílice y sus óxidos, no han mostrado efectos bactericidas en estudios con *E. coli* (Ruparelia y cols., 2008).

9.2. Clasificación de superficies antimicrobianas según su modo de acción

Según su modo de acción, las superficies antimicrobianas se pueden clasificar en dos clases (Tiller, 2010);

. Clase 1: Prevención del ataque primario mediante la creación de una superficie no adherente para las células microbianas.

. Clase 2: Eliminación de las bacterias por aproximación.

Ambos enfoques se pueden conseguir, ya sea por modificaciones permanentes de la superficie o por liberación bioactiva de los compuestos.

9.2.1. Superficies que repelen los microorganismos

El efecto de repulsión puede ser logrado mediante superficies que no permiten la adhesión de las proteínas. El uso polietilenglicol (PEG) y otros polímeros sintéticos pueden repeler la adherencia, aunque no eliminan los microorganismos (An y cols., 1998; Tiller y cols., 2001).

Otro método para mantener las células microbianas fuera de las superficies es la creación de materiales que renueven constantemente su superficie (por degradación), también denominado autopulido. Aunque este no mantiene las superficies libres de microorganismos con efectividad, puesto que los procesos de autopulido y formación de film tienen escalas de tiempo diferentes. La última tiene unas pocas horas, mientras que la primera podría estar en el rango de días o meses para proporcionar una protección útil. En la práctica, estos sistemas de autopulido suelen emplearse en combinación con sistemas de liberación de biocida (Tiller, 2010).

Un enfoque más reciente es el de la liberación de sustancias que impiden la adherencia activa de las células microbianas sobre la superficie. Dowling y cols. (2001), estudiaron esto empleando como agente antimicrobiano iones de plata como recubrimiento de sustratos poliméricos. Otro enfoque a tener en cuenta es el empleo de enzimas hidrolíticas, las cuales afectan a la adhesión de

los microorganismos por cuatro vías diferentes (Kristensen y cols., 2008): rompiendo los sitios de unión de los microorganismos, degradando los polímeros del biofilm originados por los microorganismos que se han establecido en la superficie, tales como las proteínas y los polisacáridos, catalizando la liberación de compuestos antibiofouling desde la superficie y obstruyendo la comunicación intracelular durante la colonización de una superficie.

9.2.2. Superficies de contacto activo

El primer modelo de contacto activo se basó en la idea que una membrana activa, mediante un agregado biocida en la superficie de un polímero, podría ser capaz de penetrar la pared celular de las bacterias. Se han estudiado varios compuestos tales como el poli-4-vinil-N-piridinio-hexilo-bromuro sobre vidrio o los grupos dodecil y metil cuaternizados en polietilenamina, efectiva para la eliminación de microorganismos e incluso ciertos virus de la gripe (Lin y cols., 2002a y b).

9.2.3. Superficies que liberan biocidas

Los sistemas que repelen los microorganismos o los eliminan por contacto son los métodos óptimos para la función de una superficie antimicrobiana. Sin embargo, la mayoría de las zonas húmedas y biológicamente contaminadas contienen grandes cantidades de material que se unen de una forma no específica a una superficie y la desactivan completamente. Además, la gran cantidad de microorganismos cubriría, eventualmente, toda la superficie con células muertas, las cuales también anularían su eficacia. En estos casos las superficies que liberan biocida mantendrían su actividad (Tiller, 2010).

a) Liberación controlada

La liberación controlada es el método más antiguo para mantener las superficies libres de biofilms. Sin embargo, todos los sistemas eventualmente se deterioran, volviéndose inefectivos. En todos los casos está involucrado un reservorio importante de agente biocida dentro de una matriz o superficie, en la cual su tasa de liberación puede ser controlada mediante una encapsulación del agente biocida, la solubilidad del compuesto y/ o el equilibrio constante entre el material y el medio circundante (Tiller, 2000). Un método estudiado más recientemente para el control de la tasa de liberación de biocida es el uso de la técnica “capa por capa” (LbL). Este método es uno de los más eficientes en recubrimientos, permitiendo la distribución casi perfecta del biocida dentro de la matriz, y puede ser adaptado a las características de lixiviado de cualquier agente biocida,

incluyendo enzimas antimicrobianas (Li y cols., 2006). Otro método para controlar la tasa de liberación de biocida es la de atraparlos en una matriz que se hidroliza lentamente, los cuales pueden estar incorporados dentro de ácido poliláctico u otro poliéster, multicapas de polielectrolito degradables o incluso el empleo de una matriz que se degrade con una enzima específica (Tiller, 2010).

b) Liberación catalizada

Es un método para obtener una tasa de liberación controlada, sin llegar al agotamiento, con una producción continua de biocida lixiviado por una reacción catalítica. Este método es uno de los más recientes y prometedores, pero la desventaja de este sistema es que los biocidas son altamente reactivos y por lo tanto potencialmente tóxicos. Además, esa energía, que actúa como catalizador, debe estar alimentando constantemente el sistema. La energía catalizadora, con mayor frecuencia, es UV o luz visible, pero pueden ser empleadas fuentes eléctricas o energía química (Linsebigler y cols., 1995).

La catálisis para la formación de biocidas se basa en nanocompuestos orgánicos, fotosintetizadores orgánicos o algunas enzimas. Uno de los biocidas fotocatalizadores con más éxito es el TiO_2 , el cual posee un fuerte poder oxidativo bajo luz UV. En presencia de agua, oxígeno y luz UV, la superficie produce constantemente radicales hidroxilo, peróxido de hidrógeno y otras especies reactivas al oxígeno (ROS) (Nakajima y cols., 2000).

9.3. Superficies poliméricas antimicrobianas a base de plata

La plata es probablemente el más poderoso agente antimicrobiano que exhibe una fuerte toxicidad hacia una amplia gama de microorganismos y, simultáneamente, una baja toxicidad humana (Dallas, 2011). Sin embargo, su aglomeración y compatibilidad con matrices orgánicas pueden implicar el deterioro de sus propiedades mecánicas y disminuir sus propiedades antibacterianas, lo que limita su uso eficiente en materiales antibacterianos (Cheng y cols., 2006). La zeolita de plata está compuesta por metales alcalinotérreos complejos con cristales de aluminosilicato, los cuales son reemplazados parcialmente por iones plata, utilizando el método de intercambio de iones. Así, se fabrican recubrimientos de zeolita de plata para diferentes artículos, a los que se aplican propiedades antibacterianas (Rai y cols., 2009). El empleo de las sales y complejos de plata, a pesar de ser agentes efectivos antimicrobianos, puede resultar indeseable, debido a la adsorción de iones en las células de la epidermis y glándulas sudoríparas (Dallas, 2011).

Sondi y cols. (2004), demostraron la existencia de plata en las membranas de bacterias tratadas. Analizando las células por Microscopía de Transmisión de Electrón y, con el desarrollo de análisis por Espectrometría de Energía Dispersa de Rayos-X, confirmaron la incorporación de plata dentro de la estructura de la membrana celular. Por tanto, la penetración de la membrana celular de la bacteria por las nanopartículas de plata, es un paso previo esencial, causante del efecto antimicrobiano.

Los compuestos que desprenden iones plata, y en particular nanopartículas de plata, han sido ampliamente investigados debido a su potencial aplicación en catálisis, bioquímica y medicina, presentando una potente actividad antimicrobiana ante un amplio espectro de bacterias (Giménez Torres, 2011). Catéteres centrales venosos (CVCs) se emplean para el tratamiento de neonatos y pacientes sometidos a quimioterapia o hemodiálisis (para facilitar la monitorización de parámetros hemodinámicos, o la administración de medicación). Pero son comunes complicaciones como infecciones del flujo sanguíneo (predominantemente causadas por *S. aureus* y difíciles de tratar) o tromboembolismo. Stevens y cols. (2011) informan de la posibilidad de un recubrimiento que convierte las superficies de los CVCs en antimicrobianas y antitrombogénicas al mismo tiempo, que consiste en un copolímero de N-vinilpirrolidina y n-butil metacrilato conteniendo nanopartículas de plata embebidas y heparina sódica. Las propiedades antimicrobianas de nanocompuestos de Ag-TiO₂ (formados vía reducción de iones plata con etilenglicol y depositado simultáneo sobre diferentes formatos de polvo de TiO₂) fueron ensayadas frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, observándose un elevado efecto bactericida en ausencia de luz UV (Perkas y cols., 2013).

Numerosas aplicaciones prácticas de nanopartículas de plata requieren pues su atrapamiento sobre varios sustratos y matrices. Desde este punto de vista, los polímeros son la primera opción debido a su morfología específica, química y estructura natural, con sus largas cadenas poliméricas permitiendo la incorporación y fina dispersión de nanopartículas. Adicionalmente, los grupos funcionales adecuados de los polímeros pueden ser utilizados como sitios reactivos específicos para el control de una etapa de la síntesis de nanopartículas (Dallas, 2011). Panacek y cols. (2006), encontraron una elevada actividad antimicrobiana y bactericida de las nanopartículas de plata sobre las bacterias Gram negativas, incluyendo *Staphylococcus aureus* meticilina resistente. También señalaron que la actividad de las nanopartículas de plata es dependiente del tamaño de las mismas. Pal y cols. (2007) demostraron que la forma de las nanopartículas de plata intervenía en la eficacia antibacteriana, al comparar formas esféricas, de rodillo y triangular truncada, con tamaños cerca de los 100 nm. Observaron que la forma triangular truncada era efectiva a una concentración más baja (1 microgramo/l) con respecto a la forma de rodillo (100 microgramos/l) y

esférica (12,5 microgramos/l) y que la eficacia también está ligada a la concentración de microorganismos inicial.

Existen pues una gran cantidad de factores que afectan a la eficacia de estas nanopartículas, lo que no permite conseguir un estándar de eficacia hasta el momento, en función del tamaño o forma, siendo necesarios ensayos previos de verificación.

9.4. Superficies poliméricas antimicrobianas a base de zinc

Las sales metálicas polivalentes de piritionato son conocidas por ser agentes microbianos efectivos y de amplio espectro fungicida y bactericida en productos tales como pinturas antiincrustantes, productos de construcción, plásticos y productos de poliuretano, entre otros. El producto más ampliamente utilizado es el piritionato de zinc, insoluble en agua y escasamente soluble en muchos solventes orgánicos incluyendo los alcoholes, aminas, éter, ésteres y similares (Nelson y cols., 2010).

El Zinc pyrithione (también conocido como Zinc Omadine, ZPT o zinc bis (2-piriditio)-N-óxido) es utilizado extensamente. Aparte de la prevención de la degradación y el deterioro microbiano de materiales de fabricación de partida, tales como plásticos, polímeros y látex, el ZPT se emplea para prevenir en general el crecimiento de bacterias, hongos, mohos y algas. El carácter antimicrobiano del ZPT ha sido estudiado con respecto a la salud del cuero cabelludo en cuanto a su efecto anticaspa, evaluando la relación entre presencia de caspa y la existencia de microorganismos empleando este compuesto (Imokawa y cols., 1982). Sodio y zinc pyrithione (NaPT y ZnPT) han sido ampliamente usados como conservantes cosméticos y agentes quelantes de metales (Dinning y cols., 1998).

Las nanopartículas de zinc se utilizan extensamente en la rutina diaria. Una segunda molécula utilizable son las nanopartículas de ZnO, efectivas tanto para bacterias Gram negativas como para Gram positivas, que también ejercen actividad antibacteriana contra esporas resistentes a altas presiones y temperaturas. La alta concentración y una mayor área de superficie mejoran la efectividad antibacteriana (Zhang y cols., 2007). Las ventajas que se tienen utilizando nanopartículas de ZnO es la elevada inhibición de microorganismos patogénicos y su uso en bajas concentraciones (Sharma y cols., 2010).

Lepot y cols. (2010) demuestran cómo nanopartículas de ZnO incorporadas al polipropileno biaxial orientado, BOPP-ZnO, pueden hacer de la mezcla un material apropiado para aplicaciones tales como el envasado de alimentos, con buenas propiedades mecánicas y de barrera al oxígeno.

Nanopartículas de Chitosan con óxido de zinc, ZnO-CTS NPs, han sido evaluadas como agente antimicrobiano frente a diferentes cepas microbianas patógenas (*Candida albicans*, *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus aureus*), observándose una significativa inhibición del crecimiento de *M. luteus* y *S.aureus* e inhibición para la generación de biofilms por parte de estas bacterias, demostrando su potencial como agente antimicrobiano y antibiofilm (Dhillon, 2014).

La actividad antibacteriana de las nanopartículas de zinc, según proponen Sawai y cols., (1996, 1998), se basa en la generación de peróxido de hidrógeno, como uno de los muchos factores de actividad antibacteriana, mientras Stoimenov y cols., (2002), indican que el mecanismo se basa en la unión de partículas sobre la superficie de la bacteria debido a las fuerzas electrostáticas. Otra teoría indica que las nanopartículas penetran en la pared celular de los microorganismos, vía proteínas portadoras o canales iónicos, y se unen a organelos celulares, interviniendo así en el proceso metabólico como un resultado de la producción de especies reactivas al oxígeno (Sharma y cols., 2010).

9.5. Superficies poliméricas antimicrobianas a base de cobre

La habilidad de las nanopartículas de CuO y ZnO para inhibir bacterias y la formación de biofilms en la cavidad bucal se probó *in vitro*. A una concentración de 50 microgramos por mililitro, ambas demostraron una fuerte acción bactericida, inhibiendo significativamente el crecimiento bacteriano, la producción de polisacáridos extracelulares y la formación de biofilms sobre vidrio, dentura postiza acrílica y cultivos de células epiteliales humanas (Khan y cols., 2013).

El efecto biocida del cobre en superficies de contacto ha sido extensamente investigado en una amplia variedad de estudios de laboratorio, según los cuales aparenta tener una potencial aplicación preventiva y de control en infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria (O’Gorman y Humphreys, 2012).

9.6. Durabilidad de las superficies biocidas

Hoy día existen nuevos desafíos con respecto a la adición de biocidas a los materiales. Los revestimientos en la construcción exhiben, usualmente, una funcionalidad biocida entre 0,5 y 2 años, en condiciones extremas. Sin embargo, el periodo de funcionalidad de los materiales de construcción está garantizado durante 10 años (Eversdijk y cols., 2012). Existen factores que influyen en la durabilidad de las superficies biocidas. La durabilidad de los productos biocidas depende de diferentes influencias, como el clima (a lo largo del día y del año) y el tipo y las propiedades del material de construcción, aparte de tipología de la relación del biocida con los microorganismos afectados, pues la degradación del propio biocida durante la destrucción bacteriana puede ser significativa (Hofbauer, 2011). El incremento de la temperatura hace que las moléculas orgánicas se vuelvan altamente móviles, resultando en una pérdida de compuesto comprendido en el material. Por otra parte, algunos antimicrobianos orgánicos tienen temperaturas de descomposición relativamente bajas. Estos aditivos son aptos solamente para PVC y ciertas poliolefinas de baja temperatura, en los que la temperatura de proceso y la del ambiente donde se empleará el producto final es la adecuada para evitar su descomposición. Esto puede influir en la tasa de migración y la longevidad del sistema activo (Jones, 2009).

Contrariamente a lo esperable, un incremento de la concentración del biocida solamente resulta en una mínima prolongación de la vida útil. Por otra parte, se da un alto impacto medioambiental al reemplazar tempranamente los revestimientos funcionales, y el crecimiento de la demanda ecológica y la legislación internacional medioambiental incrementan, cada vez más, la presión sobre el comportamiento de los materiales. Un enfoque para limitar la cantidad de biocida necesario, manteniendo la resistencia biológica adecuada, es utilizar una tecnología de liberación lenta. La selección de un sistema de liberación propio permite mantener la concentración del agente activo por encima de la concentración mínima inhibitoria efectiva, mientras decrece la liberación inicial y la cantidad total de biocida necesario (Eversdijk y cols., 2012).

Los sistemas de liberación disponibles en el mercado incluyen los basados en vidrio cerámico, dióxidos de titanio dopados y zeolitas, incluso como medio de soporte y mecanismo de liberación (D'Arcy, 2001). Algunos sistemas favorecen una liberación rápida, tal y como las aplicaciones para el cuidado de heridas, mientras otros tiene un mayor control en el modo de acción continuo sobre el tiempo de vida útil del sustrato (Jones, 2009).

9.7. Bases legales de las superficies en contacto con los alimentos

Los materiales en contacto con alimentos están regulados en toda la UE por el Reglamento 1935/2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos y por el que se derogan las Directivas 80/590/CEE y 89/109/CEE, de manera que se garantiza que todos los materiales que se ponen en el territorio comunitario cumplen los mismos requisitos de calidad y establece el procedimiento a seguir para incluir nuevas sustancias en las listas de las sustancias autorizadas para la fabricación de los mismos.

Todos los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con los alimentos deben fabricarse de conformidad con las Buenas Prácticas de Fabricación, para que, en las condiciones normales y previsibles de empleo, no transfieran sus componentes a los alimentos en cantidades que puedan:

- i) representar un peligro para la salud humana,
- ii) provocar una modificación inaceptable de la composición de los alimentos,
- iii) provocar una alteración de las características organolépticas de estos.

Cualquier material destinado a entrar en contacto con alimentos, ha de ser lo suficientemente inerte para evitar que se transfieran sustancias a los alimentos en cantidades lo suficientemente grandes para poner en peligro la salud humana.

Los materiales poliméricos, que pueden estar compuestos por otras sustancias o aditivos, están regulados a nivel nacional por el Real Decreto 847/ 2011, por el que se establece la lista positiva de sustancias permitidas para la fabricación de materiales poliméricos destinados a entrar en contacto con alimentos. Este Real Decreto es conforme al Reglamento 1935/2004, en el cual se establece que a falta de medidas específicas comunitarias, los Estados miembros pueden mantener o adoptar disposiciones nacionales en este ámbito.

Los materiales y objetos que contengan plásticos no pueden transferir sus componentes a los alimentos en cantidades superiores a las establecidas, para ellos se establecen los siguientes límites:

- i) migración global, en la que se establece un límite de 10 mg/ cm² de material plástico o 60 mg/ kg de alimento,
- ii) migración específica, donde la cantidad de los compuestos individuales procedentes de la superficie que migra al alimento, en función del tipo de material, pueden variar.

10. Evolución de contaminación superficial durante operaciones de trabajo en la industria cárnica

Se ha estudiado con frecuencia, como hemos visto en apartados anteriores, y corroborado en ellos con distintos estudios científicos, la prevalencia de ciertos microorganismos patógenos, principalmente por su integración en biofilms, durante periodos de tiempo prolongados, años incluso, en algunas superficies alimentarias. A pesar de ello, muchas otras superficies en las industrias alimentarias permanecen higienizadas y ausentes de contaminación, como se ha demostrado también en otros ensayos. Partiendo del supuesto de una higienización correcta, no es frecuente localizar estudios acerca del crecimiento de la contaminación en superficies en contacto con alimentos durante el transcurso de una jornada de trabajo.

Algunos ensayos realizan cierta aproximación a esta línea de estudio, aunque sin especificar habitualmente la situación inicial de partida o en qué momentos exactos de la producción (al cabo de cuántas horas transcurridas) se realiza el muestreo. Otros, muy pocos, sí refieren esta información.

Martín y cols. (2011) indican que en un muestreo en industrias de elaboración de fuet en Cataluña (España), en tablas de corte de carne, superficies de picadoras, amasadoras, cuchillos y secaderos y cámaras (85 muestras en total), no se detectó *Salmonella* y un 11,8% de las muestras (10 de ellas) tuvieron presencia de *Listeria monocytogenes*. En este muestreo se evalúa también materia prima y producto final. Martín y cols. nuevamente (2014), evaluando 37 superficies de contacto con el alimento (además de materia prima cárnica y productos finales), antes (es decir, con las superficies teóricamente limpias) o durante las operaciones de trabajo, de 8 industrias cárnicas de distintas provincias españolas, aislan 33 cepas de *Listeria monocytogenes* de varios serotipos (tampoco se especifica en qué momento de la producción se toman las muestras).

Simard y Auclair (1981) indagan sobre el nivel de contaminación en cinco industrias canadienses de sacrificio (pollo y cordero) y envasado de carne durante la operativa de trabajo, según presencia de aerobios totales, coliformes totales y fecales, estreptococos fecales, *Salmonella*, mohos y levaduras, tomando 634 muestras de diferentes puntos críticos en 1976-77. La contaminación en superficies de trabajo varió entre 10^6 y 10^8 en 77 cm^2 (12 pulgadas^2) para aerobios totales, entre 10^4 y 10^5 para levaduras y mohos; entre 10^3 y 10^5 para coliformes totales y es del orden de 10^3 para estreptococos fecales, con pocos positivos para *E. coli* y con pocos

positivos para *Salmonella*, salvo en la planta de sacrificio de pollos, en la que se detectaron positivos de este microorganismo en un 76,9 % de las superficies. Igualmente se muestrearon superficies de canales de cordero, con altos recuentos totales (10^4 a 10^5 en 77 cm^2), que se supuso influían en el elevado grado de contaminación de las superficies. Al tiempo del muestreo se llevaron a cabo mejoras en los procesos de limpieza y desinfección de las industrias, con lo que se logró reducir la contaminación superficial considerablemente (del orden de 1000 veces para aerobios y hasta un 4,5 % de positivos de *Salmonella* en la planta de sacrificio de aves).

Gudbjörnsdóttir y cols. (2004), realizan, durante dos años, 1998 y 1999, un estudio amplio acerca de la presencia de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en países nórdicos, seleccionando 2 industrias cárnicas de procesamiento de carne de pollo, 6 industrias cárnicas de carne no avícola (que realizan deshueses, despieces y picados) y 5 industrias de pescado. Se evaluaron muestras de producto y muestras de superficies. Estas últimas se tomaron tras limpieza y a las 2 horas de comenzar la operativa de trabajo en las industrias. De 661 muestras de superficies en contacto directo con las carnes (máquinas y equipos, cintas de transporte, tablas de corte, bandejas, etc.) tomadas tras higienización, 55 (el 8,3%) estaban contaminadas con *L. monocytogenes* (el 11,5% con *Listeria* spp.), denotando deficientes procesos de limpieza. La presencia de positivos aumentó en un porcentaje del 26,3% para *Listeria* spp. y en un 14,9% para *L. monocytogenes* cuando las muestras se tomaban a las 2h del funcionamiento habitual de las industrias durante la jornada. La incidencia de *L. monocytogenes* tras limpieza variaba en las diferentes plantas entre el 0% (para 4 de las seis industrias cárnicas) y el 34,6% (para una de las industrias de procesamiento de carne de ave), e igualmente, a las dos horas de procesamiento, desde 0% (las 4 industrias de carne anteriores) hasta el 34,1% (una de las industrias de pescado). Los lugares más complejos de limpiar resultaban ser las cintas de transporte en industrias cárnicas, las tablas de corte en las de procesamiento de pollo y equipos de cocinado en las plantas de pescado. En superficies de contacto indirecto como desagües y suelos se localizó *L. monocytogenes* en el 19,9% de los casos (en el 34,7% de los casos para *Listeria* spp.). No se localizaron estos microorganismos en muestras aéreas. Sí en accesorios personales (ropas, calzado, delantales, guantes, herramientas manuales), en un 7,5% de ellas (4 muestras de 53) tras la limpieza para *L. monocytogenes*, y en porcentaje ligeramente inferior, un 6,3%, a las dos horas de trabajo. Estos autores señalan resultados de incidencia similar en los estudios de Rørvik y cols., 1995; Nesbakken y cols., 1996; Autio y cols., 1999, y Fønnesbech Vogel y cols., 2001.

Igualmente Thevenot y cols. (2005) investigan la presencia de *Listeria monocytogenes*, en productos en distintas fases de maduración y en superficies antes y durante el procesamiento, en 13 plantas de embutidos curados. Antes del comienzo del día (es decir, con las industrias limpias) el

15% de las muestras fueron positivas para presencia de *Listeria monocytogenes*, porcentaje que aumentaba al 47% cuando las muestras se tomaban durante la jornada de trabajo.

Bouvet y cols. (2002) evalúan la presencia de *E. coli* (VTEC) en tres empresas francesas de despiece de carne de cerdo, tanto en producto en distintas fases como en muestras de superficies. La contaminación de superficies aumentaba durante el proceso desde un 3% de positivos (antes del comienzo) hasta un 25% y un 20% a las 2 y 6 h de proceso respectivamente. La contaminación en producto aumentaba desde un 12% de positivos para canales de cerdo hasta un 19% en despiece primario, reduciéndose después (cortes en fragmentos menores) a un 5%. Ninguna de las muestras positivas lo fue para la evaluación posterior de *E. coli* O157:H7.

La escasa existencia de estudios al respecto nos ha animado a realizar este proyecto de investigación, con objeto de evaluar el grado de contaminación de las superficies en PyMEs cárnicas durante el desarrollo de los procesos.

III. OBJETIVOS



III. OBJETIVOS

- El objetivo principal de nuestro estudio se centra en evaluar la calidad de los procesos de trabajo en PyMEs cárnicas desde el punto de vista de la evolución de la contaminación en superficies durante el desarrollo de tales procesos.

Como objetivos adicionales, tenemos:

- Introducir una operativa de control visual de contaminación antes y durante los procesos, novedosa en el sector, mediante la simple aplicación de un spray.

- Mostrar, mediante la aplicación de microscopía de epifluorescencia directa (DEM) sobre tablas de corte de salas de despiece, que esta metodología permite detectar con mayor garantía y fiabilidad, frente a los métodos tradicionales de muestreo por hisopado, el nivel de existencia de carga microbiana en tales superficies.

- Informar a las PyMEs cárnicas de las superficies más críticas en sus procesos de trabajo, en función de la acumulación de contaminación microbiológica durante la jornada, de modo que les resulte posible implantar acciones correctoras para prevenir la existencia de una elevada contaminación durante el periodo productivo.

IV. EVOLUCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN EN MATADEROS, SALAS DE DESPIECE Y FÁBRICAS DE EMBUTIDOS. MÉTODOLOGÍA VISUAL Y METODOLOGÍA ANALÍTICA TRADICIONAL



IV. EVOLUCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN EN MATADEROS, SALAS DE DESPIECE Y FÁBRICAS DE EMBUTIDOS. METODOLOGÍA VISUAL Y METODOLOGÍA ANALÍTICA TRADICIONAL

1. Material y métodos

Se evaluó la contaminación microbiológica de partida y la evolución de la contaminación en las superficies de contacto directo con los alimentos durante el desarrollo diario de las actividades en algunas PyMEs del sector cárnico, empleando metodologías de seguimiento visual y análisis microbiológicos. Para ello se seleccionaron:

- un matadero de ovino
- un matadero de porcino
- una sala de despiece de porcino
- una sala de despiece de bovino
- dos industrias de embutidos (una de construcción antigua y otra de renovación reciente).

1.1. Planificación del trabajo

Como puede verse en el cronograma presentado a continuación y en la posterior descripción más detallada de las fases reflejadas en el mismo, el seguimiento visual del estado higiénico de las superficies de trabajo de las empresas se realizó durante un periodo de cuatro meses, tras otro periodo anterior de conocimiento previo de las industrias (para establecer contacto con el personal, conocer la operativa de trabajo, horarios, equipamiento y útiles empleados, posibilidades de contaminación microbiológica de dicho equipamiento y útiles durante las operaciones de trabajo, etc.). Esta percepción visual se realizó tanto desde una perspectiva

meramente intuitiva, previendo las superficies que, a la vista están mal higienizadas antes del inicio de la jornada de trabajo, como desde una perspectiva más definida, puesto que se empleó un espray, el “Biofinder”, de la casa Itram, que, ante presencia de carga contaminante, genera, a los pocos segundos, un burbujeo blanco claramente distinguible.

Posteriormente, durante un periodo de cuatro meses, se llevó a cabo la evaluación analítica de superficies de trabajo en contacto con los alimentos (para los parámetros aerobios mesófilos, enterobacterias, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*), una vez estas se hubieron higienizado según los procedimientos habituales de cada industria.

Finalizada esta etapa, se llevó a cabo una nueva inspección visual durante dos meses, con objeto de corroborar (dado que habían transcurrido ya algunos meses desde que se realizó la fase inicial de visita a las empresas), la posibilidad, evaluada en aquella fase, de acumulación de contaminación en algunas superficies durante las secuencias de trabajo, que tuvieran posibles implicaciones para la calidad de los productos elaborados en cada industria. Esta percepción visual se realizó tanto desde una perspectiva meramente intuitiva, volviendo a evaluar las superficies que, en contacto con el alimento, acumulaban carga microbiana durante el procesado, como desde una perspectiva más definida, puesto que se empleó el espray anterior en caso de duda o de modo verificativo (como hemos apuntado, en presencia de carga contaminante se produce un burbujeo).

Decididas finalmente las superficies más conflictivas según la evaluación anterior, durante otra fase anual se evaluaron estas mediante analíticas microbiológicas, para los parámetros indicados anteriormente.

Las evaluaciones analíticas llevadas a cabo, tanto para superficies higienizadas como para superficies en proceso, para los parámetros aerobios mesófilos, enterobacterias, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*, se llevaron a cabo mediante muestreo con hisopos y análisis por metodologías tradicionales de siembra y crecimiento en medios de cultivo.

EVOLUCIÓN DE CONTAMINACIÓN EN MATADEROS, SALAS DESPIECE Y FÁBRICAS EMBUTIDOS

F A S E S	FASE DOCUMENTAL CONTINUA: REDACCIÓN TESIS					
	FASE I: CONOCIMIENTO EMPRESAS (INSTALACIONES, PROCESOS PRODUCCIÓN E HIGIENIZACIÓN) (Apartado 1.2.1 de "Material y Métodos" y 2.2.1.1 de "Resultados y Discusión")					
	FASE II: INSPECCIÓN VISUAL SUPERFICIES LIMPIADAS (Apartados 1.2.2.1.1.1, y 1.2.2.1.2.1. de "Material y Métodos" y 2.2.1.2. y 2.2.2.1. de "Resultados y Discusión")					
	FASE III: ANÁLISIS SUPERFICIES LIMPIAS (Apartado 1.2.2.2.1. y 1.2.2.2.3.de "Material y Métodos" y apartado 2.3.1. de "Resultados y Discusión")					
	FASE IV: INSPECCIÓN VISUAL SUPERFS. EN PROCESO. INSP. DE OPERATIVA MANIPULACIÓN (Aps. 1.2.2.1.1.2. y 1.2.2.1.2.2. de "Material y Métodos" y 2.2.1.3., 2.2.1.4. y 2.2.2.2. de "Results y Discusión")					
	FASE V: ANÁLISIS SUPERFICIES EN PROCESO Y MANIPULADORES EN MATADERO DE CORDERO (Apartados 1.2.2.2.2. y 1.2.2.2.3. de "Material y Métodos" y 2.3.2. y 2.4. de "Results. y Discusión")					
PERIODO	REDAC.	FASE I	FASE II	FASE III	FASE IV	FASE V
Sep 12 a Oct 12						
Nov 12 a Feb 13						
Mzo 13 a Jun 13			Inspección visual simple y vía espray de 56 superficies limpias (6 empresas: 9, 10, 12, 7, 9, 9) x 4 días (1 día por mes)			
Jul 13 a Ago 13						
Sep-13.				Análisis 47 superf. limpias (6 empresas: 9, 7, 9, 6, 8, 8) x 1 muestra enterobacterias y aerobios mesófilos.		
Oct-13.				Ídem anterior		
Nov-13.				Análisis 47 superf. limpias (6 empresas: 9, 7, 9, 6, 8, 8) x 1 muestra enterobacterias y aerobios mesófilos. Análisis 29 superf. limpias (6 empresas: 4, 5, 6, 4, 5, 5) x 1 muestra <i>L. monocytogenes</i> y <i>Salmonella</i>		
Dic-13.				Ídem anterior		
Ene-13.					Inspección visual todas superficies en proceso en contacto con alimentos (6 empresas)	
Feb-14.					Ídem anterior	
Mar-14.						Muestreo A: Análisis 10 superficies a 3,5-4,5 h proceso (4 empresas: 2, 3, 3, y 2) x 3 muestras enterobacterias y a. mesófilos. Análisis 10 superficies (4 empresas: 2, 3, 3, y 2) x 1 muestra <i>L. monocytogenes</i> y <i>Salmonella</i>
Abr-14.						Muestreo B: Análisis 10 superficies a 3,5-4,5 h proceso (4 empresas: 2, 3, 3, y 2) x 3 muestras enterobacterias y a. mesófilos. Análisis 10 superficies (4 empresas: 2, 3, 3, y 2) x 2 muestras <i>L. monocytogenes</i> y <i>Salmonella</i>
May-14.						Muestreo A + Análisis 2 manipuladores matadero x 2 condiciones (a. mesófilos, enterobacterias)
Jun-14.						Muestreo B
Jul 14 a Ago 14						Muestreo A
Sep-14.						Muestreo B
Oct-14.						Muestreo A
Nov-14.						
Dic-14.						Muestreo B + Análisis 3 superficies a 7-8 h proceso (1 empresa) x 3 muestras enterobacterias y a. mesófilos.
Ene-15.						Muestreo A + Análisis 3 superficies a 7-8 h proceso (1 empresa) x 3 muestras enterobacterias y a. mesófilos.
Feb-15.						Muestreo B + 3 superf. a 3,5-4,5 h proceso (1 empresa) x 1 muestra enterobacterias y a. mesófilos + Análisis 3 superficies a 7-8 h proceso (1 empresa) x 4 muestras enterobacterias y a. mesófilos.
Mar 15 a Jun 15						

Figura 13: Cronograma de trabajo y de los ensayos experimentales

1.2. Descripción de las inspecciones y muestreos

Se expone a continuación cómo se llevaron a cabo las distintas inspecciones y muestreos analíticos que el proyecto requería. En las secuencias de trabajo con las empresas se planificaron como inhábiles los meses de Julio y Agosto, dado que se consideró que la ausencia habitual de personal por periodos vacacionales podría llegar a introducir variables inesperadas en los datos obtenidos.

1.2.1. Determinación de las características de las industrias e instalaciones evaluadas (fase de conocimiento de las empresas)

Fase inicial de cuatro meses de duración, en los que tuvieron lugar tomas de contacto y visitas de conocimiento de las industrias para familiarizarse con instalaciones, operativas y tiempos de trabajo y procesos de higienización de superficies e instalaciones (además de entrar en contacto con el personal de las empresas). Se realizó una visita mensual a cada industria (según las citadas posteriormente), durante periodos correspondientes a una jornada completa de trabajo.

Se documentaron las principales características de interés para el desarrollo de esta investigación para cada una de las empresas en estudio: estado de instalaciones y dependencias básicas, maquinaria y útiles principales en contacto con alimentos y posibilidad de acúmulo de contaminación en estos durante el desarrollo de los procesos de trabajo, procedimientos de limpieza y desinfección y responsables y aplicadores. Igualmente se realizó una revisión de las metodologías de higienización de las superficies e instalaciones en general.

Todo ello, basándose en inspecciones visuales y conversaciones con personal de las empresas, para las organizaciones indicadas a continuación:

Mataderos:

-1 matadero de porcino, con sacrificio únicamente durante 2 días a la semana durante 2-3 h.

-1 matadero de ovino. Sacrificio habitual 5 días por semana. Promedio de 5 h/ día.

Salas de despiece:

-1 sala de despiece de porcino, empleada 5 días a la semana en jornada continua de 8 h.

-1 sala de despiece de bovino, empleada 5 días a la semana en jornada continua de 8 h.

Industrias de embutidos crudos curados:

-1 fábrica de embutición de productos de porcino, empleada de Lunes a Viernes en jornada en continua de 8 h.

-1 fábrica de embutición de productos de porcino, empleada de Lunes a Viernes en jornada continua de 8 h.

1.2.2. Metodologías de control de las superficies de trabajo.

1.2.2.1. Control visual.

Se evaluó visualmente la contaminación microbiológica de partida y la evolución de la contaminación durante el desarrollo diario de las actividades en PyMEs del sector cárnico, con objeto de conocer cómo estaban higienizadas las superficies antes del inicio de la jornada de trabajo, y cuáles, en contacto con el alimento, podían acumular carga microbiana durante el procesado.

1.2.2.1.1. Control visual simple

Se realizó examinando las superficies a simple vista, sin ayuda de material auxiliar.

1.2.2.1.1.1. Antes de la jornada de trabajo

El control visual antes de las operaciones de trabajo se efectuó durante cuatro visitas a cada una de las instalaciones seleccionadas en un periodo total de cuatro meses (una visita por empresa y por mes), en periodos de entre 45 y 75 minutos cada vez .

Aunque se llevó a cabo una inspección visual general de todas las superficies (para observar posibles deficiencias de limpieza en zonas no críticas), el control se realizó en especial sobre las superficies que iban a entrar en contacto directo con el alimento al iniciarse los procesos de trabajo, en total entre 8 y 12 superficies en cada visita por empresa muestreada.

El espacio evaluado visualmente por tipo de superficie de contacto con alimentos fue de 0,25 m² (50cm x 50 cm), salvo en el caso de guantes metálicos, donde se evaluó la unidad guante. En casos

de tamaño menor, ganchos de colgado de canales y de vísceras, se agruparon varias unidades haciendo un cálculo tras la medición de superficie de un gancho (longitud x sección), hasta llegar a los 0,25 m² (en total, 12 ganchos para una medida visual).

1.2.2.1.1.2. Durante la jornada de trabajo

El control visual de superficies durante las operaciones de trabajo se efectuó exclusivamente sobre superficies en contacto con los alimentos. Se realizó durante 2 visitas a cada una de las instalaciones seleccionadas en un periodo total de dos meses (una visita por mes en jornada completa de trabajo).

Se trataba de ratificar que las superficies descartadas en la fase inicial de toma de contacto con las empresas como incapaces de acumular contaminación durante el desarrollo del trabajo, o aquellas que no presentaban riesgo para los productos por tratamientos posteriores, no habían variado durante el desarrollo de las actividades del proyecto realizadas con anterioridad, y de definir finalmente aquellas superficies que serían evaluadas analíticamente para hallar la contaminación acumulada en proceso.

Al mismo tiempo se observó la operativa de los manipuladores en cuanto al contacto de las manos con el alimento y la frecuencia de lavado de estas.

1.2.2.1.2. Control visual tras aplicación de espray revelador de contaminación

La percepción visual se realizó ahora mediante el empleo de un espray, el Biofinder, que, en presencia de carga contaminante, genera un burbujeo blanco claramente distinguible. El Biofinder se aplicó en un área aproximada de 10 cm² para cada superficie.

BIOFINDER: Se trata de un espray de manejo tan sencillo como el de los esprays de limpiadores domésticos convencionales, pero que tiene la virtud de “delatar” la contaminación microbiológica sobre la superficie en la que se aplica. Puede emplarse sobre cualquier superficie típica de la industria alimentaria (acero inoxidable, polipropileno, superficies recubiertas de pintura epoxi, etc.). Ha de pulverizarse (sin agitar) a una distancia de 10-15 cm y realizarse una inspección visual a partir de los 30 segundos. Si la superficie no está contaminada se mantiene inalterado el espray aplicado (con su ligera coloración naranja). Si la superficie está contaminada, se ocasiona un burbujeo de espuma blanca que contrasta con el color anaranjado del producto. El burbujeo es más intenso cuanto mayor es la contaminación y permanece durante más de 10 minutos. El

Biofinder es muy soluble en agua, y por su composición no genera residuos, lo que facilita su enjuague inmediato de modo fácil. La fórmula está registrada ante la Oficina Española de Patentes y Marcas del Ministerio de Industria, Turismo y Comercio. BioFinder ha sido testado con los microorganismos más comunes de la industria alimentaria: patógenos capaces de generar brotes, como *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Cronobacter sakazakii*, y microorganismos alterantes de la vida útil de los alimentos, como *Pseudomonas spp.* Reacciona al detectar la agrupación de microorganismos adheridos a superficies (agrupación conocida como "Biofilm"). Es eficaz tanto en la detección de biofilms formados por un único tipo de microorganismo (monoespecie), como para agrupaciones de dos o más especies (biofilms multiespecie). Revela de manera inmediata las zonas contaminadas mediante una simple inspección visual. Tiene una viscosidad de 300 a 500 cP, un pH de 4,5 a 5,5 y es de color anaranjado.

1.2.2.1.2.1. Antes de la jornada de trabajo

El control visual antes de las operaciones de trabajo se efectuó durante cuatro visitas a cada una de las instalaciones seleccionadas en un periodo total de cuatro meses. Este control coincidió, en lo relativo a las superficies en contacto con el alimento, en tiempo y puntos evaluados con el realizado mediante control visual simple. Es decir, a aquellas superficies sobre las que se establecían controles visuales de situación visual, se les aplicaba posteriormente el espray, si bien, en aquellas superficies donde visualmente se observaron leves restos de suciedad (1 o 2 leves motas de ≤ 1 mm de residuo orgánico), no se aplicó el espray sobre tales puntos sino sobre parte de la superficie visualmente limpia.

1.2.2.1.2.2. Durante la jornada de trabajo

El control se efectuó exclusivamente sobre superficies en contacto con los alimentos. Se realizó durante 2 visitas a cada una de las instalaciones seleccionadas en un periodo total de dos meses (coincidiendo con las visitas de percepción visual simple durante la jornada de trabajo realizadas en este periodo). En este caso sólo se realizó el control sobre algunas superficies al azar, con objeto de tomar alguna imagen, o verificar posibles dudas, aunque resultó obvio que el espray reaccionaba sobre todas la que acumulaban carga orgánica. Se trataba de ratificar, junto con la fase de control simple, las superficies que serían evaluadas analíticamente para hallar la

contaminación acumulada en proceso (según selección en la fase inicial del proyecto de toma de contacto con las empresas).

1.2.2.2. Control analítico de las superficies de trabajo en contacto con los alimentos.

Control analítico de manipuladores en matadero de cordero.

La evaluación analítica se realizó para los parámetros aerobios mesófilos, enterobacterias, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*. Se llevó a cabo mediante muestreo con hisopos y metodologías tradicionales de siembra y crecimiento en medios de cultivo. Esto fue así tanto para el caso de muestreo antes de la jornada de trabajo como para el muestreo durante los procesos de trabajo.

1.2.2.2.1. Control analítico de superficies de trabajo en contacto con alimentos antes de la jornada de trabajo.

El muestreo antes de la producción (sobre superficies higienizadas) se llevó a cabo, una vez finalizada la fase de inspección visual de superficies higienizadas, durante un periodo de 4 meses, con toma de muestras de superficies, para los parámetros aerobios mesófilos y enterobacterias, una vez por mes para cada una de las empresas, en un número, cada vez, de entre 6 y 9 muestras por empresa. Para los parámetros *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*, para los que en principio era esperable ausencia, se tomó menor número de muestras al escogerse menor número de superficies (entre 4 y 6 por empresa) y menor número de repeticiones (2 por superficie, realizando el muestreo en los dos últimos meses de los cuatro de esta fase).

1.2.2.2.2. Control analítico de superficies de trabajo en contacto con alimentos durante el desarrollo de los procesos. Control analítico de manipuladores en matadero de cordero.

El muestreo de superficies durante el desarrollo de los procesos de producción se realizó una vez concluidas las fases de control visual y control analítico antes de la jornada de trabajo y la fase de control visual durante el periodo de actividad de las empresas. Se llevó a cabo durante diez meses, con toma de muestras mensual en cada una de las empresas, para los parámetros aerobios mesófilos y enterobacterias, hasta completar un total de 30 muestras para cada tipo de superficie seleccionada (toma de 3 muestras cada vez para cada una de las 2 o 3 superficies distintas seleccionadas en cada industria cárnica), considerada como de potencial acúmulo de

contaminación. Se excluyó de este muestreo analítico de superficies en proceso el matadero de porcino, por causas que veremos al exponer el capítulo de resultados. De las dos empresas de elaboración de embutido, sólo se evaluó una en esta fase, por presentar superficies similares en proceso y trabajar con carnes de la misma especie animal. Se tomaron pues 30 muestras de una sola de las empresas de elaboración de embutido para cada una de las dos superficies seleccionadas, picadora y mesa de caída del embutido fresco.

La toma de estas muestras se llevó a cabo entre las 3,5 y las 4,5 h de proceso en las empresas, por entenderse este un momento intermedio óptimo para, en caso de hallarse contaminación elevada en un punto concreto, poder concienciar a las industrias sobre la necesidad de establecer periodos de limpieza a mitad de jornada.

Para los parámetros *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*, para los que en principio era esperable una elevada ausencia, se tomaron menor número de muestras: 30 para tablas de despiece (15 y 15 en cada empresa de despiece, tomando una muestra de cada una de los meses y dos el siguiente, y así sucesivamente), 30 para mesas o cintas de apoyo del despiece (15 en cada empresa), 30 para guantes de malla (15 en cada empresa de despiece), 30 para ganchos de colgado del matadero de ovino (15 de colgado de canales y 15 de colgado de vísceras) y 30 para la fábrica de embutidos (15 y 15 para cada una de las dos superficies), en todos los casos según la frecuencia antes indicada.

No obstante, para conocer el acúmulo de contaminación durante las 8 h de proceso, una vez obtenida buena parte de los datos anteriores, y considerando que las tablas de corte, las mesas o cintas de apoyo y los guantes de malla de salas de despiece demostraban ser puntos conflictivos, se tomaron 10 muestras de guantes de malla de la sala de despiece de vacuno, 10 muestras de tablas de corte de la misma sala y otras 10 de la cinta móvil de apoyo de carnes post-corte, transcurridas 7,5 a 8 horas de trabajo, para su comparación con los datos obtenidos a las 3,5-4,5 h del inicio de la actividad. Tales muestras de 3,5-4,5 h y de 7,5-8 h se tomaron en los mismos días y, dentro de lo posible en las mismas zonas, para poder obtener resultados representativos de la evolución. Esto se hizo en los tres últimos meses del muestreo de superficies en proceso, exclusivamente para los parámetros aerobios mesófilos y enterobacterias. Se tomaron en esos tres meses tres muestras de cada superficie a las 3,5-4,5 h y a las 7,5-8 h el primer mes, otras tres de cada una el segundo mes y cuatro de cada una el tercero (esto elevaba a 31 el nº de muestras para estas tres superficies, por lo que se eliminó el resultado inmediatamente de anterior en ellas para dejar los datos de todas las superficies en proceso estudiadas en nuestro trabajo en un nº redondo de 30).

Adicionalmente, durante este periodo de evaluaciones analíticas en proceso, y como consecuencia de las inspecciones visuales que se llevaron a cabo durante las visitas en la fase anterior, se realizaron una serie de ensayos analíticos adicionales en el matadero de cordero, con objeto de proponer una mejora concreta a la dirección del matadero. Tales ensayos, que se hicieron en el mes de Mayo de 2014, consistieron en el análisis de manipuladores de las canales de cordero en desuello (estos ensayos se desarrollaron con idéntica metodología, descrita posteriormente, a la empleada para el análisis de las superficies de útiles y equipos), considerando la circunstancia de partida: los matarifes lavaban sus manos con agua y jabón tras 15 minutos de manipulación, operación en la que empleaban aproximadamente un minuto. (Esto significa una pérdida de productividad aproximada del 7%; frecuencias más cortas de lavado significarían una pérdida de tiempo mayor). Con estos antecedentes se llevaron a cabo evaluaciones analíticas de manos (aerobios mesófilos y enterobacterias) según dos opciones: la primera tomando las muestras justamente antes del lavado del manipulador una vez transcurridos 15 minutos de trabajo desde el anterior lavado de manos; la segunda opción consistió en el muestreo transcurridos 15 minutos desde el último lavado, pero realizando, cada 2-3 minutos de trabajo, enjuagues intermedios de manos exclusivamente con agua caliente (45-50°C) clorada a 1 ppm, y sin secarse después (lo cual no representaba un problema para continuar con la operativa de trabajo). El estudio se realizó con dos manipuladores de la cadena de sacrificio (zona de desuello), a los que se tomaron, en dos distintos días, 4 muestras en cada una de las dos situaciones descritas para el lavado de manos.

1.2.2.2.3. Metodología analítica

1.2.2.2.3.1. Procedimiento de toma de muestras

Se empleó como referencia la Norma UNE-EN-ISO 18593: 2013: Métodos horizontales para las técnicas de toma de muestras a partir de superficies utilizando placas de contacto e hisopos.

MATERIAL

Bolsas estériles conteniendo:

- Torundas estériles de algodón (hisopos o escobillones) unidas a un tapón
- Tubos de ensayo tapados conteniendo medio de mantenimiento (Agua de Peptona Tamponada, APT) de la casa Biomérieux.

REALIZACIÓN

-Se coloca una plantilla estéril de acero (limpiada con alcohol) en la superficie a examinar. La plantilla dejará un vano, para el muestreo, de 5 x 5 cm en caso de toma de muestras para aerobios mesófilos y enterobacterias (ambos con un mismo hisopo), y un vano de 10x 10 cm (otra plantilla) para toma de muestras de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* (muestras tomadas con hisopos distintos).

-En caso de superficies irregulares (por ejemplo ganchos de colgado de canales) que no permitan la colocación de la plantilla, calcular con el máximo rigor posible una superficie equivalente a las anteriores, según el parámetro a analizar.

-Se retira el tapón del medio de mantenimiento y, si la superficie a examinar está seca, se toma el escobillón por el tapón al que está unido y se introduce en el tampón de mantenimiento para humedecerlo (esta operación no es necesaria si la superficie a muestrear está humedecida).

-Se frota con el algodón del hisopo la superficie a muestrear, haciéndolo girar continuamente sobre sí mismo, según tres tipos de movimientos consecutivos que, fila a fila, abarquen en las tres ocasiones toda la superficie de muestreo: vertical, horizontal y oblicuo.

-Se coloca el hisopo en el medio tampón y se asegura el cierre a presión.

-Los hisopos empleados se conservarán en refrigeración hasta el momento de realizar los análisis, un máximo de 24 h tras el muestreo (Decisión de la Comisión 2001/471/CE) para que no haya crecimiento bacteriano.

1.2.2.2.3.2. Detección de aerobios mesófilos tras muestreo con hisopo

Para determinar y cuantificar el número de microorganismos capaces de crecer en medio sólido a 30° C/ 72 ± 3 horas tras incubación, se toma como referencia el método descrito en la Norma UNE-EN-ISO 4833: Microbiología de la cadena alimentaria: Método horizontal para el recuento de microorganismos: Parte 1: Recuento de colonias a 30° C mediante la técnica de siembra en profundidad. Parte 2: Recuento de colonias a 30° C mediante la técnica de siembra en superficie.

MATERIAL Y EQUIPOS

Material

-Bolsas de homogeneizador y Stomacher Tempo

-Placas de Petri estériles (90 mm de diámetro aproximadamente)

-Puntas de pipeta estériles (1 ml)

-Guantes.

-Mascarilla.

-Rotulador.

-Tijeras.

Reactivos

-Alcohol etílico de 96° y/o calidad estándar.

Medios de cultivo

-Plate Count Agar (PCA) de la casa Oxoid: Composición para 1 l: Digerido enzimático de caseína 5,0 g; Extracto de levadura, 2,5 g; Glucosa anhidra, 1,0 g; Agar, 9-18 g; Agua destilada estéril (resto). Para siembra en superficie: medio extendido en placas. Para siembra en profundidad: medio fundido y mantenido en baño termostático de 44-47 °C, hasta su uso.

-TSB (caldo soja triptona caseína) de Oxoid. Composición para 1 l: Digerido pancreático de caseína, 15 g; Digerido enzimático de soja, 5 g; Cloruro sódico, 5 g; Agar, 15 g; Agua destilada estéril (resto).

-Agua de Peptona Tamponada (APT) de Oxoid: Composición para 1 l: Peptona, 10,0 g; Cloruro sódico, 5,0 g; Buffer fosfato, 10,5 g; Agua destilada estéril (resto).

-Agua de Peptona de dilución (AP) de Oxoid: Composición para 1 l: Peptona, 1,5 g; Cloruro sódico, 8,0 g; Agua destilada estéril (resto).

Equipos

-Agitador de tubos, Vórtex

-Baño de agua de 44 a 47° C

-Diluidor automático (tolerancia $\pm 5\%$)

-Cámara frigorífica

-Estufa incubadora de 30 ± 1 °C

-Homogenizador de paleta

-Mechero de gas

-Pipeta automática 1 ml

REALIZACIÓN: SIEMBRA Y RECUENTO EN PLACA

- Sembrar a partir de las muestras y diluciones. Se considera la dilución madre la siembra del hisopo en el caldo TSB .

Preparación de las diluciones a partir de la dilución madre:

Las diluciones se efectúan a unos 30 cm de la llama del mechero.

A partir de la dilución madre, tomar $1 \text{ ml} \pm 0,05 \text{ ml}$ de esta dilución madre con una pipeta automática y puntas estériles. Se echa este volumen a un tubo con tapón metálico de cierre a presión que contenga 9 ml de AP estéril.

Se agita de 5 a 10 seg. con Vórtex. Esta es la dilución 1/10. A partir de esta se toma 1 ml con una pipeta automática y punta estéril nueva y se echa en un nuevo tubo de ensayo que contenga 9 ml de AP estéril.

Se agita de 5 a 10 segundos con Vórtex. Esta es la dilución 1/100. Este proceso se repite hasta alcanzar la dilución deseada.

- Agitar convenientemente el tubo de la dilución a partir del cual se va a sembrar con el agitador de tubos. Utilizar pipetas estériles, depositar 1 ml de la muestra en placas de Petri estériles y vacías.
- Antes de que transcurran 10 minutos desde que se lleva a cabo la inoculación de las placas, verter unos 12-15 ml de PCA atemperado de 44 a 47° C en cada placa. El tiempo transcurrido entre la preparación de la suspensión inicial (pesada o 1ª dilución) y el vertido del medio no debe ser superior a 45 minutos.
- Agitar suavemente las placas mediante movimientos circulares y en aspa. Dejar solidificar sobre una superficie horizontal.
- Si se sospecha el sobre-crecimiento de colonias en superficie, añadir una segunda capa de medio (4 ml)
- Una vez sólidas, invertir las placas y colocarlas en la estufa de 30° C.
- Incubar $30 \pm 1^\circ \text{ C}$, durante 48-72 horas.

LECTURA Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

- Una vez pasado el tiempo de incubación, se cuentan las placas, observadas bajo luz indirecta, que muestren un número de colonias menor de 300.
- Realizar la media y expresar el resultado como potencia decimal. Si se ha realizado la siembra en superficie, hay que multiplicar por 10 (además del factor de dilución correspondiente), para expresar el resultado.
- Los resultados se expresan en unidades formadoras de colonias; ufc/25 cm² . (Se hace la resolución matemática correspondiente para exponer el resultado como ufc/1 cm²).

1.2.2.2.3.3. Detección de enterobacterias tras muestreo con hisopo.

Para la determinación del número de bacterias pertenecientes a la familia de *Enterobacteriaceae* en la cantidad referida de muestra, se toma como referencia el método descrito en la Norma UNE-EN-ISO 21528:2004: Métodos horizontales para la detección y enumeración de *Enterobacteriaceae*: Parte 2. -Método de recuento de colonias. El método se basa en la propiedad de las enterobacterias de crecer en presencia de sales biliares y su capacidad de fermentar la glucosa.

MATERIAL Y EQUIPOS

Material

- Bolsas de homogeneizador y Stomacher Tempo
- Placas de Petri estériles (90 mm de diámetro aproximadamente)
- Puntas de pipeta estériles (1 ml)
- Guantes.
- Mascarilla.
- Rotulador.
- Tijeras.

Reactivos

- Alcohol etílico de 96 ° y/o calidad estándar.

Medios de cultivo

-Agar Dextrosa Cristal Violeta Rojo Neutro (VRBGA) de Oxoid: Composición para 1 l: Digerido enzimático de tejidos animales, 7 g; Extracto de levadura, 3 g; Sales biliares nº 3, 1,5 g; Cloruro sódico, 5 g; Rojo neutro, 0,03 g; Cristal violeta, 0,002 g; Glucosa, 10 g; Agar, 12 g; Agua destilada estéril (resto). Preparación: fundir en baño María y mantener en baño termostático a $47 \pm 2^\circ\text{C}$, hasta su uso.

-Agua de Peptona de dilución (AP) de Oxoid: Composición para 1 l: Peptona, 1,5 g; Cloruro sódico, 8,0 g; Agua destilada estéril (resto).

-TSB (caldo soja triptona caseína) de Oxoid. Composición para 1 l: Digerido pancreático de caseína, 15 g; Digerido enzimático de soja, 5 g; Cloruro sódico, 5 g; Agar, 15 g; Agua destilada estéril (resto).

Equipos

-Agitador de tubos, Vórtex

-Baño de agua de 44 a 47°C

-Diluidor automático (tolerancia $\pm 5\%$)

-Cámara frigorífica

-Estufa incubadora de $30 \pm 1^\circ\text{C}$

-Homogenizador de paleta

-Mechero de gas

-Pipeta automática 1 ml

REALIZACIÓN: SIEMBRA Y RECUENTO EN PLACA

Preparar la dilución madre y/o diluciones secundarias a partir de la cual o cuales se vaya a sembrar. Se considera la dilución madre la siembra del hisopo en el caldo TSB.

Preparación de las diluciones a partir de la dilución madre:

Las diluciones se efectúan a unos 30 cm de la llama del mechero.

A partir de la dilución madre, tomar $1 \text{ ml} \pm 0,05 \text{ ml}$ de esta dilución madre con una pipeta automática y puntas estériles. Se echa este volumen a un tubo con tapón metálico de cierre a presión que contenga 9 ml de AP estéril.

Se agita de 5 a 10 s con Vórtex. Esta es la dilución 1/10. A partir de ella se toma 1 ml con una pipeta automática y punta estéril nueva y se echa en un nuevo tubo de ensayo que contenga 9 ml de AP estéril.

Se agita de 5 a 10 s con Vórtex. Esta es la dilución 1/100. Este proceso se repite hasta alcanzar la dilución deseada.

- Sembrar a partir de las muestras y diluciones.
- Agitar convenientemente la bolsa o tubo del cual se vaya a sembrar y utilizando pipetas estériles depositar 1 ml de la muestra en placas de Petri estériles y vacías.
- Antes de que transcurran 10 minutos desde la inoculación de las placas, verter unos 15-20 ml de VRBGA atemperado a 47 °C en cada placa.
- Agitar suavemente las placas mediante movimientos circulares y en aspa. Dejar solidificar sobre una superficie horizontal.
- Añadir una segunda capa de VRBGA, de unos 10 ml. Dejar solidificar.
- Una vez sólidas, invertir las placas y colocarlas en la estufa.
- Incubar a 37 °C ± 1 °C, durante 24-48 horas.

CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Recuento en placa

- Una vez pasado el tiempo de incubación, se cuentan las colonias características de enterobacterias: color rojo-violeta, rodeadas de halo de precipitación de sales biliares también rojo-violeta. Se contarán las placas que muestren un número de colonias comprendido entre 30 y 300.
- Realizar la media de las colonias contadas en las placas y expresar el resultado como potencia decimal (un número comprendido entre 1,0 y 9,9 multiplicado por 10^x, siendo x el factor de dilución correspondiente).
- El resultado se expresa inicialmente como ufc /25 cm². (Se hace la resolución matemática correspondiente para exponer el resultado como ufc/ 1 cm²).

1.2.2.2.3.4. Detección de presencia/ ausencia de *Listeria monocytogenes*

Para la determinación de *L. monocytogenes* se toma como referencia el método descrito en la Norma UNE-EN-ISO 11290-1: 1997: Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes*. Para el recuento de colonias se toma como referencia la Norma UNE-EN-ISO 11290-2: 2000/ A1:2005: Microbiología de los alimentos para consumo humano y para animales. Método horizontal para la detección y recuento de *Listeria monocytogenes*. Parte 2: Método de recuento. Modificación 1: Modificación del medio de recuento (ISO 11290-2:1998/AM1:2004)

FUNDAMENTO

El medio de cultivo selectivo utilizado ha sido un medio cromogénico (RLM) de Bioser. Se basa en la detección de la fosfolipasa de *L. monocytogenes* y la incapacidad de estas especies de metabolizar la xilosa.

MATERIAL Y EQUIPOS

Material

- Placas de Petri estériles (90 mm de diámetro aproximadamente).
- Puntas de pipeta estériles (1 ml).
- Guantes.
- Mascarilla.
- Rotulador.
- Tijeras.

Reactivos

- Alcohol etílico de 96 ° y/o calidad estándar.

Medios de cultivo

- Caldo Fraser semi de Biomériux: Composición para 1 l: Peptona animal, 5,0 g; Peptona de caseína, 5,0 g; Extracto de carne, 5,0 g; Extracto de levadura, 5,0 g; Cloruro sódico, 20,0 g; Mezcla Buffer, 13,35 g; Esculina, 1,0 g; Cloruro de litio, 3,0 g; Citrato férrico de amonio, 0,5 g; Acriflavina, 0,0125 g; Acido nadilíxico, 0,01 g; agua destilada estéril (resto).

EVOLUCIÓN DE CONTAMINACIÓN EN MATADEROS, SALAS DESPIECE Y FÁBRICAS EMBUTIDOS

-Medio RLM de Bioser: Composición para 1 l: Peptonas, 30,0 g/l; Extracto de carne, 5,0 g/l; Extracto de levadura, 1,0 g/l; Cloruro de Litio, 9,0 g/l; Xylosa, 10,0 g/l; Rojo fenol, 0,12 g/l; Agar B, 13,0 g/l; Solución cromogénica, 1 ml; Solución selectiva, 20 ml; agua destilada estéril (resto).

Equipos

- Agitador de tubos, Vórtex
- Baño de agua de 44 a 47° C
- Cámara frigorífica
- Diluidor automático (tolerancia $\pm 5\%$)
- Estufa incubadora de 30 ± 1 °C
- Homogenizador de paleta
- Mechero de gas
- Pipeta automática 1 ml

REALIZACIÓN

PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y PRE-ENRIQUECIMIENTO NO SELECTIVO

- Muestras procedentes de hisopados de superficies

Colocar el mechero de gas encendido a una distancia al campo de 30 cm aproximadamente.

Sembrar el hisopo en una cantidad proporcional de Caldo Fraser semi.

Incubar a 30 ± 1 ° C, durante 24 ± 2 horas.

ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO

- Sembrar directamente 0,1 ml (agitar previamente la bolsa) a partir del preenriquecimiento no selectivo en placa de medio selectivo cromogénico RLM.
- Incubar las placas invertidas a 37 ° C ± 1 ° C durante 24-48 horas.

RECUENTO: SIEMBRA E INCUBACIÓN

- A partir del caldo de pesada se toma 0,1 ml (agitar previamente la bolsa) y se siembra extendiéndolo por la superficie de la placa del medio cromogénico seleccionado.

- Nota: Si es necesario estimar números bajos en algunos productos, extender 1 ml del preenriquecimiento no selectivo en 2 ó 3 placas de 90 mm; también se pueden realizar diluciones y siembras sucesivas.
- Dar la vuelta a las placas e incubar a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}$ C durante 24 y 48 h.
- Leer a las 24 y 48 horas de incubación.
- Seleccionar las placas que contengan un máximo de 150 colonias características y un máximo de 300 colonias en total.
- Si es difícil contar las colonias a las 48 h de incubación, debido a la invasión de flora interferente (con o sin acidificación o alcalinización del medio), seleccionar la lectura hecha a las 24 h.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN

En el medio selectivo cromogénico RLM las colonias típicas de *Listeria monocytogenes* son azules sin halo amarillo, redondas y lisas, con un diámetro medio de 1 a 2 mm (ver en Figura 14). Dependiendo de la matriz, el azul de la colonia puede variar en intensidad (azul pálido, azul-grisáceo,...).

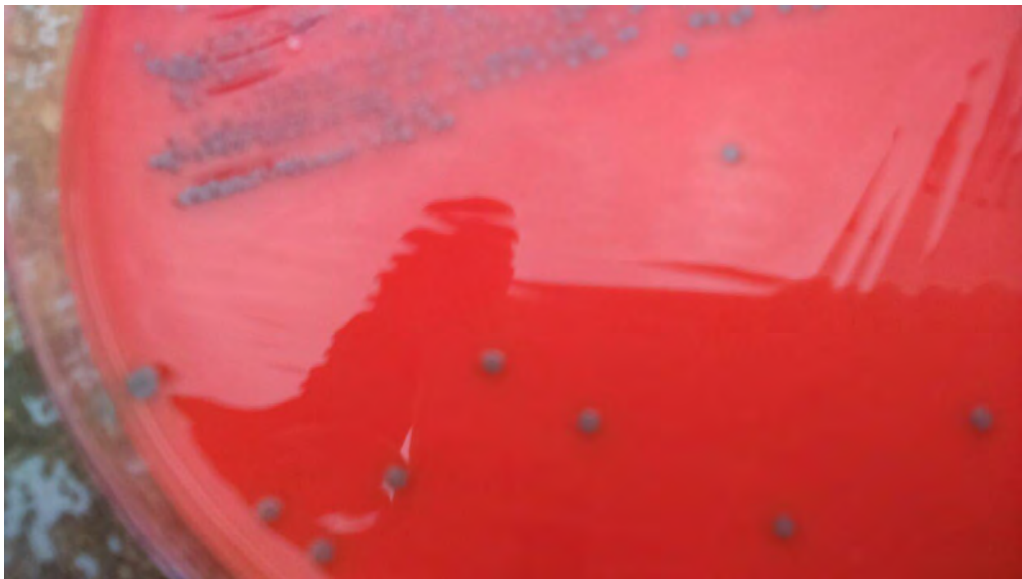


Figura 14: Colonias típicas de *Listeria monocytogenes* en medio selectivo cromogénico RLM

EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Siempre que se obtengan colonias características, el resultado se expresará como Presencia de *L. monocytogenes* en los 100 cm² de superficie.

Si no se obtienen colonias características o estas no quedaran confirmadas como tales se expresará como Ausencia de *L. monocytogenes* en los 100 cm² de superficie.

1.2.2.2.3.5. Detección de presencia/ ausencia de *Salmonella*

OBJETO

Para la determinación de *Salmonella* se toma como referencia el método descrito en la Norma 6579:2002: Método horizontal para la detección de *Salmonella spp.*

FUNDAMENTO

En general el nivel de contaminación de una superficie por *Salmonella* es inferior al resto de la microbiota acompañante, por lo que los métodos de detección incluyen una fase de preenriquecimiento no selectivo, en un medio apropiado que permita su multiplicación hasta alcanzar los rangos de crecimiento exigidos por la técnica de ensayo. Después se realiza la detección de *Salmonella* usando un enriquecimiento selectivo. Referencias: Norma UNE-EN-ISO 6579:2003: Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella spp.*, Norma UNE-EN-ISO 6579: 2003/ A1: 2007: Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella spp.* Modificación 1: Anexo D: Detección de *Salmonella spp.* en heces de animales y en muestras ambientales en la etapa de producción primaria, y Norma Francesa U47-100: 2007: Méthodes d'analyse en santé animale - Recherche par l'isolement et identification de tout sérovar ou de sérovar(s) spécifié(s) de salmonelles dans l'environnement des productions animales.

MATERIAL Y EQUIPOS

Material

- Placas de Petri estériles (90 mm de diámetro aproximadamente).
- Puntas de pipeta estériles (1 ml).
- Guantes.
- Mascarilla.
- Rotulador.

-Tijeras.

Reactivos

-Alcohol etílico de 96° y/o calidad estándar.

-Suero fisiológico.

Medios de cultivo

-Agua de Peptona Tamponada (APT) de Oxoid. Composición para 1 l: Peptona, 10,0 g; Cloruro sódico, 5,0 g; Buffer fosfato, 10,5 g; agua destilada estéril (resto).

-Medio SM ID 2 (SM-ID) de BioMérieux (Ref. : 43621). Composición para 1 l: Peptonas (porcina o bovina): 6,25 g; Tris: 0,16 g; Lactosa (bovina): 6,0 g; Sales biliares (bovina u ovina): 1,5 g; Mezcla cromógena: 9,63 g; NaCl: 5 g; Mezcla selectiva: 0,03 g; Agar: 14,0 g; Agua destilada estéril (resto).

-Kligler Iron Agar (KIA) de Oxoid, en slant. Composición para 1 l: Digerido pancreático de caseína, 10,0 g; Digerido pancreático de tejido animal: 10,0 g; Lactosa, 10,0 g; Dextrosa, 1,0 g; Cloruro de sodio, 5,0 g; Citrato amónico férrico: 0,5 g; Tiosulfato de sodio, 0,5 g; Rojo fenol, 0,025 g; Agar, 15,0 g; Agua destilada estéril (resto).

-Lysine Iron Agar (LIA) de Oxoid, en slant. Composición para 1 l: Extracto de levadura, 3,0 g; Peptona, 5,0 g; Dextrosa, 1,0 g; Clorhidrato de L-lisina, 10,0 g; Citrato de amonio férrico, 0,50 g; Tiosulfato de sodio, 0,04 g; Púrpura de bromocresol, 0,02 g; Agar, 15,0 g; Agua destilada estéril (resto).

-Urea indol de Oxoid. Composición para 1l: L-Triptófano, 3,0 g; Fosfato monopotásico, 1,0 g; Fosfato dipotásico, 1,0 g; Cloruro sódico, 5,0 g; Urea, 20,0 g; Rojo fenol, 0,025 g; Alcohol 95%, 0,01 ml; Agua destilada estéril (resto).

-RAPID'*Salmonella* agar de Biorad (Ref.:356-3961/3962/4705).

-RAPID'*Salmonella* cápsulas de Biorad (Ref.:356-4710). Se emplea para inhibir el crecimiento de otras especies.

Equipos

-Agitador de tubos, Vórtex

-Baño de agua de 44 a 47° C

-Diluidor automático (tolerancia \pm 5%)

- Cámara frigorífica
- Estufa incubadora de 30 ± 1 °C
- Homogenizador de paleta
- Mechero de gas
- Pipeta automática 1 ml

OPERACIONES PREVIAS

Todos los medios se conservan en el frigorífico a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C (o como indique el fabricante) hasta la fecha de caducidad. Cerrar la bolsa con unas pinzas o similar, tras extraer las placas necesarias y conservar en nevera.

REALIZACIÓN

PREPARACIÓN DEL MATERIAL PARA TOMA EN SUPERFICIES:

Añadir 60 ml del diluyente (APT) en la bolsa que contenga el hisopo o esponja.

PRE-ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO:

En general se añadirá la parte proporcional a la pesada de la RAPID' *Salmonella* cápsulas. Incubar a $41,5 \pm 1$ °C, durante 18 ± 2 horas.

Tras la incubación se procederá a un aislamiento selectivo en el medio cromogénico (RAPID' *Salmonella*, SMID) y se incubará este medio a 37 ± 1 °C durante 24 ± 2 horas.

En caso de no poder proceder tras la incubación a la siembra en el medio cromogénico (RAPID'S) se mantendrán las muestras a temperatura de refrigeración hasta su realización en un plazo no superior a 72 horas. En muestras muy contaminadas realizar un enriquecimiento previo.

IDENTIFICACIÓN DE SALMONELLA

Las colonias típicas de *Salmonella* en el medio SM ID son rosa a malva.

Las colonias típicas de *Salmonella* en el medio RAPID' *Salmonella* son rosa a malva (magenta).

Se deberán realizar confirmaciones bioquímicas y/o serológicas de las colonias típicas.

CONFIRMACIÓN BIOQUÍMICA

A partir de las colonias típicas aisladas (en BGA, SM ID u otros) realizar la confirmación bioquímica con resiembras en los distintos medios (todos ellos de la casa Biomérieux). Esta debe incluir al menos las pruebas:

- KIA: *Salmonella* es una Enterobacteria y por tanto fermenta glucosa (parte superior amarilla), pero no lactosa (roja).
- Además *Salmonella* produce SH₂, que se manifiesta por el ennegrecimiento del fondo del tubo.
- Urea: *Salmonella* es urea negativa (no hay cambio de color).
- LIA: *Salmonella* produce decarboxilación de la lisina (vira a morado).

(La confirmación bioquímica también podrá realizarse con una galería API 20E).

CONFIRMACIÓN SEROLÓGICA

- A partir de las colonias aisladas realizar las pruebas serológicas de aglutinación frente a los antisueros H y O (Antisueros *Salmonella* O de Difco se utilizan en las pruebas de aglutinación en portaobjetos para la identificación de *Salmonella* mediante antígenos somáticos -O-. Antisueros *Salmonella* H de Difco se utilizan en las pruebas de aglutinación en tubo para la identificación de *Salmonella* mediante antígenos flagelares -H-). Previamente hay que comprobar que la cepa no es autoaglutinable.

- En un portaobjetos limpio:

- * CA (control de aglutinación): colocar una gota de suero fisiológico

- * O (antisueros O de Difco): colocar una gota del antisuero O a estudiar

- * H (antisueros H de Difco): colocar una gota del antisuero H a estudiar

- Resuspender una colonia de la cepa que queremos identificar serológicamente sobre cada una de las gotas anteriores (es más conveniente resuspender la colonia en suero fisiológico y posteriormente colocar una gota de la suspensión sobre cada una de las gotas anteriores, para evitar confundir un exceso de inóculo con agregados).
- Agitar el portaobjetos realizando movimientos circulares, con el fin de favorecer la formación de los puentes cruzados entre las células (debido a la presencia de las inmunoglobulinas).

- Observar la formación de agregados. Si el control negativo (gota de suero fisiológico) presenta aglutinación, repetir el ensayo pues se trata de una cepa autoaglutinante. Pasar la cepa a un medio de cultivo general, y proceder a realizar de nuevo la serología.
- Si se observa aglutinación frente a alguno de los antisueros o frente a los dos, considerar la reacción positiva.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Reacciones Bioquímicas	Autoaglutinación	Reacciones Serológicas	Interpretación
Típicas	NO	O y/o H+	<i>Salmonella</i>
Típicas	SI	No realizadas	Posible <i>Salmonella</i>
No Típicas	NO	O y/o H+	Posible <i>Salmonella</i>
No Típicas	NO	Negativas	No <i>Salmonella</i>

Tabla 6: Metodología para interpretación de resultados de presencia de *Salmonella*

Los resultados finales se expresarán en el informe final de la siguiente forma:

- Identificación de *Salmonella*: Presencia de *Salmonella* en muestra (superficie de 100 cm²).
- No-identificación de *Salmonella*: Ausencia de *Salmonella* (superficie de 100 cm²).

1.3. Análisis estadístico

Sobre superficies higienizadas, se hallaron, mediante cálculo matemático simple, los porcentajes de presencia de microorganismos específicos (*Salmonella* o *Listeria monocytogenes*) en las áreas muestreadas. Igualmente se hallaron, en análisis sobre superficies limpias, los porcentajes de las mismas que incumplían valores aceptables según datos de referencia en legislación para aerobios mesófilos y enterobacterias.

Para los cálculos de estadística descriptiva, los datos de recuentos bacterianos de las poblaciones en superficies durante el procesado de alimentos (aerobios mesófilos y enterobacterias) se

transformaron a unidades logarítmicas (\log_{10}) empleando una página Excel de Microsoft Office, versión 2010. Los ensayos con recuentos para cada ítem de superficie se realizaron con $n=30$ muestras. Se calculó la media aritmética, la desviación típica (DESV. ST.) y la media acumulada para cada grupo de 30 muestras, correspondientes a la misma superficie. Se representó gráficamente la media acumulada y las líneas correspondientes a la media acumulada más y menos dos veces la desviación típica (la franja extendida entre ambas líneas es lo que define al 95% de la población cuando se da una distribución normal; el 95% de los valores de tal distribución se localizaría entre ambas líneas). Las medias y las desviaciones típicas se calcularon a partir de páginas Excel de Microsoft Office versión 2010. Los gráficos mostrados se hicieron empleando la misma herramienta excel. Medias y desviaciones típicas de 10 valores cuando se comparó la contaminación de la misma superficie en distintas franjas de tiempo (mitad y final de jornada), y los gráficos correspondientes también se realizaron empleando Microsoft Office.

Para indicar la presencia/ ausencia de microorganismos específicos (*Salmonella* o *Listeria monocytogenes*) en las áreas muestreadas de superficies durante el procesado de alimentos, se emplearon también valores porcentuales, hallados de modo sencillo (calculadora convencional).

Para determinar las diferencias entre dos poblaciones de muestras, bien correspondientes a dos tipos de superficies, bien a la misma superficie tomada en distintos periodos productivos (3,5 a 4,5 y 7 a 8 h), se realiza un análisis de varianza (ANOVA) con el programa Statistica versión 9. Dado que sólo se hicieron comparaciones entre dos poblaciones cada vez, no fue necesaria la realización de ningún contraste a posteriori.

2. Resultados y Discusión

2.1. Características de las industrias e instalaciones evaluadas

Durante una primera fase inicial, de cuatro meses de duración, se acudió a las industrias para tomas de contacto con el personal y conocimiento de las empresas, con objeto de conocer con detalle instalaciones, equipamiento, operativas y tiempos de trabajo. Se anotaron al respecto las principales características de cada una de las empresas en los apartados que describiremos a continuación.

En esta fase se realiza también una primera aproximación acerca de las posibilidades de contaminación de las superficies de trabajo de equipos y útiles durante la jornada de trabajo. Para ello se indican en tablas, para cada empresa, las valoraciones acerca del aparente incremento de carga microbiana en tales elementos durante el desarrollo de los procesos, según la siguiente secuencia de valoración:

A: Superficies sobre las que apoyan/ contactan alimentos de modo acumulado a lo largo de la jornada de producción. Riesgo evidente (muy alto) de acumular contaminación durante los procesos.

B: Superficies sobre las que apoyan/ contactan alimentos de modo acumulado a lo largo de la jornada de producción, pero este apoyo remueve la posible carga orgánica sobre la superficie, haciendo que la carga microbiana sea esencialmente equivalente a la del alimento que contacta en último lugar. No existe riesgo de acumulación microbiana.

C: Superficies sobre las que apoyan/ contactan alimentos de modo acumulado a lo largo de la jornada, pero tales alimentos serán sometidos a tratamiento posterior atenuante (por ejemplo térmico). Riesgo evidente de acumular contaminación durante los procesos, pero muy atenuado de cara a la importancia final sobre el alimento, riesgo finalmente no considerable por tanto.

D: Superficies sobre las que apoyan/ contactan alimentos de modo acumulado a lo largo de la jornada, pero que son lavadas o tratadas de modo continuo con agua clorada, o que son lavadas y desinfectadas (manualmente o en lavavajillas) periódicamente (intervalos de 1-2 h), o que se emplean durante periodos cortos (máximo 2-3 h). Riesgo muy bajo de acumular contaminación durante los procesos.

E: Superficies que no contactan con el alimento, aunque pueden acumular contaminación. No existe riesgo de que esta posible acumulación de contaminación sobre las mismas afecte directamente a los alimentos (existe riesgo de contaminación cruzada).

F: Superficies de un solo uso para el alimento (p. e. cajas o ganchos de colgado), que son lavadas tras el mismo, o superficies en las que apoyan productos con muy poca carga contaminante (por ejemplo productos curados). No existe riesgo de acumulación de contaminación sobre ellas.

G: Superficies que pueden acumular contaminación pero contactan sólo con subproductos que finalmente no se emplearán como alimento. Sin riesgo.

H. Superficies que no contactarán con el alimento ni son sospechosas de posible acúmulo de contaminación. Sin riesgo.

A pesar de haberse descrito ocho posibilidades (clasificadas desde la letra A hasta la letra H), para poder englobar las distintas características de útiles y equipos con respecto a las posibilidades de contaminación durante el trabajo, nuestra indagación de situación mediante análisis de laboratorio de superficies en proceso, en una fase posterior, se centrará en evaluar aquellas superficies calificadas como "A", las únicas catalogadas de riesgo alto o muy alto, dadas sus características: son sospechosas de acumular abundante carga microbiana durante el transcurso de las actividades de trabajo y contactarán directamente (en caso contrario no serán calificadas como A) con el alimento .

2.1.1. Mataderos

2.1.1.1. Matadero de porcino. Instalación y equipamiento

Empresa que sacrifica 2 días por semana, con un promedio de 2-3 h/ día. Se detectó que se trata de una instalación antigua, cuyas dependencias principales eran: corrales, zona de sacrificio, zona de escaldado, chamuscado y pelado, zona de corte (esquinado y eviscerado), zona de ducha, túnel de enfriamiento, cámaras de conservación, muelles y zona de menudería.

El equipamiento de trabajo localizado y la valoración de su posibilidad de incremento de carga microbiana durante la jornada, se presentan en Tabla a continuación.

EQUIPAMIENTO	OBSERVACIONES	PROBABILIDAD DE INCREMENTO DE CONTAMINACIÓN DE SUPERFICIES EN CONTACTO CON ALIMENTOS DURANTE EL DESARROLLO DE PROCESOS (Escala A, B, C, D, E, F, G, H)
Material vario manual: cuchillos, chairas de afilado de cuchillos	Chairas no contactan con alimento Los cuchillos son lavados continuamente en agua a 82 °C	E D
Pinza de aturdimiento	Contacta siempre con piel externa del animal, que luego es escaldada	C
Canal de desangrado	La sangre se considera residuo	G
Railería aérea: ganchos de colgado de canales	Cada gancho sólo se emplea para una sola canal y es lavado después	F
Cuba de escaldado	Renovada en continuo con agua clorada que permanece a a 60-62 °C (la empresa presenta análisis de agua en escaldador en proceso: Enterobact. y <i>E. coli</i> < 1 ufc/ml)	D
Mesa de caída de canales escaldadas y peladas	Contacto con el exterior de la canal, y esta es quemada después en horno (por otra parte, en el matadero evaluado, no se sacrifica más de 3 h seguidas)	C
Horno de chamuscado	No contacta con el alimento	H
Carros para colgado grupal de vísceras rojas	Se emplean para un solo uso y son lavados después	F
Contenedores y cajas	Se emplean para un solo uso y son lavados después	F
Peladoras de vello	Contactan con canales. En un caso (hay 3 peladoras) sin tratamiento térmico posterior, pero no se sacrifica más de 3 h seguidas. (Además no son accesibles para limpieza o análisis en mitad de este tiempo)	C y D
Conducto de retirada de tripas	Lavado frecuente con agua clorada a 1-2 ppm	D
Sierra esquinado (corte en mitades de la canal)	Lavado en continuo con agua clorada a 1-2 ppm	D
Ducha	No contacta con el alimento	H
Túnel de enfriamiento	No contacta con el alimento	H
Báscula aérea	No contacta con el alimento	H
Cámaras frigoríficas	No contactan con el alimento	H

Tabla 7: Descripción de equipamiento en matadero de vacuno y valoración de la posibilidad de acumulación de contaminación microbiana superficial.

Así pues, en esta instalación no se localizó ninguna superficie catalogable como "A".

2.1.1.2. Matadero de cordero. Instalación y equipamiento

Empresa que sacrifica 5 días por semana, un promedio de 4-5 h/ día. Instalación renovada hace 10 años, con paredes forradas de PVC y suelos sellados con resina, cuyas dependencias principales eran: corrales, zona de sacrificio, zona de desuelle manual, zona de eviscerado, cámaras de oreo, cámara de conservación, muelle, zonas de trabajo de vísceras (menudería y tripería).

El equipamiento de trabajo localizado, y las posibilidades de contaminación del mismo durante los procesos, se describen en la tabla a continuación.

EQUIPAMIENTO	OBSERVACIONES	PROBABILIDAD DE INCREMENTO DE CONTAMINACIÓN DE SUPERFICIES EN CONTACTO CON ALIMENTOS DURANTE EL DESARROLLO DE PROCESOS (Escala A, B, C, D, E, F, G, H)*
Material vario manual: cuchillos, chairas de afilado	Chairas no contactan alimento.	E
	Cuchillos se lavan regularmente en agua caliente a 82°C (cada 1-2 h)	D
Pinza de aturdimiento	Contacta siempre con parte externa del animal. No puede transmitir contaminación a las carnes	H
Canal de desangrado	La sangre se considera residuo	G
Railería aérea: ganchos de colgado de canales	Los ganchos son fijos, son los mismos durante la jornada, las canales se descuelgan de aquí para colgar después en carros grupales	A
Railería aérea: ganchos de colgado de vísceras rojas	Ganchos son fijos, los mismos durante la jornada, las vísceras se descuelgan de aquí para colgar después en carros grupales	A
Rampa caída de vísceras rojas a baño de lavado	Está en continuo barrido con agua clorada a 1-2 ppm	D
Carros aéreos para colgado grupal canales	Se emplean para un solo uso y son lavados después	F
Carros para colgado grupal de vísceras rojas	Se emplean para un solo uso y son lavados después	F
Bañera para lavado de vísceras rojas	Renovación en continuo de agua clorada a 1-2 ppm	D
Cinta retirada vísceras blancas	Lavado en continuo con agua clorada a 1-2 ppm	D
Rodillo retirada final piel	Sólo toca la lana	E
Mangueras aéreas agua	No contactan con el alimento	E
Básculas aéreas	No contactan con el alimento	H
Cámaras frigoríficas	No contacta con el alimento	H

Tabla 8: Descripción de equipamiento en matadero de cordero y valoración de la posibilidad de acumulación de contaminación microbiana superficial.

En esta instalación por tanto, se detectaron dos tipos de superficies catalogables como “A”: los ganchos de colgado de canales y vísceras rojas.

En cuanto a la operativa manual en este matadero, observada al realizar nuestro estudio, es necesario hacer una anotación: Durante el sacrificio de canales de cordero en mataderos de pequeño volumen, como es este caso, el desuello se realiza por completo de modo manual. Dado que durante esta retirada de la piel del animal, las manos que la tocan pueden contactar la carne externa de la canal (al ayudarse ejerciendo presión para el desprendimiento de la piel, al colgar la segunda pata en la línea de transporte o durante otras operaciones del desuello), el lavado de manos tendría que ser permanente, incluso más de una vez para una misma canal, pero industrialmente esto es inviable (rendimiento no defendible). En el matadero estudiado se realiza un lavado de manos con agua y jabón cada 15 minutos aproximadamente, dependiendo de la suciedad externa de los animales.

2.1.2. Salas de despiece

2.1.2.1. Sala de despiece porcino. Instalación y equipamiento

Empresa que trabaja 5 días por semana en jornada continua de 8 h, realizando un despiece de la canal completa de porcino. Instalación antigua, pared y suelos embaldosados. No se hace envasado, por lo que no hay máquinas para ello (el producto se encaja en recipientes plásticos recubiertos de film alimentario o se coloca en recipientes de inoxidable). Dependencias principales: muelle de entrada, cámaras de entrada, zona de despiece, cámaras de despiece, muelle de salida, almacenes de materiales y de cajas y carros de inoxidable y zona de lavado de cajas y carros.

El equipamiento de trabajo localizado en esta sala de despiece, y las posibilidades de contaminación del mismo durante los procesos, según el resultado de las observaciones, se describen en la tabla a continuación.

EQUIPAMIENTO	OBSERVACIONES	PROBABILIDAD DE INCREMENTO DE CONTAMINACIÓN DE SUPERFICIES EN CONTACTO CON ALIMENTOS DURANTE EL DESARROLLO DE PROCESOS (Escala A, B, C, D, E, F, G, H)
Material vario manual: cuchillos, chairas de afilado	Las chairas no contactan con el alimento. Los cuchillos son cambiados cada 2 h de trabajo	E D
Guantes metálicos	Se emplean durante toda la jornada	A
Delantales metálicos	No contactan con el alimento	E
Ganchos en railería para recepción canales	Se emplean para un solo uso y son lavados después	F
Tablas de despiece (polietileno de alta densidad)	Se emplean durante toda la jornada	A
Mesas colocación carne predespiece (acero inoxidable)	Se emplean durante toda la jornada	A
Cajas plásticas y carros inoxidable	Se emplean para un solo uso y son lavados después	F
Descortezadora de pancetas	Sólo se emplea durante 1 hora aproximadamente	D
Básculas y balanzas	Se emplean para pesado de producto en cajas o carros	H
Cámaras frigoríficas	No contactan con el alimento	H

Tabla 9: Descripción de equipamiento en sala de despiece de porcino y valoración de la posibilidad de acumulación de contaminación microbiana superficial.

Según lo mostrado en tabla, en esta instalación se localizaron tres tipos superficies catalogables como "A": guantes metálicos, tablas de despiece y mesas de colocación de carnes para despiece.

2.1.2.2. Sala de despiece bovino. Instalación y equipamiento

Se constata que las instalaciones son empleadas 5 días a la semana en jornada continua de 8 h. Se realiza el despiece en exclusiva de bolas (se conoce como bola a la parte trasera de la canal que comprende el muslo y la pierna, de la que se obtienen piezas como picaña, babilla, tapa, cadera, contra, morcillo o redondo) y lomos chuleteros con solomillo (de los que pueden obtenerse solomillo y lomo alto y lomo bajo, o solomillo y lomo con hueso de distintos cortes). Todo ello se

envasa, en pieza entera sin porcionar, al vacío. Instalación nueva (6 años), paredes de panel impermeable y suelos recubiertos de resina epoxi. Se distinguen las siguientes dependencias principales: muelle de entrada, cámara de entrada de carne colgada, zona de retirada de espinazo (material MER) de lomos colgados, zona de despiece y envasado a vacío, zona de encajado, cámara de producto final, muelle de salida y almacén de materiales.

El equipamiento de trabajo localizado, y las posibilidades de contaminación del mismo durante los procesos, según el resultado de las observaciones, se describen en la tabla a continuación.

EQUIPAMIENTO	OBSERVACIONES	PROBABILIDAD DE INCREMENTO DE CONTAMINACIÓN DE SUPERFICIES EN CONTACTO CON ALIMENTOS DURANTE EL DESARROLLO DE PROCESOS (Escala A, B, C, D, E, F, G, H)*
Material vario manual: cuchillos, chairas de afilado	Las chairas no contactan con el alimento. Los cuchillos son colcados en agua a 82 °C cada 2 h de trabajo y llevados a lavavajillas cada 4 h	E D
Sierra retirada de MER (espinazos de lomos)	Se emplea eventualmente, menos de 1 h durante la jornada	D
Guantes metálicos	Se emplean durante toda la jornada	A
Delantales metálicos	No contactan con el alimento	E
Ganchos en railería para recepción de bolas y lomos y tránsito en cámaras	Se emplean para un solo uso y son lavados después	F
Tablas de despiece (polietileno de alta densidad)	Se emplean durante toda la jornada	A
Mesa móvil (engranajes de polietileno de alta densidad) de colocación de carnes post-despiece	Se emplea durante toda la jornada	A
Cajas	Uso exclusivo para colocación de recortes grasos. Se lavana cada tras cada uso	F
Básculas y balanzas	Se emplean para pesado de producto en cajas o carros	H
Campanas de envasado a vacío	No contactan con el alimento	H
Tanques de retractilado	Sólo contactan con el envase del alimento	H
Cámaras frigoríficas	No contactan con el alimento	H

Tabla 10: Descripción de equipamiento en sala de despiece de vacuno y valoración de la posibilidad de acumulación de contaminación microbiana superficial.

Así, en esta instalación de despiece de carne de vacuno, se localizaron tres tipos superficies catalogables como “A”: guantes metálicos, tablas de despiece y mesa de colocación de carnes tras despiece.

2.1.3. Industrias de embutidos crudos curados

2.1.3.1. Fábrica de Embutidos 1. Instalación y equipamiento

Fábrica de embutición de productos de porcino. Se elaboran chorizos embutidos en distintos formatos, todos en tripa natural, y salchichones embutidos en distintos formatos (tripa natural). Se constata su empleo en producción de Lunes a Viernes en jornada laboral de 8 h. Se trata de una instalación antigua, con paredes y suelos embaldosados. Dependencias principales: muelle de recepción de carnes, muelle de recepción de materiales, cámara de almacenamiento de carnes, cámara de maceración de masas adobadas, almacenes de materiales e ingredientes, almacén de productos acabados, obrador de picado, amasado y embutido, secaderos en dos plantas, sala de envasado de productos embutidos y curados, muelle de salida de mercancía, zona de lavado de materiales.

El equipamiento de trabajo localizado en esta empresa, y las posibilidades de contaminación del mismo durante los procesos, según el resultado de las observaciones, se describe en la tabla a continuación.

EQUIPAMIENTO	OBSERVACIONES	PROBABILIDAD DE INCREMENTO DE CONTAMINACIÓN DE SUPERFICIES EN CONTACTO CON ALIMENTOS DURANTE EL DESARROLLO DE PROCESOS (Escala A, B, C, D, E, F, G, H)*
Material menor: cazos, para pesado de ingredientes. Cubos para colocación de ingredientes.	Reciben productos en polvo seco, sin carga microbiana excesiva (aditivos, sal, pimentones, etc.). El poso en paredes de los recipientes se renueva a cada adición de ingrediente, la carga microbiana será la del propio ingrediente.	F
Picadora	Se emplea durante toda la jornada	A
Amasadora	El equipo renueva continuamente sobre paredes y aspas la masa en contacto. Es poco previsible la acumulación de contaminación superficial, que será la de la propia masa que se está trabajando	B
Embutidora	Renueva continuamente sobre paredes, aspas y cánulas de salida y de detector de metales la masa en contacto. Poco previsible la acumulación de contaminación superficial, será la de la masa	B
Carros almacenamiento y carga carnes en picadora, recogida picado y carga amasadora, recogida masa y carga embutidora	Son carros de un solo uso que completan el circuito cámara frigorífica-picado-amasado-carga de embutidora. Son lavados después	F
Mesa de caída de embutidos	Se emplea durante toda la jornada	A
Carros y barras para colgado embutidos	De un solo uso, son lavados después	F
Básculas y balanzas	Se emplean para pesado de productos en recipientes o carros	H
Cámaras frigoríficas	No contactan con el alimento	H
Secaderos	No contactan con el alimento	E
Envasadoras de vacío y atmósfera protectora	En campanas vacío los productos se colocan ya envasados. En cintas de envasadoras en atmósfera se colocan productos semicurados o curados, con escasa carga microbiana	H F
Mesas de apoyo de embutidos	Apoyan productos semicurados o curados, escasa carga microbiana	F

Tabla 11: Descripción de equipamiento en fábrica de elaboración de embutidos y valoración de la posibilidad de acumulación de contaminación microbiana superficial.

En esta fábrica por tanto, se hallaron dos tipos superficies catalogables como “A”: picadora y mesa de caída de productos recién embutidos.

2.1.3.2. Fábrica de Embutidos 2. Instalación y equipamiento

Fábrica de embutición de productos de porcino. Se elaboran chorizos embutidos en distintos formatos, todos en tripa natural, y salchichones embutidos en distintos formatos (igualmente presentados en tripa natural). Se constata su empleo en producción de Lunes a Viernes en jornada laboral de 8 h. Se trata de una instalación recientemente renovada, con paredes de panel blanco impermeable y suelos recubiertos de resina epoxi. Dependencias principales: muelle de recepción de carnes, muelle de recepción de materiales, cámara de almacenamiento de carnes, cámara de maceración de masas adobadas, almacenes de materiales e ingredientes, almacén de productos acabados, obrador de picado, amasado y embutido, secaderos distribuidos en tres plantas, sala de envasado de productos embutidos y curados, muelle de salida de mercancía, zona de lavado de materiales.

El equipamiento de trabajo localizado en esta fábrica, y las posibilidades de contaminación del mismo durante los procesos, según el resultado de las observaciones, son idénticos a los reflejados en la Tabla anterior expuesta para la otra fábrica de embutidos. De esta manera, vuelven a encontrarse aquí dos tipos superficies catalogables como “A”: picadora y mesa de caída de productos recién embutidos.

2.2. Resultados del Control Visual

2.2.1. Control visual simple

2.2.1.1. Evaluación de los procedimientos de Limpieza y Desinfección y de su aplicación

2.2.1.1.1. Operativa de Limpieza y Desinfección

Se evaluaron, durante cuatro jornadas de trabajo, en cada una de las industrias estudiadas, las actividades de limpieza y desinfección llevadas a cabo tras concluir la producción por el personal encargado de las mismas.

En todas las empresas, salvo en la sala de despiece de bovino, las actividades de limpieza y desinfección comienzan inmediatamente al finalizar la producción. En el caso de la sala de despiece mencionada transcurren dos horas entre el fin de producción y el inicio de tales actividades de limpieza.

En todas las empresas la operativa de limpieza y desinfección es:

- A. Barrido/ retirada de restos groseros y, allí donde hay acúmulo de sangres o restos de picado, leve proyección de agua a unos 45-50 °C.
- B. Proyección con microsatélite de agente espumante desengrasante a temperatura ambiente (producto alcalino-clorado, es decir espumante adicionado con un compuesto desinfectante en mezcla) o (en el caso de una de las fábricas de embutidos) agente desengrasante (sin espuma ni compuesto clorado) y reposo durante un tiempo entre 10 y 20 minutos.
- C. Aclarado con agua a presión a unos 45-50 °C.
- D. Desinfección mediante aplicación de solución desinfectante (normalmente producto que no precisa aclarado posterior), con espray manual o mochila pulverizadora de baja presión, de las superficies que contactarán con los alimentos.
- E. Retirada de excedentes de agua en los suelos mediante rasquetas y, teóricamente (es una consigna establecida) retirada del agua sobre las superficies que contactarán con los alimentos.

2.2.1.1.2. Personal de Limpieza y Desinfección

En las fábricas de embutidos, la actividad A de barrido y retirada de restos groseros suele ser realizada por todo el personal de la sección durante unos minutos tras la producción (finaliza esta poco antes de la hora de salida). No ocurre esto en las de despiece y sacrificio, donde todo queda

a cargo de los operarios que limpian. El personal de limpieza y desinfección no ha sido generalmente sometido a una selección especial. Suele ser personal propio de producción, que realiza la limpieza y desinfección una vez concluidos los procesos productivos. Sólo en un caso (en la sala de despiece de vacuno), la persona encargada de la limpieza realiza exclusivamente esta actividad.

2.2.1.1.3. Defectos observados en el procedimiento de Limpieza y Desinfección

- La limpieza diaria está muy estandarizada, se limpian útiles, equipos, suelos y paredes bajas, pero no hay, en ninguna de las empresas, una rutina clara (en cinco de las empresas, el 83,3%, ni siquiera escrita) de limpieza de elementos no diarios, en especial cuando no hay que emplear lanzas de presión (es decir, cuando han de usarse estropajos o elementos similares). Eso conlleva cierto acúmulo de suciedad, en todas las industrias, en elementos tales como partes superiores de cuadros de luz, pulsadores de luz, cables, enchufes, techos, ventiladores, bocas de salida de aire en secaderos de embutidos etc. Estos elementos se limpian eventualmente, de modo no regulado, cada muchos meses (por ejemplo coincidiendo con los momentos previos de alguna auditoría externa importante para la industria). Aun así, en todas las empresas, algunos de ellos parecen no haberse limpiado hace demasiado tiempo. Ninguno de estos elementos, no obstante, contactará con los alimentos directamente, aunque pudieran darse contactos indirectos (por ejemplo, pulsadores de luz o toberas de aire en secaderos). Vemos ejemplos de esta limpieza deficiente en las imágenes siguientes de algunos de los elementos comentados.



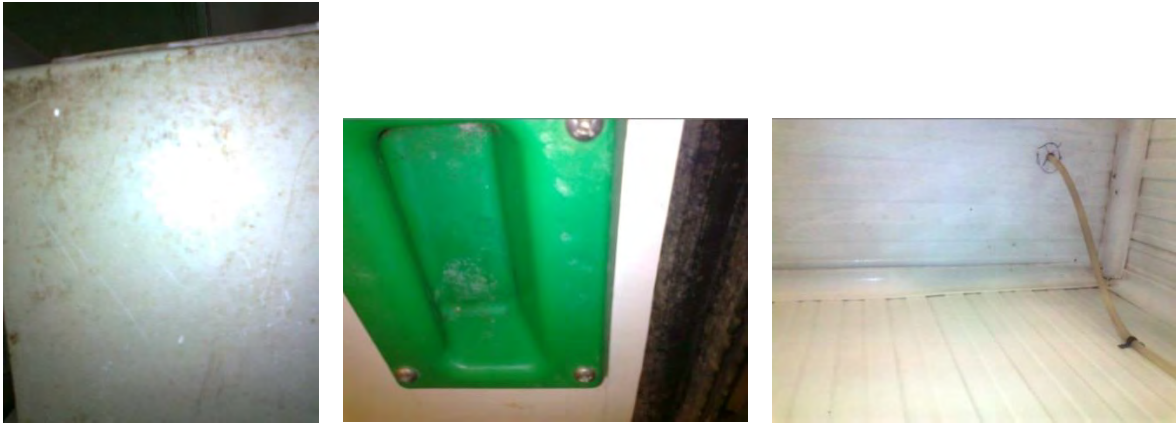
a) Toberas salida aire secaderos embutido



b) Enchufes



c) Pulsador de luz



d) Parte superior cuadro de luz d) Zona apertura puerta cámara y junta e) Techo sala despiece

Figura 15: Imágenes de elementos no previstos en el programa de limpieza diaria de las empresas, que precisan limpieza manual convencional y se observan higienizados de modo deficiente.

- Incluso en algún caso, a pesar de tratarse de elementos de limpieza diaria con manguera de presión y espumado abundante, la naturaleza de tales elementos, o su inadecuado estado de conservación, pueden resultar problemáticos para la remanencia de contaminación. Un ejemplo claro es el de algunos suelos, inicialmente impermeables que, con el transcurso del tiempo, se convierten en permeables y lugar de posible residencia de biofilms bacterianos. Esto ocurre en una de las industrias. Ver en Figura 15 el burbujeo evidente en la superficie de este suelo una vez aplicado el spray Biofinder (lo cual indica presencia microbiana importante), aun tratándose de una superficie teóricamente bien higienizada.



Figura 16: Imagen de suelo higienizado, con su impermeabilidad deteriorada, una vez aplicado el spray revelador de contaminación. Se observa burbujeo blanco intenso por la existencia de contaminación microbiana.

- Es costumbre en dos de las industrias (33,3 % del total evaluado) limpiar alguna máquina o sección cuando se está trabajando de forma próxima, sin separación física alguna entre la zona de limpieza y la zona de trabajo.
- El agua empleada con frecuencia ya es fría al concluir las operaciones, al haberse terminado el depósito de reserva. Esto ocurre en 4 de las 6 empresas, el 66,6 %. En la primera fase, de remoción y disolución de restos, permanece caliente en todos los casos.
- No es evidente que se controle a diario la cloración del agua empleada para la limpieza y desinfección en dos de las industrias (el 33,3%).
- El secado de superficies tras concluir la limpieza se hace generalmente con poco rigor; mesas u otros elementos de apoyo horizontal, si no son perfectamente lisos, suelen quedar levemente encharcados, de modo que generalmente no han secado convenientemente al comenzar la siguiente producción (durante las horas de espera pueden servir de factor de crecimiento a posibles restos microbianos, libres o en biofilm). Esto ocurre en casi todas las industrias.
- Un hecho notable es la situación de las tablas de polietileno de alta densidad empleadas para cortes de carne en las dos industrias de despiece. En todas ellas son apreciables distintas rayas provocadas por el contacto con los filos de los cuchillos, pero en algunas zonas estas rayas son demasiado pronunciadas. En ellas eventualmente puede observarse una tonalidad de color ligeramente más oscura incluso tras las operaciones de higienización.
- Este rayado también se observa con frecuencia en los delantales de nylon empleados por el personal en todas las industrias. Aunque se trata de un elemento que en principio no contactará con los alimentos, la posibilidad de contacto indirecto en este caso es bastante elevada.
- La selección de productos de limpieza y desinfección no está en general basada en criterios técnicos claros. Aunque en algún caso hay constancia de que se han hecho análisis microbiológicos ante un cambio de producto de limpieza, en otros, únicamente la simple visión de la presencia de espuma abundante al aplicar el producto ha servido de referencia para el cambio (en dos de las empresas, el 33,3%, comentan esto). El precio del producto es en esos casos el motivador principal del cambio en caso de observarse un espumado similar o, caso de hacerse análisis de laboratorio, de obtener unos resultados microbiológicos aceptables tras ensayos analíticos someros (no se tiene en cuenta por ninguna empresa la carga microbiana de partida ni se evalúan superficies de limpieza

compleja). También influye el conocimiento previo y proximidad de los proveedores de este tipo de productos.

- 5 de las 6 empresas evaluadas (83,3%) disponen de registros de controles preoperativos de higiene. En ellos se anota, entre otras cosas, la percepción visual de la higiene de los útiles y equipos que habrán de contactar con las carnes o productos cárnicos. Estos registros son realizados por los encargados de sección o por los jefes de producción. En ninguna de las empresas hay anomalías registradas en cuanto a deficiencias de higiene de las superficies de trabajo en un periodo de dos meses tomado al azar (Mayo y Junio de 2013).
- El personal de limpieza y desinfección, aunque suele realizar estas operaciones con cierto rigor en lo referente a superficies de contacto directo con los alimentos, desconoce básicamente el significado e importancia técnica de estas actividades. Según explican, han recibido formación acerca de la operativa (en algunos casos permaneciendo en observación durante varios días junto a la persona que limpiaba antes que ellos, en otros casos simplemente recibiendo algunas consignas verbales esporádicas durante sus primeros días), pero todos los empleados desconocen la palabra “biofilm” y, en algún caso, ni siquiera entienden adecuadamente que los términos “microbio” o “microbiano” están asociados a lo que ellos hacen. A este respecto se lleva a cabo una encuesta entre 10 personas que limpian en las distintas industrias, con los resultados mostrados en la Tabla 6 que se presenta a continuación.

ÍTEM	RESPUESTA POSIBLE	RESULTADOS
-¿Le han explicado claramente el procedimiento de limpieza y desinfección que debe seguir?	1 a 5; 1mínimo, 5 máximo.	Promedio: 3,8
-¿Sabe cuál es el fin de la limpieza y desinfección? A: que se vea todo limpio B: eliminar microbios en las superficies C: ambos	A/B/C	8 C, 2 A.
-¿Sabe qué es un biofilm?	SÍ/NO	0 SÍ/ 10 NO
-¿Sabe cuánto tiempo debe dejar actuando el espumante o desengrasante antes de aclarar?	SÍ/NO	9 SÍ/ 1 NO
-¿Cree que puede distinguir a simple vista si una superficie de trabajo está bien limpiada y desinfectada?	SÍ/NO	9 SÍ/ 1 NO

Tabla 12: Resultados de la encuesta acerca del conocimiento de la importancia de la Limpieza y Desinfección por los empleados ocupados en esta tarea en las industrias evaluadas.

2.2.1.2. Revisión del estado higiénico de superficies en contacto con alimentos inspeccionadas visualmente tras su limpieza y desinfección (antes del inicio de los procesos)

Se obtuvieron los resultados que figuran en la Tabla a continuación.

EMPRESA. Nº Y TIPO DE SUPERFICIES EVALUADAS	Nº SUPERFICIES visualmente sucias ¹	Nº SUPERF. visualmente con suciedad leve ²	Nº SUPERF. visualmente limpias	Nº Superf. limpias con restos de agua
MATADERO PORCINO (9 Superficies: 2 cuchillos, sierra de corte, hacha, pared escaldador, lama de peladoras de vello, carro colgado vísceras, gancho colgado canal tras escaldado y pelado inicial, mesa caída porcino tras escaldado y pelado inicial) (x 4 días)	8	2	26	4 (de las 36 totales)
MATADERO OVINO (10 Superficies: 2 cuchillos, 2 ganchos de canales, 2 ganchos de vísceras rojas, 2 carros aéreos colgado grupal de canales, carro para colgado vísceras rojas, cinta retirada vísceras blancas) (x 4 días)	1	3	36	0 (de las 40 totales)
SALA DESPIECE PORCINO (12 Superficies: 2 cuchillos, hacha, 2 guantes metálicos, 2 tablas despiece, mesa apoyo despiece, teflón descortezadora, 2 cajas plásticas, carro ruedas) (x 4 días)	3	5	40	4 (de las 48 totales)
SALA DESPIECE VACUNO (7 Superficies: 2 cuchillos, 2 guantes metálicos, 2 tablas despiece, cinta de transporte mesa despiece) (x 4 días)	3	3	22	0 (de las 28 totales)
FABRICA EMBUTIDOS 1 (9 Superficies: pared picadora, palas picadora, boca salida picadora, pared amasadora, palas amasadora, tolva embutidora, mesa caída chorizos embutidos, 2 carros de carga de carne y masas) (x 4 días)	1	1	34	4 (de las 36 totales)
FABRICA EMBUTIDOS 2 (9 Superficies: pared picadora, palas picadora, boca salida picadora, pared amasadora, palas amasadora, tolva embutidora, mesa caída chorizos embutidos, 2 carros de carga de carne y masas) (x 4 días)	0	2	34	3 (de las 36 totales)

1: con películas de grasa o película de restos secos y/o restos orgánicos mayores de 1 mm y/o restos orgánicos menores de un milímetro en cantidad superior a 2

2: 1 o 2 leves motas (≤ 1 mm) de residuo orgánico.

Tabla 13: Resultados de inspección visual simple de superficies de contacto con alimentos tras aplicación de los procedimientos de limpieza y desinfección en las empresas evaluadas.

COMENTARIOS SOBRE LOS RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN:

Porcentaje de superficies con suciedad leve: 7,1 %; porcentaje de superficies visualmente sucias: 7,1 %; porcentaje de superficies mal secadas: 6,58 %. Las 8 superficies visualmente sucias en matadero de porcino corresponden a revisiones de las lamas de las peladoras de vellos (todos los días evaluados). 5 de las 6 superficies encontradas con restos orgánicos considerables en las salas de despiece corresponden a guantes metálicos. Las superficies encontradas con restos de agua antes del inicio de operaciones corresponden, en todos los casos, a mesas de inoxidable cuya superficie ha dejado de ser perfectamente lisa.

2.2.1.3. Análisis visual de la evolución de la carga contaminante de las superficies de contacto directo con alimentos durante las operaciones de trabajo

2.2.1.3.1. Percepción sobre potenciales superficies en contacto con alimentos que pueden acumular contaminación durante la jornada de trabajo

Como ya ha sido expuesto, en la primera fase de nuestro trabajo, durante la toma de contacto con las industrias, se evaluaron visualmente, entre otras cosas, las tareas de producción llevadas a cabo en las empresas desde el punto de vista del equipamiento en contacto con alimentos, para indagar, en una primera aproximación, las posibilidades de acumulación de carga microbiana en las superficies. Para resolver esto se consideró la información aportada por las empresas, relativa a cambios de útiles cada cierto tiempo, equipos que trabajan con baño de agua en continuo (sierras de corte por ejemplo) u otras especificaciones oportunas. Con esta información se llevaron a cabo las valoraciones que se presentaron en las Tablas 7, 8, 9, 10 y 11 para esta primera actividad, asignando a cada situación una letra. Por ejemplo, útiles y equipos que se lavaban en continuo se descartaban como fuentes de problemas a causa de una potencial contaminación acumulada (quedaron clasificados en esa primera fase de trabajo con la letra "D", que los eximía del nivel "A", el único considerado de riesgo en nuestra valoración), aunque esta decisión fue independiente de la eficacia de las medidas preventivas implantadas por cada empresa, pues en algún caso se detectó que no se cumplían todas las consignas de reposición en algunos días concretos.

En la siguiente fase, la actual, llevada a cabo diez meses después de la anteriormente citada, se volvieron a indagar (en dos visitas por industria) los procesos de las industrias para valorar si, tras ese tiempo, las tareas productivas no habían variado sustancialmente y si las superficies asignadas

en aquella fase inicial con la letra "A" (nivel de riesgo) seguían mereciendo tal consideración y no habían aparecido otras nuevas.

Se corroboraron como correctas todas las clasificaciones establecidas en esa primera fase. Así, las superficies consideradas como capaces de transmitir contaminación a los alimentos, al aumentar su carga microbiana por acumulación de sustancia orgánica durante las actividades de cada empresa, son (según lo indicado en las tablas antes citadas):

MATADERO PORCINO:

-No hay superficies potencialmente peligrosas para los alimentos finales

MATADERO CORDERO:

-Ganchos aéreos de colgado canales en línea de procesado.

-Ganchos aéreos de colgado de vísceras rojas en línea de procesado.

SALA DESPIECE PORCINO

-Tablas de despiece

-Acero inoxidable de mesas de apoyo de carnes para despiece.

-Guantes malla

SALA DESPIECE BOVINO

-Tablas de despiece

-Cinta de transporte de polietileno de mesa de despiece (colocación piezas deshuesadas/ pulidas)

-Guantes malla

FÁBRICA DE EMBUTIDOS 1

-Mesa caída embutidos recién hechos

-Picadora

FÁBRICA DE EMBUTIDOS 2

-Picadora

-Mesa caída embutidos recién hechos

2.2.1.3.2. Observación visual de la evolución de la contaminación en las superficies de trabajo en contacto directo con el alimento consideradas en el apartado anterior

Se observa que en todas las superficies va acumulándose suciedad, en la mayoría de los casos de modo notorio. Esta acumulación es mucho más evidente, según apreciación visual, en tres superficies en concreto: tablas de corte de salas de despiece, mesas de apoyo (pre o post-corte) y guantes de malla de salas de despiece. En la mesa de apoyo de carnes de la sala de despiece de porcino se evidencia acúmulo de restos sanguíneos, que terminan formando siempre pequeños charcos en los defectos del alisado de la mesa. También se generan a veces pequeños charcos en las propias tablas de despiece.

En la mesa de caída de porcino desde cuba de escaldado y peladora de recogida, el acúmulo de suciedad es especialmente llamativo, por tratarse de restos de sangre y vello de los cerdos. Si bien, como se ha comentado, tras el paso del producto por esta superficie se accede al horno quemador.

2.2.1.4. Análisis visual de la operativa y el lavado de manos de los manipuladores de las empresas evaluadas.

Evaluada la situación de las superficies de trabajo en contacto con los alimentos durante los procesos, se observó también la operativa de manipulación en las industrias. En todas ellas se realizan lavados de manos con frecuencia, según lo siguiente:

- Matadero de porcino: lavado en todos los puestos al paso de 1 canal (< 1 minuto) con agua clorada a 1-2 ppm.
- Matadero de ovino: lavado cada 15 minutos con agua y jabón en todos los puestos del área de desuello. Lavado con agua clorada a 1-2 ppm al paso de 1 canal (< 1 minuto) en el puesto del área de eviscerado. Lavado con agua y jabón cada 15 minutos en el puesto de retirada de canales de línea y colgado en raíl aéreo.
- Sala de despiece de porcino: Lavado con agua y jabón cada 2 horas de manipulación.
- Sala de despiece de vacuno: Lavado con agua y jabón cada 2 horas de manipulación.
- Fábrica de embutidos 1: Lavado con agua y jabón cada 2 h de manipulación.

- Fábrica de embutidos 2: Lavado con agua y jabón cada 2 h de manipulación.

En general, los lavados de manos establecidos se consideran adecuados para evitar el acúmulo excesivo de contaminación en manos del manipulador (además, estas frecuencias descritas son mínimas, ocasionalmente la frecuencia es mayor si el operario observa un ensangrentado de sus manos, acude momentáneamente a otro lugar y regresa, u otras circunstancias especiales), salvo en un caso, pues puede no resultar suficiente para la zona de desuello del matadero de ovino (tarea llevada a cabo de modo completamente manual), a pesar de la exigente frecuencia de lavado con agua y jabón establecida (15 minutos).

En dicho matadero, en 15 minutos se manipulan entre 15 y 20 canales de cordero (dependiendo de su tamaño). Por la dinámica de trabajo existente, todos los empleados que se dedican a las actividades de desuello (5 en total) realizan tareas que conllevan un riesgo insalvable de tocar con la mano la piel lanosa del animal por su zona externa, es decir, la parte sucia. Esto podría ser evitable en una cadena con mayor número de empleados para desollar, pero no en nuestro caso, pues un solo manipulador realiza, con cada animal, actividades de rallado (separación inicial de la piel, desde el exterior, con cuchillo) y empuje manual de la parte carnosa para favorecer la extracción de la piel. Así pues, en esta industria hay un elevado riesgo de contaminar manualmente la parte carnosa de la canal con algo de la suciedad externa del animal, recogida por el manipulador en sus manos durante el desuello. Tal suciedad puede transmitirse además de canal a canal antes del lavado de manos establecido. Estos riesgos en la manipulación de las canales de cordero no son subsanables mediante el lavado final de estas antes de su almacenamiento en cámaras, pues no resulta conveniente. Las canales de cordero tienen escasa masa muscular, de modo que el calor retenido en ellas no contribuiría apenas a la evaporación del agua externa si la hubiera y, por otra parte, una corriente forzada de secado acortezaría y oscurecería la superficie externa de la canal. Considerando estas circunstancias, el lavado de las canales de cordero concluiría en una retención superficial prolongada de agua, con posibilidad elevada de crecimiento microbiano. Por ello en el matadero evaluado no se realiza este lavado. Hoy día no existe además otra posibilidad legal de saneamiento que el lavado con agua clorada.

2.2.2. Control visual mediante espray revelador

Como comentamos en el apartado de “Material y Métodos”, a las superficies de contacto con los alimentos evaluadas visualmente de modo simple se les aplicó también el espray revelador Biofinder (salvo a las manos de los manipuladores, por razones obvias). Presentamos a continuación los resultados.

2.2.2.1. Verificación de estado de superficies higienizadas en contacto directo con los alimentos inspeccionadas visualmente tras aplicación de espray revelador

Se obtienen los resultados referidos en Tabla a continuación:

EMPRESA N° Y TIPO DE SUPERFICIES EVALUADAS	N° SUPERFICIES “visualmente” sucias ¹	N° SUPERFICIES “visualmente” limpias ²
MATADERO PORCINO (9 Superficies: 2 cuchillos, sierra de corte, hacha, pared escaldador, lama de peladoras de vello, carro colgado vísceras, ganchos colgado canal tras escaldado y pelado inicial, mesa caída porcino tras escaldado y pelado inicial) (x 4 días)	9	27
MATADERO OVINO (10 Superficies: 2 cuchillos, 2 ganchos de canales, 2 ganchos de vísceras rojas, 2 carros aéreos colgado grupal de canales, carro para colgado vísceras rojas, cinta retirada vísceras blancas) (x 4 días)	1	39
SALA DESPIECE VACUNO (12 Superficies: 2 cuchillos, hacha, 2 guantes metálicos, 2 tablas despiece, mesa apoyo despiece, teflón descortezadora, 2 cajas plásticas, carro ruedas) (x 4 días)	6	42
SALA DESPIECE BOVINO (7 Superficies: 2 cuchillos, 2 guantes metálicos, 2 tablas despiece, cinta de transporte mesa despiece) (x 4 días)	4	24
FABRICA EMBUTIDOS 1 (9 Superficies: pared picadora, palas picadora, boca salida picadora, pared amasadora, palas amasadora, tolva embutidora, mesa caída chorizos embutidos, 2 carros de carga de carne y masas) (x 4 días)	2	34
FABRICA EMBUTIDOS 2 (9 Superficies: pared picadora, palas picadora, boca salida picadora, pared amasadora, palas amasadora, tolva embutidora, mesa caída chorizos embutidos, 2 carros de carga de carne y masas) (x 4 días)	0	36

1: Se observa, con mayor o menor intensidad, burbujeo claro de espuma blanca, entre 30 y 60 segundos después de aplicar el espray a una distancia de 10-15 cm de la superficie a evaluar

2: No se observa burbujeo tras aplicar el espray a 10-15 cm de distancia de la superficie a evaluar (o las, aparentemente leves burbujas, son indistinguibles de las ocasionadas al aplicarlo).

Tabla 14: Resultados de inspección visual simple de superficies higienizadas de contacto directo con alimentos tras aplicación de espray revelador.

COMENTARIOS SOBRE LOS RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN:

Porcentaje de superficies sucias según resultados de visualización tras aplicación del spray revelador: 9,82 %. Las superficies visualmente sucias (detectadas por el burbujeo de espuma blanca al aplicar el spray) en matadero de porcino corresponden, ocho a las lamas de las peladoras de vellos de la canal todos los días evaluados (ver ejemplo del burbujeo en Figura 17) y una a un gancho de colgado de canal tras escaldado. La diferencia del número de superficies sucias en salas de despiece al aplicar el spray frente a las calificadas como sucias al examinarlas visualmente sin spray (4 superficies más en el primer caso), corresponde a las tablas blancas de polietileno para corte de carnes en sala de despiece porcino, en las que se ha observado en algún caso burbujeo de espuma, a pesar de aparecer visualmente limpias y no deterioradas (ver ejemplo de este burbujeo en la Figura 18). En este sentido, con superficies deficientemente higienizadas, el spray aplicado ha resultado ser un excelente argumento de apoyo para la concienciación y comprensión de los defectos de limpieza por parte de los limpiadores y encargados de las industrias evaluadas. (Véase también ejemplo de superficies bien higienizadas en Figura 19).



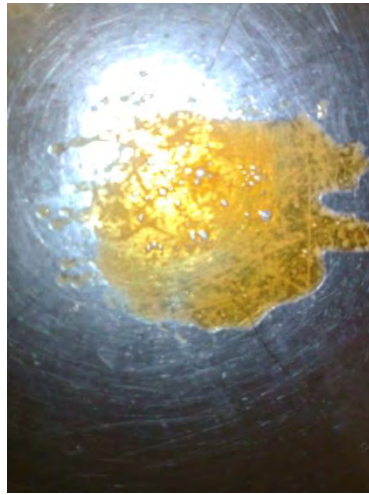
Figura 17: Lamas de peladora de porcino, una vez finalizadas las actividades de higienización, tras aplicación de spray revelador.



Figura 18: Tabla blanca de despiece que burbujea tras aplicar spray revelador a pesar de tener una apariencia visual limpia (véase en especial en los bordes de la aplicación)



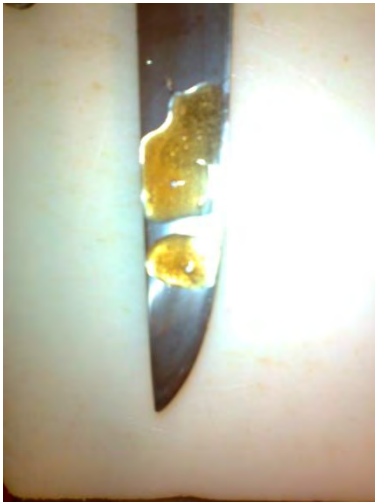
a) Pared Picadora



b) Mesa caída embutido fresco



c) Guante de malla



d) Cuchillo sala despiece



d) Teflón para corte de sala despiece



e) Pared Amasadora



f) Tolva embutidora



g) Mesa caída embutido fresco

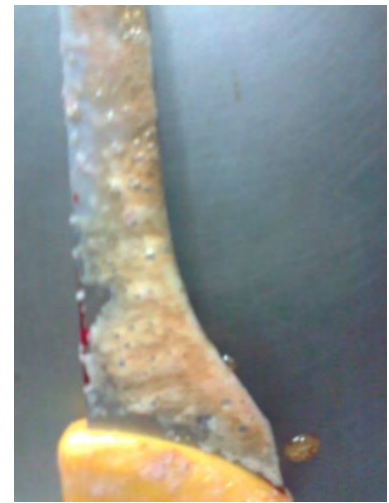
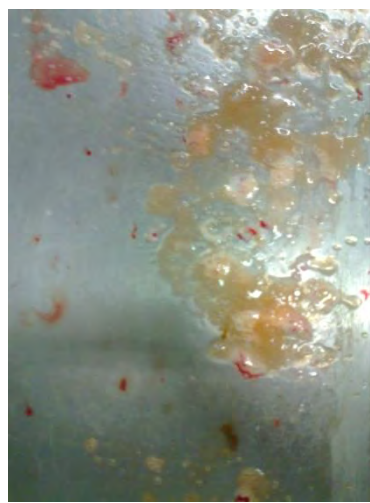
Figura 19: Fotografías de superficies de contacto con alimentos correctamente higienizadas una vez aplicado el spray revelador de contaminación. No se observa burbujeo blanco intenso (la mera aplicación del spray conlleva la aparición de alguna pequeña burbuja del color del spray, no achacable a suciedad)

2.2.2.2. Análisis visual mediante espray revelador de la evolución de las superficies de contacto directo con alimentos durante las operaciones de trabajo

Cuando se emplea el espray revelador, una vez iniciadas las actividades convencionales de producción de las empresas, se observa siempre burbujeo de espuma blanca en todas las superficies de contacto con alimentos. Esto ocurre aun cuando hayan transcurrido pocos minutos desde el comienzo de los procesos. Podemos observar este burbujeo en las imágenes mostradas en la Figura 20.



a) Gancho colgado vísceras rojas cordero



c) cuchillo matarife ovino



d) Mesa caída porcino tras peladora



e) Mesa caída embutido fresco



f) Teflón sala despiece



g) Teflón móvil sala despiece

Figura 20: Imágenes de superficies de contacto con alimentos durante el procesado de estos una vez aplicado el espray revelador de contaminación. Se observa burbujeo blanco intenso por la existencia de contaminación microbiana.

2.3. Resultados del control analítico de superficies de contacto directo antes y durante los procesos productivos

2.3.1. Resultados analíticos para el control antes de los procesos productivos

2.3.1.1. Aerobios mesófilos

Presentamos a continuación los resultados obtenidos para aerobios mesófilos en las superficies de contacto con los alimentos evaluadas mediante análisis de laboratorio, una vez estas habían sido higienizadas según los procedimientos de limpieza y desinfección establecidos en cada una de las industrias.

EMPRESA Nº Y TIPO DE SUPERFICIES EVALUADAS	Nº Superficies con valor ufc/cm ² ≤ 10	Nº Superficies con valor ufc/cm ² entre 10 y 50	Nº Superficies con valor ufc/cm ² ≥ 50
MATADERO PORCINO (9 Superficies: 2 cuchillos, sierra de corte, hacha, pared escaldador, peladora, carro colgado vísceras, gancho colgado canal tras escaldado y pelado inicial, mesa caída porcino tras escaldado y pelado inicial) (x 4 días)	29	4	3
MATADERO OVINO (7 Superficies: 2 cuchillos, gancho canales, gancho vísceras rojas, carro aéreo colgado grupal canales, carro vísceras rojas, cinta vísceras blancas) (x 4 días)	24	3	1
SALA DESPIECE PORCINO (9 Superficies: 2 cuchillos, hacha, guante metálico, tabla despiece, mesa apoyo, teflón descortezadora, caja plástica, carro ruedas) (x 4 días)	30	3	3
SALA DESPIECE VACUNO (6 Superficies: 2 cuchillos, guante metálico, tabla despiece, cinta transporte mesa despiece, 1 caja plástica) (x 4 días)	21	1	2
FABRICA EMBUTIDOS 1 (8 Superficies: pared picadora, palas picadora, boca salida picadora, pared amasadora, palas amasadora, tolva embutidora, mesa caída chorizos embutidos, carro carga carne y masas) (x 4 días)	28	3	1
FABRICA EMBUTIDOS 2 (8 Superficies: pared picadora, palas picadora, boca salida picadora, pared amasadora, palas amasadora, tolva embutidora, mesa caída chorizos embutidos, carro carga carne y masas) (x 4 días)	30	2	0

Tabla 15: Resultados analíticos para aerobios mesófilos en las distintas superficies, higienizadas, de contacto directo con el alimento (ufc/ cm²).

TOTALES:

TIPO EMPRESA	Nº Superficies con valor ufc/cm ² ≤ 10	Nº Superficies con valor ufc/cm ² entre 10 y 50	Nº Superficies con valor ufc/cm ² ≥ 50
MATADEROS	53	7	4
SALAS DE DESPIECE	51	4	5
FÁBRICAS DE EMBUTIDOS	58	5	1
TOTAL	162	16	10

Tabla 16: Compendio de resultados analíticos por tipo de empresa para Aerobios mesófilos en las distintas superficies, higienizadas, de contacto directo con el alimento (ufc/ cm²).

COMENTARIOS SOBRE LOS RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN:

Porcentaje de superficies consideradas sucias según criterios de la Decisión 2001/ 471/ CE (> 10 ufc/cm²): 13,83 % (26 de las 188 examinadas). Los peores resultados, en cuanto a porcentaje de superficies sucias sobre el total evaluado, corresponden a mataderos (20,75 %), de los cuales el más desfavorable ha sido el de porcino. Luego a salas de despiece (17,65 %), obteniéndose peor porcentaje en la sala de porcino que en la de vacuno. Los mejores resultados se han dado para las fábricas de embutidos (10,34 % de valores inadecuados, 6 de los 64 resultados obtenidos). Los valores mayores de 50 ufc/cm² han correspondido a las peladoras del matadero de porcino en tres de las cuatro ocasiones en que se han evaluado, a un carro para agrupado de vísceras rojas en el matadero de ovino, a un guante de protección de malla, una tabla de despiece y una caja plástica en la sala de despiece de porcino, a un guante de malla en dos de las cuatro muestras en la sala de despiece de vacuno, y, en las fábricas de embutidos, a la boca de salida de una picadora.

2.3.1.2. Enterobacterias

Presentamos a continuación los resultados obtenidos para enterobacterias en las superficies de contacto con los alimentos evaluadas mediante análisis, una vez estas habían sido higienizadas según los procedimientos de limpieza y desinfección establecidos en cada una de las industrias.

EMPRESA Nº Y TIPO DE SUPERFICIES EVALUADAS	Nº Superficies con valor ufc/cm ² ≤ 1	Nº Superficies valor ufc/cm ² entre 1 y 5	Nº Superficies con valor ufc/cm ² ≥ 5
MATADERO PORCINO (9 Superficies: 2 cuchillos, sierra de corte, hacha, pared escaldador, peladora, carro colgado vísceras, gancho colgado canal tras escaldado y pelado inicial, mesa caída porcino tras escaldado y pelado inicial) (x 4 días)	33	2	1
MATADERO OVINO (7 Superficies: 2 cuchillos, gancho canales, gancho vísceras rojas, carro aéreo colgado grupal canales, carro vísceras rojas, cinta vísceras blancas) (x 4 días)	27	1	0
SALA DESPIECE PORCINO (9 Superficies: 2 cuchillos, hacha, guante metálico, tabla despiece, mesa apoyo, teflón descortezadora, caja plástica, carro ruedas) (x 4 días)	35	1	0
SALA DESPIECE VACUNO (6 Superficies: 2 cuchillos, guante metálico, tabla despiece, cinta transporte mesa despiece, 1 caja plástica) (x 4 días)	23	0	1
FABRICA EMBUTIDOS 1 (8 Superficies: pared picadora, palas picadora, boca salida picadora, pared amasadora, palas amasadora, tolva embutidora, mesa caída chorizos embutidos, carro carga carne y masas) (x 4 días)	31	1	0
FABRICA EMBUTIDOS 2 (8 Superficies: pared picadora, palas picadora, boca salida picadora, pared amasadora, palas amasadora, tolva embutidora, mesa caída chorizos embutidos, carro carga carne y masas) (x 4 días)	32	0	0

Tabla 17: Resultados analíticos para enterobacterias en las distintas superficies, higienizadas, de contacto directo con el alimento (ufc/ cm²)

TOTALES:

TIPO EMPRESA	Nº Superficies con valor ufc/cm ² ≤ 1	Nº Superficies con valor ufc/cm ² entre 1 y 5	Nº Superficies con valor ufc/cm ² ≥ 5
MATADEROS	60	3	1
SALAS DE DESPIECE	58	1	1
FÁBRICAS DE EMBUTIDOS	63	1	0
TOTAL	181	5	2

Tabla 18: Compendio de resultados analíticos por tipo de empresa para enterobacterias en las distintas superficies, higienizadas, de contacto directo con el alimento (ufc/ cm²).

COMENTARIOS SOBRE LOS RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN:

Porcentaje de superficies consideradas sucias según criterios de la Decisión 2001/ 471/ CE (> 1 ufc/cm²): 3,72 % (7 de las 188 superficies totales evaluadas). Los peores resultados, en cuanto a porcentaje de superficies sucias sobre el total, corresponden a mataderos (6,66 %, 4 de las 64 muestras), de los cuales el más desfavorable ha sido el de porcino (3 de las 4 muestras incorrectas del total de mataderos). Luego a salas de despiece (3,45 %), con sólo dos casos deficientes de las 60 muestras examinadas. Los mejores resultados se han dado en las fábricas de embutidos, con un solo caso incorrecto (1,59 %). Los valores obtenidos mayores de 1 ufc/cm² han correspondido a una peladora de porcino del matadero de esta especie y a un guante de protección de malla de la sala de despiece de vacuno.

2.3.1.3. *Listeria monocytogenes*

Presentamos a continuación los resultados obtenidos para *Listeria monocytogenes* en las superficies de contacto con los alimentos evaluadas mediante análisis, una vez estas habían sido higienizadas según los procedimientos de limpieza y desinfección establecidos en cada una de las industrias.

EMPRESA Nº Y TIPO DE SUPERFICIES EVALUADAS	Presencia	Ausencia
MATADERO PORCINO (4 Superficies: cuchillo, hacha, lama peladora, carro vísceras) (x 2 días)	0	8
MATADERO OVINO (5 Superficies: cuchillo, gancho canales, gancho vísceras rojas, carro aéreo colgado grupal canales, carro vísceras rojas) (x 2 días)	0	10
SALA DESPIECE PORCINO (6 Superficies: cuchillo, guante metálico, tabla despiece, mesa apoyo, caja plástica, carro ruedas) (x 2 días)	1	11
SALA DESPIECE BOVINO (4 Superficies: cuchillo, guante metálico, tabla despiece, cinta transporte mesa despiece) (x 2 días)	0	8
FABRICA EMBUTIDOS 1 (5 Superficies: boca salida picadora, pared amasadora, tolva embutidora, mesa caída chorizos embutidos, carro carga carne y masas) (x 2 días)	0	10
FABRICA EMBUTIDOS 2 (5 Superficies: boca salida picadora, pared amasadora, tolva embutidora, mesa caída chorizos embutidos, carro carga carne y masas) (x 2 días)	0	10

Tabla 19: Resultados analíticos para *Listeria monocytogenes* en las distintas superficies de contacto directo con el alimento (presencia/ ausencia)

COMENTARIOS SOBRE LOS RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN:

Porcentaje de positivos de *Listeria monocytogenes*: 1,72 %, un único positivo de los 58 datos generados, que corresponde al análisis de una tabla de despiece de la empresa de despiece de porcino. La estriación de las tablas con el uso las convierte en elementos a los que hay que aplicar una cautela muy especial durante su limpieza.

2.3.1.4. *Salmonella*

Presentamos a continuación los resultados obtenidos para *Salmonella* en las superficies de contacto con los alimentos evaluadas mediante análisis, una vez estas habían sido higienizadas según los procedimientos de limpieza y desinfección establecidos en cada una de las industrias.

EMPRESA Nº Y TIPO DE SUPERFICIES EVALUADAS	Presencia	Ausencia
MATADERO PORCINO (4 Superficies: cuchillo, hacha, peladora, carro vísceras) (x 2 días)	0	8
MATADERO OVINO (5 Superficies: cuchillo, gancho canales, gancho vísceras rojas, carro aéreo colgado grupal canales, carro vísceras rojas) (x 2 días)	0	10
SALA DESPIECE PORCINO (6 Superficies: cuchillo, guante metálico, tabla despiece, mesa apoyo, caja plástica, carro ruedas) (x 2 días)	0	12
SALA DESPIECE BOVINO (4 Superficies: cuchillo, guante metálico, tabla despiece, cinta transporte mesa despiece)	0	8
FABRICA EMBUTIDOS 1 (5 Superficies: boca salida picadora, pared amasadora, tolva embutidora, mesa caída chorizos embutidos, carro carga carne y masas) (x 2 días)	0	10
FABRICA EMBUTIDOS 2 (5 Superficies: boca salida picadora, pared amasadora, tolva embutidora, mesa caída chorizos embutidos, carro carga carne y masas) (x 2 días)	0	10

Tabla 20: Resultados analíticos para *Salmonella* en las distintas superficies de contacto directo con el alimento (presencia/ ausencia).

COMENTARIOS SOBRE LOS RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN:

No se dan valores positivos en ninguna de las 58 muestras evaluadas.

2.3.2. Resultados analíticos para el control durante los procesos productivos

Tal y como se ha indicado y razonado anteriormente, para estas mediciones durante el transcurso de los procesos, sólo se consideraron uno de los dos mataderos (el de ovino) y una de las dos fábricas de embutidos (la de renovación reciente), además de las dos salas de despiece (una de porcino y otra de vacuno).

2.3.2.1. Aerobios mesófilos

2.3.2.1.1. A las 3,5-4,5 h de procesado

Vemos a continuación, en Tabla 21 (dividida en dos, dadas sus dimensiones), los datos de aerobios mesófilos obtenidos, para las distintas superficies de contacto directo con alimentos, a las 3,5-4,5 h de inicio de los procesos de producción. Después, la Tabla (22) de valores medios acumulados.

Nº muestra	MATADERO OVINO				SALA DESPIECE PORCINO					
	GANCHO COLGADO CANAL		GANCHO COLGADO VÍSCERA ROJA		TABLA CORTE		MESA APOYO CARNES		GUANTE MALLA	
	valor (ufc/ cm ²)	log ₁₀ (valor)	valor (ufc/ cm ²)	log ₁₀ (valor)	valor (ufc/ cm ²)	log ₁₀ (valor)	valor (ufc/ cm ²)	log ₁₀ (valor)	valor (ufc/ cm ²)	log ₁₀ (valor)
1	5,40E+02	2,732	6,67E+04	4,82413	3,20E+04	4,51	9,60E+04	4,982	1,60E+04	4,2
2	1,60E+02	2,204	1,00E+02	2	3,84E+04	4,58	4,00E+05	5,602	4,00E+05	5,6
3	4,00E+02	2,602	5,08E+02	2,70586	3,20E+04	4,51	1,92E+05	5,283	1,28E+05	5,11
4	8,80E+02	2,944	2,86E+02	2,45637	3,20E+04	4,51	4,00E+05	5,602	3,20E+03	3,51
5	1,90E+03	3,279	1,28E+03	3,10721	3,80E+04	4,58	2,24E+04	4,35	2,80E+03	3,45
6	3,00E+00	0,477	3,20E+03	3,50515	1,60E+04	4,2	2,24E+03	3,35	1,28E+04	4,11
7	6,00E+00	0,778	9,60E+03	3,98227	4,00E+05	5,6	3,20E+03	3,505	4,00E+05	5,6
8	2,00E+01	1,301	2,80E+03	3,44716	1,92E+05	5,28	2,08E+03	3,318	1,28E+04	4,11
9	1,12E+02	2,049	3,81E+03	3,58092	1,28E+05	5,11	6,40E+03	3,806	1,92E+04	4,28
10	2,40E+03	3,38	6,00E+03	3,77815	4,80E+04	4,68	6,00E+03	3,778	1,12E+04	4,05
11	2,00E+02	2,301	8,00E+00	0,90309	1,60E+04	4,2	8,80E+03	3,944	1,40E+05	5,15
12	3,04E+02	2,483	4,00E+03	3,60206	2,24E+04	4,35	1,20E+04	4,079	1,60E+04	4,2
13	8,00E+01	1,903	9,60E+02	2,98227	6,40E+03	3,81	4,00E+04	4,602	4,80E+04	4,68
14	2,56E+02	2,408	1,28E+04	4,10721	9,60E+02	2,98	3,20E+03	3,505	1,44E+04	4,16
15	4,80E+01	1,681	3,20E+03	3,50515	3,20E+03	3,51	1,60E+04	4,204	3,36E+03	3,53
16	3,76E+03	3,575	1,00E+03	3	8,00E+03	3,9	2,24E+04	4,35	1,76E+04	4,25
17	2,50E+01	1,398	2,00E+02	2,30103	9,60E+03	3,98	4,80E+03	3,681	1,84E+04	4,26
18	3,20E+02	2,505	2,80E+03	3,44716	6,40E+03	3,81	2,56E+03	3,408	1,12E+05	5,05
19	1,60E+02	2,204	6,00E+03	3,77815	1,20E+04	4,08	5,60E+04	4,748	8,00E+03	3,9
20	8,80E+02	2,944	2,60E+03	3,41497	2,80E+04	4,45	1,20E+04	4,079	1,52E+04	4,18
21	1,60E+01	1,204	8,80E+02	2,94448	3,84E+03	3,58	1,92E+04	4,283	2,80E+04	4,45
22	1,20E+02	2,079	2,40E+04	4,38021	4,20E+04	4,62	6,40E+04	4,806	6,40E+04	4,81
23	6,00E+01	1,778	1,20E+03	3,07918	4,00E+04	4,6	3,44E+04	4,537	1,80E+04	4,26
24	2,40E+02	2,38	3,60E+02	2,5563	4,48E+03	3,65	8,00E+03	3,903	8,80E+03	3,94
25	4,00E+03	3,602	6,80E+03	3,83251	6,00E+03	3,78	1,68E+04	4,225	2,16E+04	4,33
26	8,00E+01	1,903	1,52E+03	3,18184	3,28E+04	4,52	3,20E+04	4,505	5,60E+04	4,75
27	1,12E+02	2,049	2,40E+03	3,38021	6,40E+04	4,81	1,28E+05	5,107	4,80E+04	4,68
28	9,60E+01	1,982	1,60E+04	4,20412	2,56E+05	5,41	6,40E+04	4,806	2,56E+05	5,41
29	3,20E+02	2,505	8,00E+03	3,90309	6,40E+04	4,81	6,40E+04	4,806	1,28E+05	5,11
30	9,60E+01	1,982	2,00E+04	4,30103	9,60E+04	4,98	1,28E+05	5,107	3,84E+05	5,58
PROMED:	5,9E+02	2,22	7,0E+03	3,34	5,6E+04	4,38	6,2E+04	4,34	8,0E+04	4,49
DESV. ST	1046,8	0,755	12799,2	0,79371	86558,4	0,6	102457,8	0,655	120356,9	0,62

EVOLUCIÓN DE CONTAMINACIÓN EN MATADEROS, SALAS DESPIECE Y FÁBRICAS EMBUTIDOS

Nº muestra	SALA DESPIECE VACUNO						FABRICA EMBUTIDOS			
	TABLA CORTE		CINTA MÓVIL APOYO POST-CORTE		GUANTE MALLA		PICADORA		MESA CAÍDA EMBUTIDO FRESCO	
	valor (ufc/cm ²)	log ₁₀ (valor)	valor (ufc/cm ²)	log ₁₀ (valor)	valor (ufc/cm ²)	log ₁₀ (valor)	valor (ufc/cm ²)	log ₁₀ (valor)	valor (ufc/cm ²)	log ₁₀ (valor)
1	1,80E+04	4,255	1,28E+05	5,11	8,00E+04	4,9	1,28E+05	5,11	3,20E+04	4,51
2	6,40E+04	4,806	2,40E+05	5,38	4,00E+04	4,6	1,28E+05	5,11	5,60E+03	3,75
3	1,60E+05	5,204	9,60E+04	4,98	6,40E+03	3,81	1,70E+05	5,23	1,92E+04	4,28
4	2,57E+03	3,41	2,56E+05	5,41	2,24E+03	3,35	1,28E+05	5,11	3,60E+02	2,56
5	1,60E+03	3,204	9,20E+02	2,96	4,80E+02	2,68	1,28E+05	5,11	4,00E+02	2,6
6	1,20E+03	3,079	6,40E+02	2,81	6,00E+04	4,78	6,40E+04	4,81	3,20E+04	4,51
7	1,28E+03	3,107	4,00E+04	4,6	3,68E+04	4,57	1,28E+05	5,11	4,00E+05	5,6
8	1,36E+03	3,134	3,44E+04	4,54	4,00E+03	3,6	1,28E+05	5,11	4,80E+03	3,68
9	9,60E+04	4,982	4,80E+04	4,68	3,84E+03	3,58	9,60E+04	4,98	2,80E+03	3,45
10	6,00E+03	3,778	1,28E+05	5,11	6,40E+04	4,81	2,56E+04	4,41	5,60E+03	3,75
11	1,90E+03	3,279	1,60E+03	3,2	9,60E+04	4,98	6,40E+03	3,81	5,60E+03	3,75
12	6,40E+04	4,806	6,40E+04	4,81	2,56E+04	4,41	1,44E+04	4,16	3,60E+03	3,56
13	1,60E+04	4,204	1,44E+04	4,16	3,20E+04	4,51	1,28E+04	4,11	2,40E+03	3,38
14	3,84E+03	3,584	2,72E+03	3,43	1,92E+05	5,28	1,28E+05	5,11	5,60E+02	2,75
15	3,76E+04	4,575	2,48E+04	4,39	3,20E+04	4,51	1,92E+05	5,28	1,00E+03	3
16	2,80E+03	3,447	1,04E+05	5,02	1,60E+04	4,2	3,20E+04	4,51	9,60E+02	2,98
17	8,00E+03	3,903	1,92E+05	5,28	7,20E+03	3,86	1,28E+05	5,11	2,40E+03	3,38
18	1,80E+04	4,255	4,80E+03	3,68	9,60E+03	3,98	2,16E+04	4,33	1,00E+03	3
19	1,20E+04	4,079	1,92E+04	4,28	5,60E+04	4,75	6,40E+04	4,81	1,60E+04	4,2
20	2,00E+04	4,301	6,40E+03	3,81	8,00E+04	4,9	2,72E+04	4,43	3,20E+03	3,51
21	6,40E+04	4,806	3,20E+04	4,51	6,40E+04	4,81	4,80E+04	4,68	5,60E+02	2,75
22	4,80E+04	4,681	6,40E+04	4,81	1,28E+05	5,11	1,04E+05	5,02	6,40E+03	3,81
23	6,40E+04	4,806	3,84E+05	5,58	2,56E+05	5,41	1,52E+04	4,18	1,36E+04	4,13
24	6,40E+04	4,806	3,20E+04	4,51	1,28E+05	5,11	2,56E+04	4,41	8,00E+02	2,9
25	3,20E+04	4,505	1,28E+05	5,11	9,60E+04	4,98	6,40E+04	4,81	1,00E+03	3
26	1,28E+05	5,107	2,56E+05	5,41	1,44E+05	5,16	2,56E+05	5,41	5,60E+03	3,75
27	1,28E+05	5,107	2,56E+05	5,41	1,92E+05	5,28	6,40E+04	4,81	2,40E+03	3,38
28	6,40E+04	4,806	6,40E+04	4,81	1,28E+05	5,11	4,00E+05	5,6	1,28E+03	3,11
29	3,84E+04	4,584	3,20E+04	4,51	1,28E+05	5,11	6,40E+04	4,81	3,20E+03	3,51
30	6,40E+04	4,806	6,40E+04	4,81	6,40E+04	4,81	3,20E+04	4,51	3,20E+03	3,51
PROMEDI	4,1E+04	4,25	9,1E+04	4,57	7,2E+04	4,56	9,4E+04	4,80	1,9E+04	3,53
DESV. ST.	42985,8	0,687	99532,1	0,75	65561,4	0,66	84034,0	0,43	72398,6	0,66

Tabla 21: Resultados analíticos para Aerobios mesófilos en las distintas superficies de contacto directo con el alimento a las 3,5-4,5 h de procesado (en ufc/cm² y en log₁₀ (ufc/cm²)).

Nº muestra	MATADEROS		SALA DESPIECE PORCINO			SALA DESPIECE VACUNO			FABRICA EMBUTIDOS	
	GANCHO COLGADO CANAL	GANCHO COLGADO VISCERA ROJA	TABLA CORTE	MESA APOYO CARNES	GUANTE MALLA	TABLA CORTE	CINTA MÓVIL APOYO POSTCORTE	GUANTE MALLA	PICADORA	MESA CAÍDA EMBUTIDO FRESCO
	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)
1	2,73	4,82	4,51	4,98	4,20	4,26	5,11	4,90	5,11	4,51
2	2,47	3,41	4,54	5,29	4,90	4,53	5,24	4,75	5,11	4,13
3	2,51	3,18	4,53	5,29	4,97	4,76	5,16	4,44	5,15	4,18
4	2,62	3,00	4,52	5,37	4,60	4,42	5,22	4,17	5,14	3,77
5	2,75	3,02	4,54	5,16	4,37	4,18	4,77	3,87	5,13	3,54
6	2,37	3,10	4,48	4,86	4,33	3,99	4,44	4,02	5,08	3,70
7	2,15	3,23	4,64	4,67	4,51	3,87	4,46	4,10	5,08	3,97
8	2,04	3,25	4,72	4,50	4,46	3,77	4,47	4,04	5,08	3,94
9	2,04	3,29	4,76	4,42	4,44	3,91	4,50	3,99	5,07	3,88
10	2,17	3,34	4,76	4,36	4,40	3,90	4,56	4,07	5,01	3,87
11	2,19	3,12	4,71	4,32	4,47	3,84	4,43	4,15	4,90	3,86
12	2,21	3,16	4,68	4,30	4,45	3,92	4,47	4,17	4,84	3,83
13	2,19	3,14	4,61	4,32	4,47	3,94	4,44	4,20	4,78	3,80
14	2,20	3,21	4,49	4,26	4,44	3,92	4,37	4,28	4,80	3,72
15	2,17	3,23	4,43	4,26	4,38	3,96	4,37	4,29	4,84	3,67
16	2,26	3,22	4,39	4,27	4,37	3,93	4,41	4,29	4,81	3,63
17	2,21	3,16	4,37	4,23	4,37	3,93	4,46	4,26	4,83	3,62
18	2,22	3,18	4,34	4,19	4,41	3,95	4,42	4,24	4,80	3,58
19	2,22	3,21	4,33	4,22	4,38	3,95	4,41	4,27	4,80	3,61
20	2,26	3,22	4,33	4,21	4,37	3,97	4,38	4,30	4,79	3,61
21	2,21	3,21	4,30	4,21	4,37	4,01	4,39	4,33	4,78	3,57
22	2,20	3,26	4,31	4,24	4,39	4,04	4,41	4,36	4,79	3,58
23	2,18	3,25	4,32	4,25	4,39	4,07	4,46	4,41	4,77	3,60
24	2,19	3,22	4,30	4,24	4,37	4,10	4,46	4,44	4,75	3,57
25	2,25	3,25	4,27	4,24	4,37	4,12	4,49	4,46	4,75	3,55
26	2,23	3,25	4,28	4,25	4,38	4,16	4,52	4,49	4,78	3,56
27	2,23	3,25	4,30	4,28	4,39	4,19	4,55	4,52	4,78	3,55
28	2,22	3,29	4,34	4,30	4,43	4,21	4,56	4,54	4,81	3,54
29	2,23	3,31	4,36	4,32	4,45	4,23	4,56	4,56	4,81	3,54
30	2,22	3,34	4,38	4,34	4,49	4,25	4,57	4,56	4,80	3,53
PROME	2,27	3,27	4,46	4,47	4,44	4,08	4,57	4,31	4,90	3,73
DESV. s	0,17	0,31	0,16	0,37	0,15	0,22	0,26	0,23	0,15	0,23

Tabla 22: Resultados analíticos expresados en promedio acumulado (media 1 valor, media 2 valores, ... media n valores) para Aerobios mesófilos en las distintas superficies de contacto directo con el alimento a las 3,5-4,5 h de procesado (log₁₀ (ufc/cm²)).

A continuación se expresan los resultados para cada superficie en gráficos de barras.

EVOLUCIÓN DE CONTAMINACIÓN EN MATADEROS, SALAS DESPIECE Y FÁBRICAS EMBUTIDOS

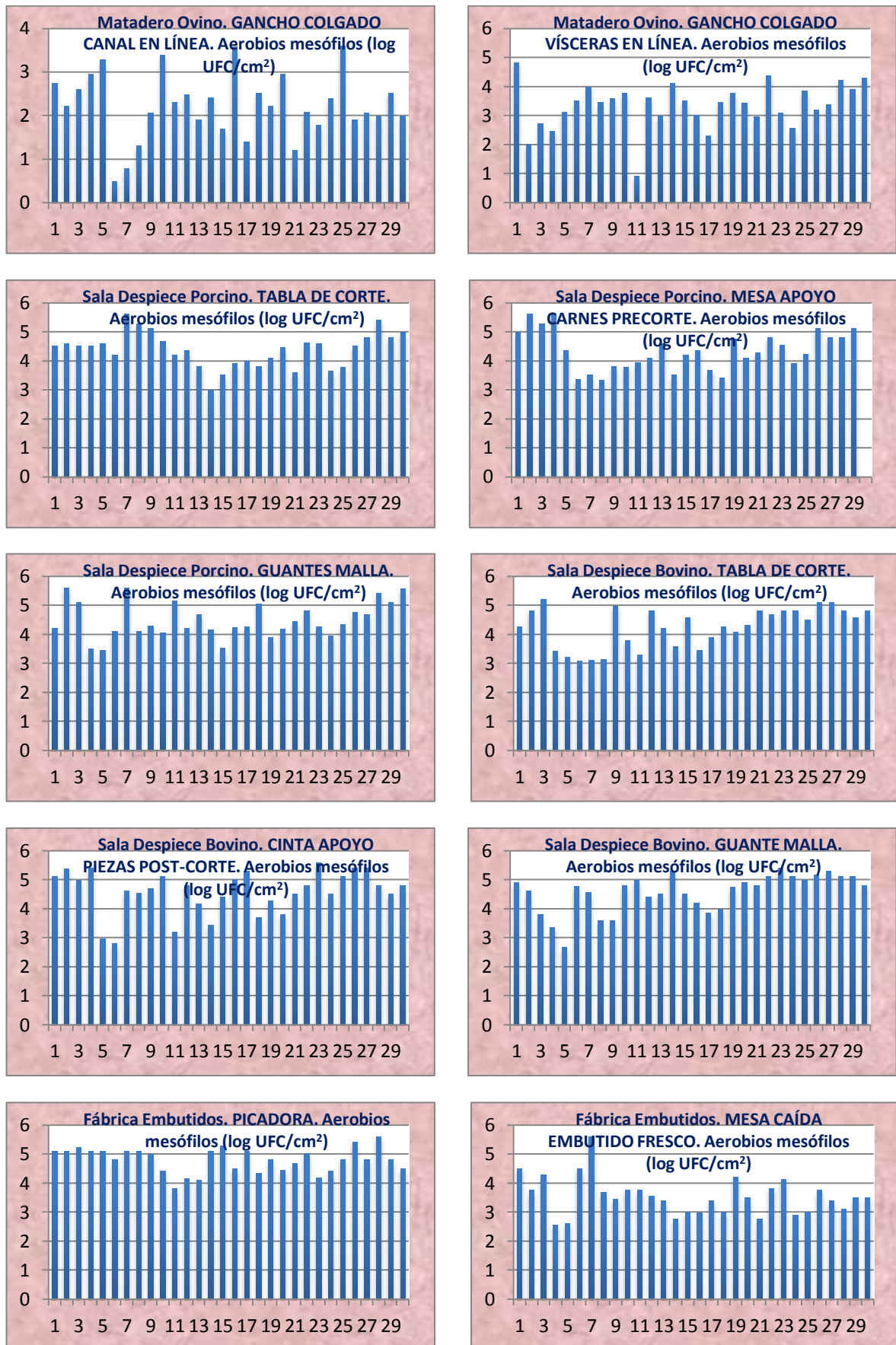


Figura 21: Representaciones gráficas de resultados analíticos para Aerobios mesófilos para cada una de las superficies de contacto directo con el alimento evaluadas a las 3,5-4,5 h de procesado (log₁₀ (ufc/cm²)).

Ahora representamos los valores medios y desviaciones típicas de cada superficie.

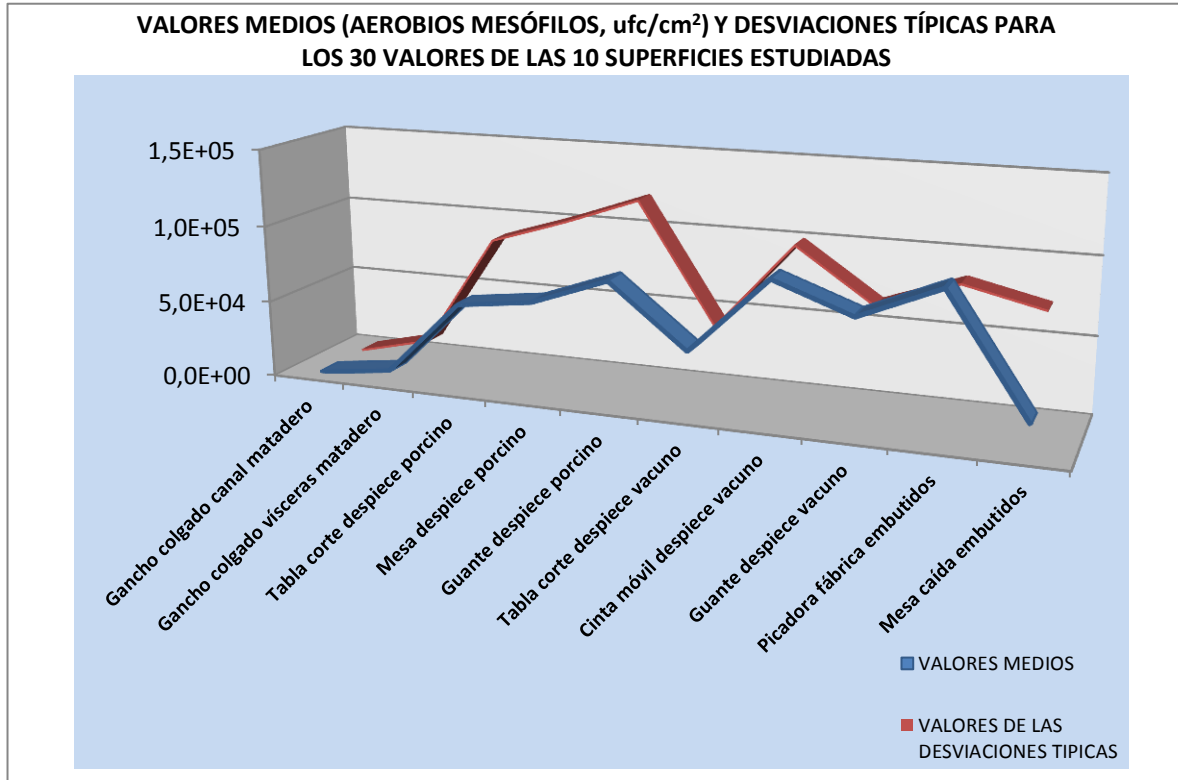
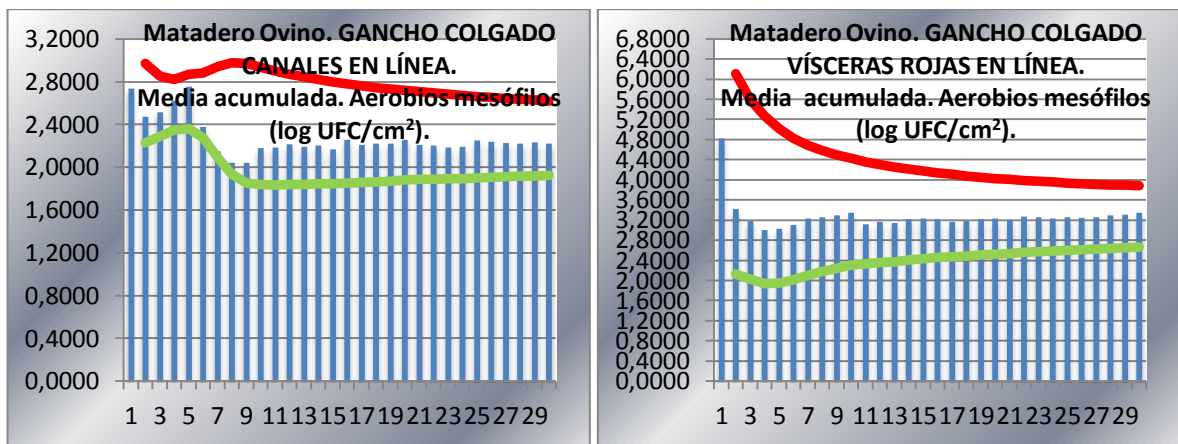


Figura 22: Representaciones gráficas de valores medios y desviaciones típicas de los 30 valores de las 10 superficies estudiadas. Aerobios mesófilos (ufc/cm²).

Y a continuación las gráficas de valores medios acumulados, junto con el dato de valores medios más menos dos veces la desviación típica.



EVOLUCIÓN DE CONTAMINACIÓN EN MATADEROS, SALAS DESPIECE Y FÁBRICAS EMBUTIDOS

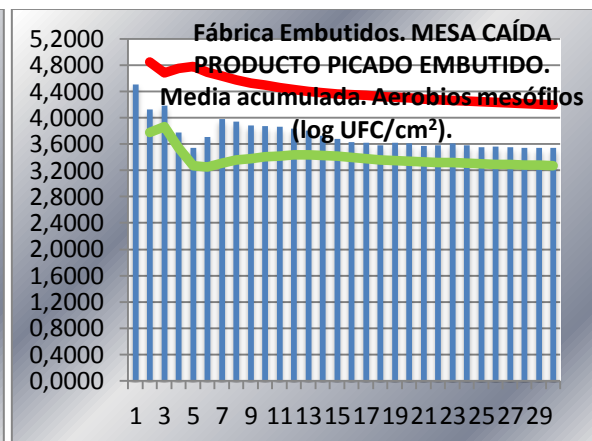
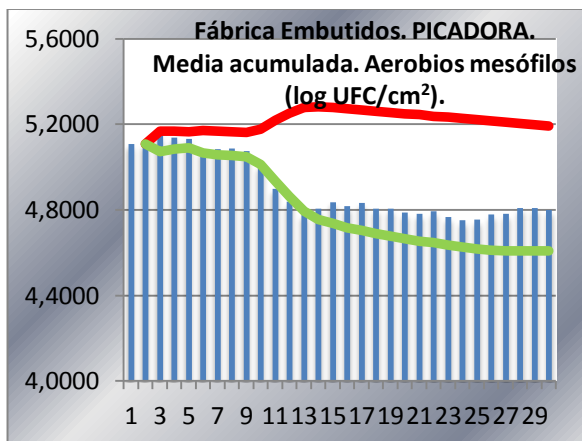
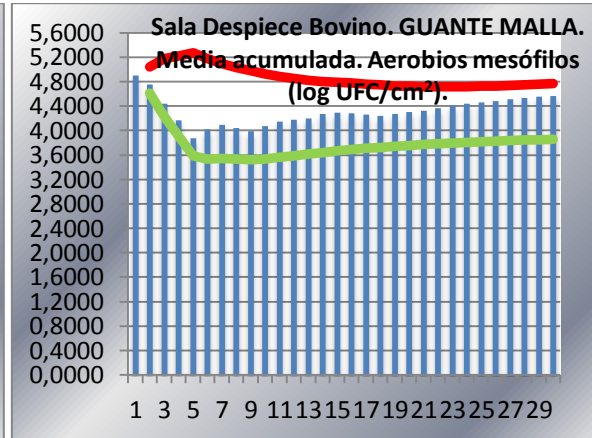
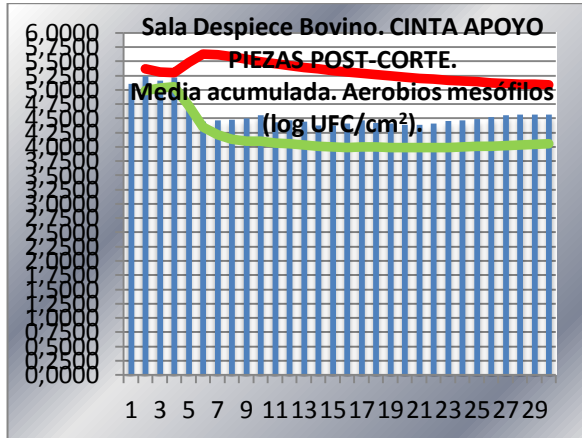
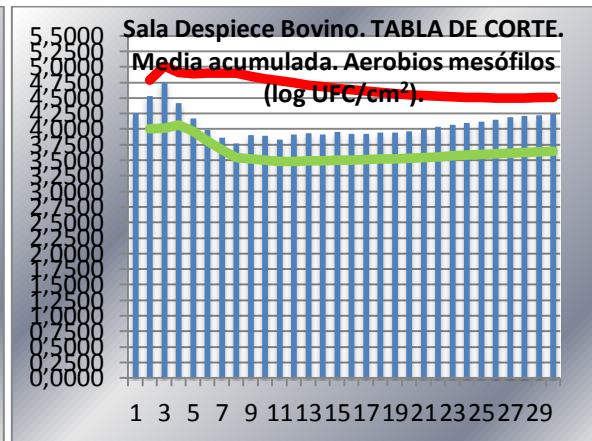
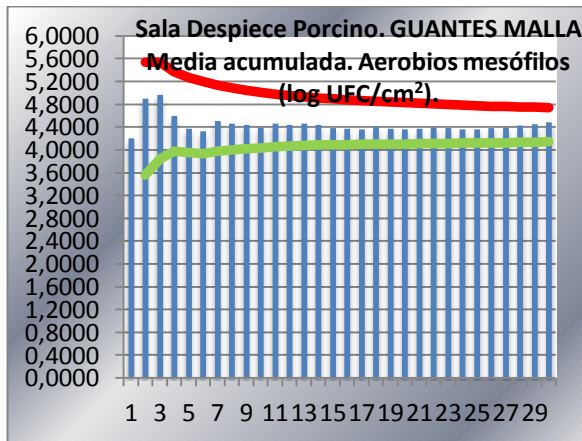
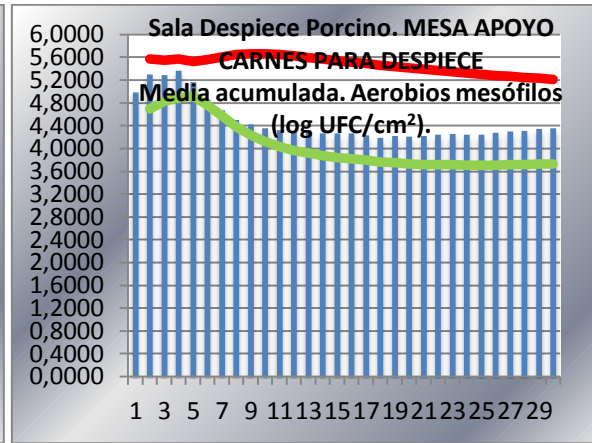
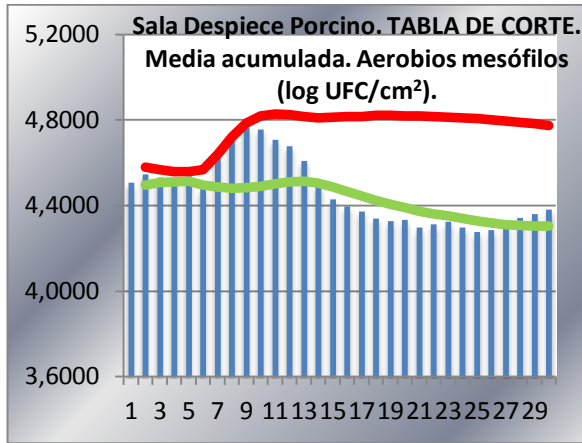


Figura 23: Representaciones gráficas de resultados analíticos, para las diez superficies de contacto en evolución evaluadas a las 3,5-4,5 h de procesado, con valores expresados en medias acumuladas (columna 1: media de 1 valor, columna 2: media de 2 valores, ... columna n: media de n valores), para Aerobios mesófilos (\log_{10} (ufc/cm²)). Línea de trazado roja: valor de la media más dos veces el valor de la desviación típica hasta cada uno de los puntos de lectura. Línea de trazado verde: valor de la media menos dos veces el valor de la desviación típica hasta cada uno de los puntos de lectura. El área entre las líneas roja y verde es el valor de la media \pm 2 veces la desviación típica (En una distribución normal, encontraríamos en tal área el 95 % de los valores posibles).

COMENTARIOS SOBRE LOS RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN

- Los datos en general son bastante variables. Esto puede ser debido a distintas cargas microbianas de las carnes trabajadas en los distintos días, distintos puntos de apoyo en tablas y mesas en los distintos días y aún en cada día, etc. A causa de lo anterior, no se han eliminado datos analíticos aparentemente extremos. Además, tales datos extremos no se corresponden generalmente con un solo valor aislado de cada superficie. Podemos ver, por ejemplo, que la contaminación en tablas de corte varía entre valores con exponente 3 hasta valores con exponente 5 (100 veces). Algo similar ocurre con la mesa de apoyo en sala de despiece de porcino, teniendo incluso la cinta móvil de apoyo post-corte en sala de vacuno mayor variación (desde exponente 2 hasta exponente 5). También los muestreos de superficie de guantes de malla de las dos salas de despiece han variado desde exponente 3 hasta exponente 5 (con un valor en exponente 2). Los ganchos de colgado en matadero varían desde exponente 1 hasta exponente 3 (para canales) y desde exponente 2 hasta exponente 4 (para vísceras). Para la mesa de caída de embutido se obtienen valores desde exponente 2 hasta exponente 4 y para la picadora de carnes para elaborar embutidos valores desde exponente 2 hasta exponente 4 (en un caso con exponente 5).

- El orden de contaminación por aerobios mesófilos de las superficies, según valores medios obtenidos, enunciado de mayor a menor, es: picadora, cinta móvil de sala de vacuno, guante de malla de sala de porcino, guante de malla de sala de vacuno, mesa de sala de porcino, tabla de corte de sala de porcino, tabla de corte de sala de vacuno, mesa de caída de embutidos, gancho de colgado de vísceras rojas y gancho de colgado de canales. Así, los resultados de contaminación existente a las 3,5-4,5 h de procesado en el matadero de ovino son los más bajos de todos los obtenidos, con una considerable diferencia frente a cualquier otra superficie del resto de las industrias. La media de los datos para la superficie "gancho de colgado de canal" es diez veces menor a la media obtenida para la superficie "gancho de colgado de vísceras rojas"; ambas son superficies del matadero. Pero a su vez, la media para esta última superficie es entre 7 y 14 veces menor que el resto de superficies de las otras empresas, salvo para la mesa de caída de embutido

fresco, con menos diferencia (2,7 veces menor). Es decir, por tanto, la superficie del gancho donde se cuelga la canal de cordero, se contamina entre 70 y 140 veces menos que el resto de superficies de otro tipo de industrias (27 veces menor para el caso de la mesa de caída de embutido fresco). Si determinamos las diferencias entre poblaciones de muestras tomadas dos a dos (30 muestras de una superficie estudiada frente a 30 muestras de otra superficie), realizando un análisis de varianza (ANOVA), encontramos que los resultados para el gancho de colgado de canales reflejan una diferencia significativa ($p > 0,05$) con el resto de superficies, salvo para el caso de la mesa de caída de embutido fresco en fábrica de embutidos, que es, tras el gancho de colgado de canales y el gancho de colgado de vísceras, aquella con menor valor medio de aerobios mesófilos de entre las superficies estudiadas. Igualmente, para el gancho de colgado de vísceras, las diferencias son significativas con el resto de superficies salvo con la mesa de caída de embutido fresco. Esto corrobora lo antes mencionado, los ganchos de colgado de canales y, tras ellos, los ganchos de colgado de vísceras, son los que presentan, de modo significativo, menor carga microbiana que el resto de superficies estudiadas (con una diferencia menor al compararlos con la mesa de caída de embutidos).

- En todos los casos, salvo para algunos valores de los ganchos de colgado de canales de ovino en matadero, la situación es preocupante en cuanto a la carga microbiana de superficies a media jornada, tanto si la analizamos a partir de lo requerido en normativa para superficies limpias (<10 ufc/cm², Decisión 2001/ 471/ CE, para mataderos y salas de despiece -aunque se aplica exclusivamente a superficies higienizadas, podría ser un referente no lejano para el transcurso de la jornada-), como si lo consideramos desde el punto de vista de las carnes o masas cárnicas en contacto con tales superficies durante los procesos, que recogerán parte de esa contaminación.

- Al realizar la representación gráfica (\log_{10} (ufc/cm²)) de los valores medios (columna 1: media de 1 valor, columna 2: media de 2 valores, ... columna n: media de n valores) para las diez superficies de contacto, incluyendo dos líneas de trazado, una (en rojo) resultado del valor de la media más dos veces el valor de la desviación típica hasta cada uno de los puntos de lectura, otra (en verde) resultado del valor de la media menos dos veces el valor de la desviación típica hasta cada uno de los puntos de lectura, vemos que ambas líneas tienden a confluir a medida que aumenta el número de datos representados. El área entre las dos líneas es el valor de la media \pm 2 veces la desviación típica, y, en una distribución normal, encontraríamos en tal área el 95 % de los valores posibles. Es esperable por tanto que, si aumentamos el muestreo, veamos como esas dos líneas siguen confluyendo, puesto que nuestras tablas de valores para cada ítem, a pesar de la variedad en los datos obtenidos, tienden a comportarse como una distribución normal. En el caso del gráfico para la Picadora de la fábrica de embutidos, el que presenta la tendencia de aproximación

entre ambas líneas menos definida de todos los mostrados, ambas líneas comienzan muy próximas para, en un momento dado, distanciarse de modo muy considerable. Esto es debido a la aparición de un resultado (que no vuelve a repetirse) unas veinte veces más bajo que casi todos los otros diez valores precedentes, lo cual hace variar mucho la desviación típica y demora la aproximación de las líneas.

2.3.2.1.2. A las 7,5-8 h de procesado y comparativa con las 3,5-4,5 h

Mostramos a continuación los datos comparativos de valores obtenidos (Tabla 23, dividida en dos partes dadas sus dimensiones), y sus representaciones gráficas (Figura 24, tres gráficas, una por cada superficie individual, Figura 25, gráfica para todos los valores contemplados en conjunto, y Figura 26, gráfica para los valores medios de cada tipo de superficie) para aerobios mesófilos, a media jornada y al finalizar la jornada, para las superficies de la sala de despiece de vacuno.

Sólo se escogió esta empresa de despiece de vacuno (tanto para la evaluación de aerobios mesófilos como para la evaluación de enterobacterias, cuyos resultados mostraremos después) como modo de comprobar, con un muestreo limitado, que la contaminación es creciente, al transcurrir la jornada, en las superficies donde contactan carnes. Hemos de pensar que, si la contaminación resulta ser creciente en las superficies de esta empresa en el intervalo entre el intermedio y el final de jornada (resultado esperado incluso si no se aportara contaminación adicional en ese periodo, dada la capacidad de reproducción con el tiempo de las poblaciones microbianas en ausencia de circunstancias lesivas), lo será casi con total probabilidad también para el resto de superficies, en contacto con carnes o sus derivados, del resto de las industrias. Además, al evaluar si la contaminación es mayor al finalizar la jornada, obtenemos datos que, aunque técnicamente interesantes, no dejan margen de maniobra alguno a las industrias. Por ello no hemos llevado a cabo entonces un elevado muestreo, que sí hemos considerado en cambio necesario realizar a media jornada, pues si en tal momento se demuestra una considerable contaminación, puede concienciarse a las empresas acerca de la conveniencia de implantar acciones correctoras para asegurar una mayor calidad sanitaria de los productos trabajados en la otra mitad de la jornada.

SALA DESPIECE VACUNO								
TABLA CORTE			APOYO POST-			GUANTE MALLA		
valor (ufc/cm ²)	valor (ufc/cm ²)	valor (ufc/cm ²)	valor (ufc/cm ²)	valor (ufc/cm ²)	valor (ufc/cm ²)	valor (ufc/cm ²)	valor (ufc/cm ²)	valor (ufc/cm ²)
3,5-4,5 h proceso	7,5-8 h proceso	INCREMENTO	3,5-4,5 h proceso	7,5-8 h proceso	INCREMENTO	3,5-4,5 h proceso	7,5-8 h proceso	INCREMENTO
6,40E+04	4,00E+05	3,36E+05	3,20E+04	1,28E+05	9,60E+04	6,40E+04	4,00E+05	3,36E+05
4,80E+04	4,00E+05	3,52E+05	6,40E+04	1,28E+05	6,40E+04	1,28E+05	4,00E+05	2,72E+05
6,40E+04	9,60E+04	3,20E+04	3,84E+05	6,40E+04	-3,20E+05	2,56E+05	4,00E+05	1,44E+05
6,40E+04	1,28E+05	6,40E+04	3,20E+04	1,28E+05	9,60E+04	1,28E+05	4,00E+05	2,72E+05
3,20E+04	2,56E+05	2,24E+05	1,28E+05	2,56E+05	1,28E+05	9,60E+04	4,00E+05	3,04E+05
2,72E+04	1,60E+05	1,33E+05	8,00E+04	2,64E+05	1,84E+05	1,44E+05	2,64E+05	1,20E+05
1,28E+05	2,56E+05	1,28E+05	2,56E+05	4,00E+05	1,44E+05	1,92E+05	4,00E+05	2,08E+05
6,40E+04	1,28E+05	6,40E+04	6,40E+04	4,00E+05	3,36E+05	1,28E+05	4,00E+05	2,72E+05
3,84E+04	6,40E+04	2,56E+04	3,20E+04	3,84E+04	6,40E+03	1,28E+05	2,56E+05	1,28E+05
6,40E+04	1,28E+05	6,40E+04	6,40E+04	4,00E+05	3,36E+05	6,40E+04	4,00E+05	3,36E+05
PROMEDIO								
5,94E+04	2,02E+05	1,42E+05	1,14E+05	2,21E+05	1,07E+05	1,33E+05	3,72E+05	2,39E+05
DESV. ST.								
28225,883	121431,5	121399,7	116469,5	142647,4	184740,5	57466,5	59059,3	83518,2

SALA DESPIECE VACUNO								
TABLA CORTE			APOYO POST-			GUANTE MALLA		
log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)
3,5-4,5 h proceso	7,5-8 h proceso	INCREMENTO	3,5-4,5 h proceso	7,5-8 h proceso	INCREMENTO	3,5-4,5 h proceso	7,5-8 h proceso	INCREMENTO
4,80618	5,60206	0,79588	4,50515	5,10721	0,60206	4,80618	5,60206	0,79588
4,68124	5,60206	0,920819	4,80618	5,10721	0,30103	5,10721	5,60206	0,49485
4,80618	4,982271	0,176091	5,584331	4,80618	-0,77815	5,40824	5,60206	0,19382
4,80618	5,10721	0,30103	4,50515	5,10721	0,60206	5,10721	5,60206	0,49485
4,50515	5,40824	0,90309	5,10721	5,40824	0,30103	4,982271	5,60206	0,619789
4,43457	5,20412	0,769551	4,90309	5,4216	0,518514	5,158362	5,4216	0,263241
5,10721	5,40824	0,30103	5,40824	5,60206	0,19382	5,283301	5,60206	0,318759
4,80618	5,10721	0,30103	4,80618	5,60206	0,79588	5,10721	5,60206	0,49485
4,58433	4,80618	0,221849	4,50515	4,58433	0,079181	5,10721	5,40824	0,30103
4,80618	5,10721	0,30103	4,80618	5,60206	0,79588	4,80618	5,60206	0,79588
PROMEDIO								
4,7343401	5,2334801	0,49914	4,8936861	5,2348165	0,3411304	5,08733747	5,5646324	0,47729491
DESV. ST.								
0,19	0,26	0,31	0,37	0,35	0,46	0,19	0,08	0,21

Tabla 23: Resultados analíticos para Aerobios mesófilos en las tres superficies de contacto directo con el alimento evaluadas, en los mismos días, a las 3,5-4,5 h de procesado y a las 7,5-8 h (en ufc/cm² y en log₁₀ (ufc/cm²)).

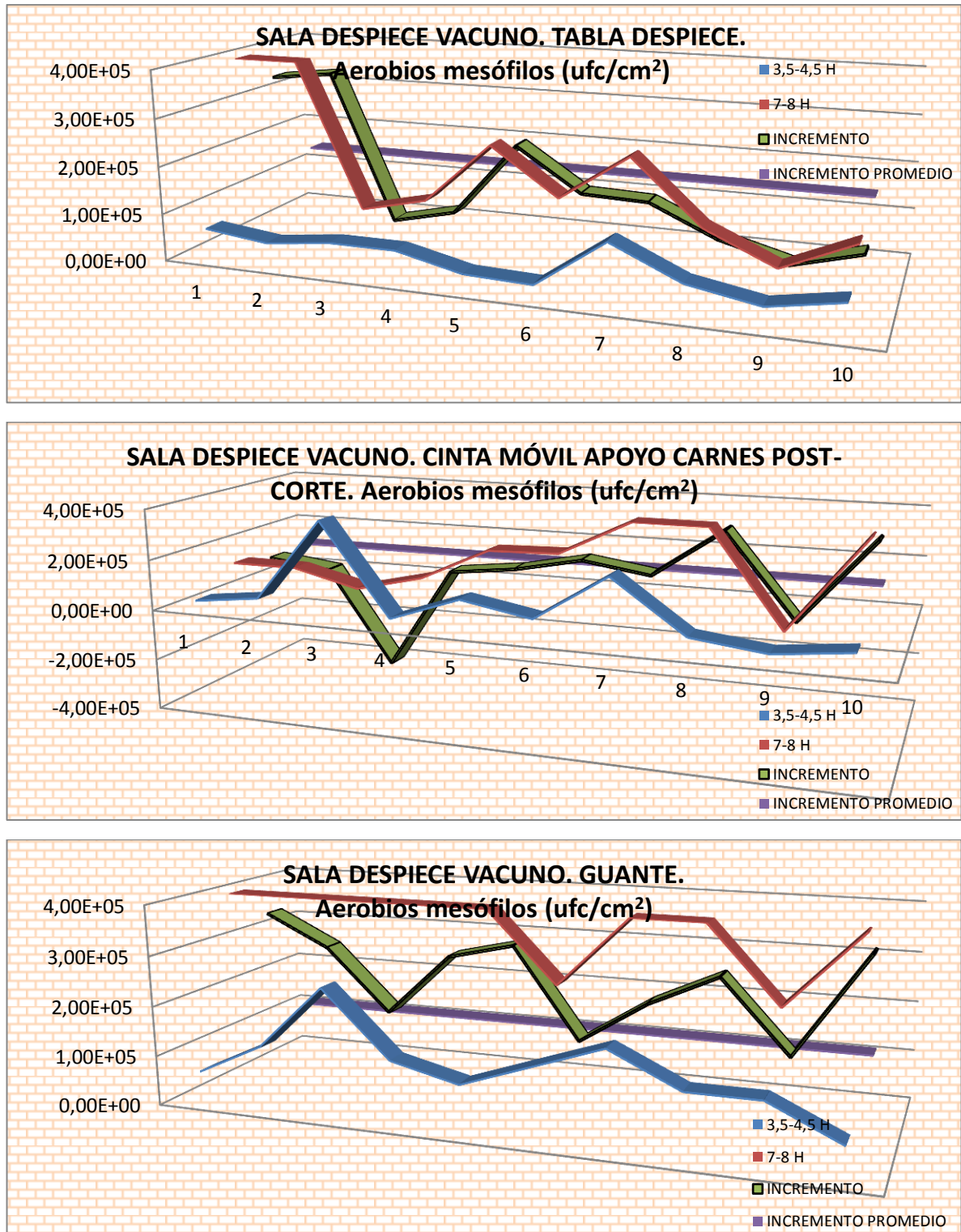


Figura 24: Representaciones gráficas de resultados analíticos, para aerobios mesófilos, de las superficies de contacto en evolución contempladas individualmente, evaluadas a las 3,5-4,5 h de procesado y a las 7,5-8 h (\log_{10} (ufc/cm²)), e incremento reflejado en la contaminación entre los dos distintos tiempos.

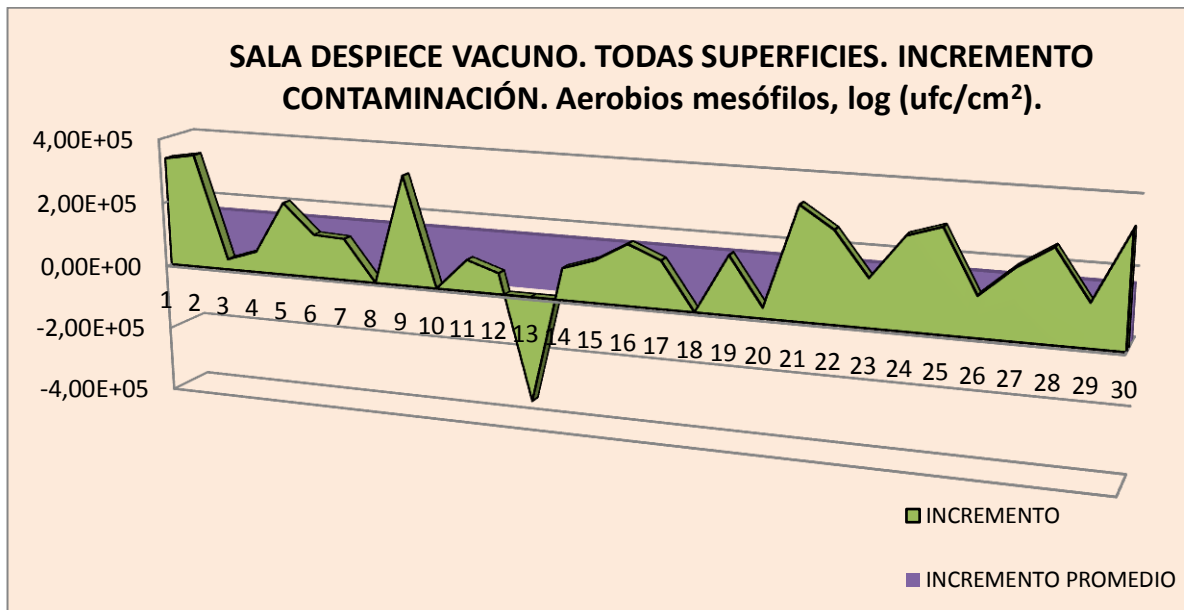


Figura 25: Representación gráfica de resultados analíticos, para aerobios mesófilos, de las superficies de contacto en evolución contempladas en conjunto, evaluadas a las 3,5-4,5 h de procesado y a las 7,5-8 h (\log_{10} (ufc/cm²)), e incremento reflejado en la contaminación entre los dos distintos tiempos.

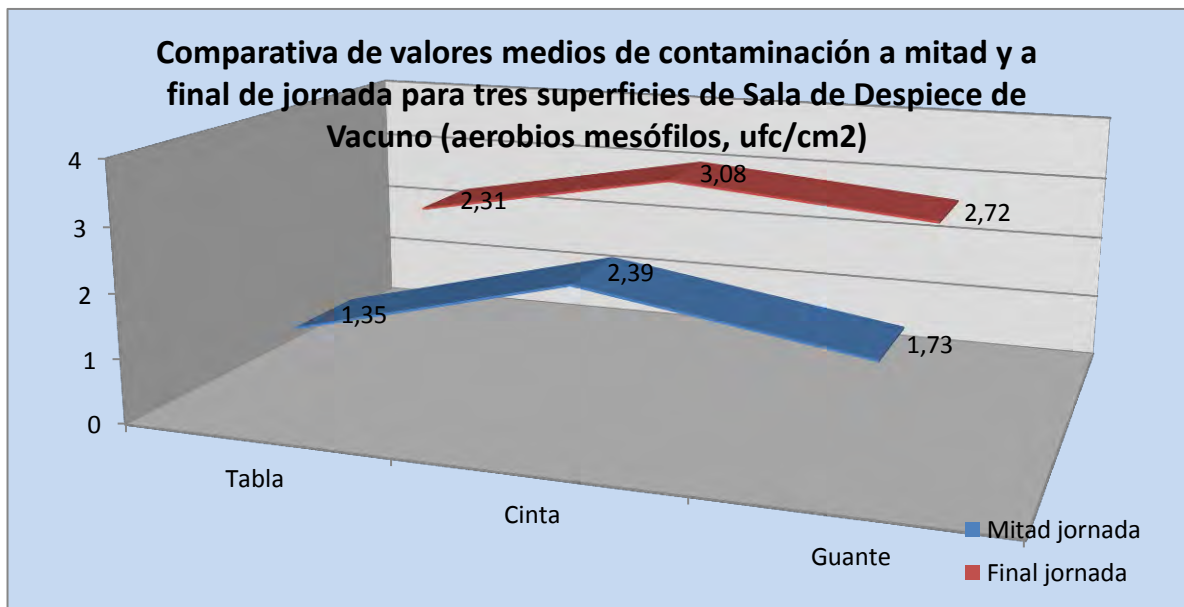


Figura 26: Representación gráfica de valores medios (aerobios mesófilos, ufc/cm²), para las tres superficies estudiadas, a mitad de jornada y al finalizar la jornada de trabajo de la Sala de Despiece de Vacuno.

COMENTARIOS SOBRE LOS RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN

Los valores medidos son significativamente diferentes entre las columnas de 3,5-4,5 y 7,5-8 h ($p < 0,05$) para la tabla de despiece y para el guante. Para la cinta móvil se obtiene un valor muy

próximo a 0,05 (0,0507), que indica también una diferencia muy considerable. Es decir, cuando tomamos muestras de las mismas superficies a media jornada y al finalizar la jornada, la presencia de aerobios mesófilos aumenta de tal modo que las diferencias se hacen muy significativas entre ambas tandas de muestras, la contaminación va creciendo con el tiempo de modo altamente considerable. El incremento de la contaminación entre las distintas bandas horarias está próximo a 0,5 unidades logarítmicas en el caso de la tabla de corte y el guante de malla, y es de 0,34 unidades logarítmicas en el caso de la cinta móvil. Observado en valores promedio absolutos, el crecimiento microbiano al final de jornada es de 3,4 veces su valor a mitad de jornada para la tabla de corte, de 2 veces para la cinta móvil y de 2,8 veces para el guante de malla. No obstante, como puede observarse de los gráficos y analizando todos los datos numéricos, los valores de incremento no son homogéneos entre sí dentro del mismo tipo de superficie; hay una considerable variabilidad. Aunque se ha intentado tomar cada muestra, a mitad de jornada y al finalizar la jornada, de la misma zona, tales zonas no siempre siguen acumulando del mismo modo contaminación. Esto puede ser debido, en el caso de las tablas y la cinta móvil, a que las carnes se apoyan a veces más en un sitio, a veces más en otro, de modo aleatorio, durante el transcurso de la jornada, y, en el caso del guante, a que periódicamente diminutos fragmentos de carnes se adhieren a los intersticios de la malla, fragmentos que al azar pueden desprenderse, modificando la carga orgánica de las distintas zonas del guante.

2.3.2.2. Enterobacterias

2.3.2.2.1. A las 3,5-4,5 h de procesado.

Vemos a continuación, en Tabla 24 (dividida en dos), los datos de enterobacterias obtenidos, para las distintas superficies de contacto directo con alimentos, a las 3,5-4,5 h de inicio de los procesos de producción. Después la Tabla (25) de valores medios acumulados.

EVOLUCIÓN DE CONTAMINACIÓN EN MATADEROS, SALAS DESPIECE Y FÁBRICAS EMBUTIDOS

Nº muestra	MATADERO OVINO				SALA DESPIECE PORCINO					
	GANCHO COLGADO CANAL		COLGADO VÍSCERA ROJA		TABLA CORTE		MESA APOYO CARNES		GUANTE MALLA	
	valor (ufc/ cm ²)	log ₁₀ (valor)	valor (ufc/ cm ²)	log ₁₀ (valor)	valor (ufc/ cm ²)	log ₁₀ (valor)	valor (ufc/ cm ²)	log ₁₀ (valor)	valor (ufc/ cm ²)	log ₁₀ (valor)
1	0,0E+00	0	0,0E+00	0	9,6E+01	1,98	1,9E+02	2,28	4,8E+00	0,68
2	0,0E+00	0	0,0E+00	0	3,2E+02	2,51	3,2E+02	2,51	3,2E+03	3,51
3	0,0E+00	0	0,0E+00	0	7,2E+01	1,86	1,4E+03	3,16	6,4E+02	2,81
4	4,0E-01	0	0,0E+00	0	2,8E+01	1,45	1,7E+03	3,23	2,6E+03	3,41
5	0,0E+00	0	1,6E+00	0,2	1,1E+01	1,03	4,0E+01	1,6	4,8E+02	2,68
6	0,0E+00	0	4,8E+00	0,68	4,8E+00	0,68	2,0E+00	0,3	3,2E+02	2,51
7	0,0E+00	0	1,2E+00	0,08	1,3E+03	3,11	1,3E+02	2,11	4,0E+02	2,6
8	0,0E+00	0	1,1E+01	1,03	8,0E+02	2,9	9,6E+01	1,98	3,2E+02	2,51
9	0,0E+00	0	0,0E+00	0	1,3E+03	3,11	2,6E+02	2,41	7,2E+02	2,86
10	4,0E-01	0	0,0E+00	0	3,2E+02	2,51	6,4E+01	1,81	6,4E+02	2,81
11	1,2E+00	0,079	2,0E+01	1,3	3,2E+02	2,51	1,0E+01	1	9,6E+01	1,98
12	0,0E+00	0	8,0E+00	0,9	3,8E+02	2,58	6,4E+01	1,81	2,6E+02	2,41
13	0,0E+00	0	3,6E+00	0,56	3,2E+02	2,51	7,2E+02	2,86	1,6E+02	2,2
14	0,0E+00	0	1,2E+00	0,08	1,9E+02	2,28	2,5E+02	2,39	9,6E+01	1,98
15	1,6E+00	0,204	0,0E+00	0	9,6E+01	1,98	6,4E+01	1,81	4,0E+01	1,6
16	8,0E-01	0	0,0E+00	0	1,1E+02	2,05	9,6E+00	0,98	1,2E+02	2,08
17	0,0E+00	0	1,2E+00	0,08	8,0E+01	1,9	3,2E+02	2,51	8,8E+02	2,94
18	0,0E+00	0	0,0E+00	0	2,0E+02	2,3	1,0E+02	2	6,4E+01	1,81
19	0,0E+00	0	4,0E-01	0	1,8E+01	1,25	1,2E+01	1,08	2,0E+02	2,3
20	4,0E+00	0,602	7,2E+00	0,86	3,6E+01	1,56	6,4E+02	2,81	2,4E+01	1,38
21	3,6E+00	0,556	0,0E+00	0	2,8E+01	1,45	3,2E+01	1,51	4,0E+01	1,6
22	0,0E+00	0	1,2E+00	0,08	2,0E+02	2,3	8,0E+01	1,9	6,4E+01	1,81
23	0,0E+00	0	0,0E+00	0	2,6E+01	1,41	3,5E+01	1,55	1,8E+02	2,25
24	0,0E+00	0	4,0E+00	0,6	1,2E+02	2,08	1,6E+01	1,2	1,6E+02	2,2
25	1,2E+00	0,079	0,0E+00	0	4,0E+01	1,6	1,6E+01	1,2	9,6E+01	1,98
26	0,0E+00	0	4,0E-01	0	3,8E+01	1,58	4,0E+03	3,6	4,8E+01	1,68
27	3,2E+00	0,505	6,4E+01	1,81	4,0E+03	3,6	2,6E+03	3,41	2,6E+03	3,41
28	4,0E-01	0	0,0E+00	0	3,2E+02	2,51	1,4E+03	3,16	1,3E+03	3,11
29	8,0E-01	0	0,0E+00	0	1,4E+02	2,16	6,4E+02	2,81	1,3E+03	3,11
30	1,2E+01	1,064	0,0E+00	0	3,2E+01	1,51	1,4E+03	3,16	4,0E+03	3,6
PROMEDIO	9,7E-01	0,10	4,3E+00	0,28	3,6E+02	2,07	5,6E+02	2,14	7,0E+02	2,39
DESV. ST.	2,29	0,25	12,08	0,47	761,25	0,66	911,70	0,84	1033,58	0,69

Nº muestra	SALA DESPIECE VACUNO						FABRICA ELABORADOS			
	TABLA CORTE		CINTA MÓVIL APOYO POST-CORTE		GUANTE MALLA		PICADORA		MESA CAÍDA EMBUTIDO FRESCO	
	valor (ufc/cm ²)	log ₁₀ (valor)	valor (ufc/cm ²)	log ₁₀ (valor)	valor (ufc/cm ²)	log ₁₀ (valor)	valor (ufc/cm ²)	log ₁₀ (valor)	valor (ufc/cm ²)	log ₁₀ (valor)
1	2,0E+01	1,3	6,4E+01	1,81	2,4E+02	2,38	1,4E+02	2,16	8,0E+01	1,9
2	2,8E+00	0,45	4,8E+01	1,68	1,3E+02	2,11	1,9E+01	1,28	3,2E+01	1,51
3	6,4E+01	1,81	0,0E+00	0	3,2E+01	1,51	6,4E+02	2,81	8,0E-01	0
4	1,0E+01	1	3,2E+01	1,51	2,0E+01	1,3	3,6E+00	0,56	4,0E-01	0
5	8,0E+00	0,9	0,0E+00	0	7,2E+00	0,86	1,4E+01	1,13	0,0E+00	0
6	1,6E+01	1,2	8,8E+00	0,94	1,2E+01	1,08	2,0E+00	0,3	8,8E+02	2,94
7	8,0E+00	0,9	3,8E+02	2,58	1,2E+02	2,08	4,0E+03	3,6	1,2E+01	1,08
8	8,0E-01	0	4,0E+00	0,6	6,0E+01	1,78	4,0E+03	3,6	1,8E+01	1,26
9	4,8E+01	1,68	1,6E+02	2,2	8,0E+01	1,9	8,0E+02	2,9	6,0E+00	0,78
10	1,6E+01	1,2	1,3E+01	1,11	3,2E+02	2,51	4,8E+01	1,68	5,2E+00	0,72
11	2,0E+01	1,3	1,9E+01	1,28	3,2E+02	2,51	5,6E+01	1,75	4,0E+00	0,6
12	7,2E+01	1,86	4,0E+02	2,6	1,6E+01	1,2	1,9E+01	1,28	6,4E+01	1,81
13	3,4E+01	1,54	1,8E+01	1,25	5,6E+01	1,75	2,7E+01	1,43	6,4E+01	1,81
14	2,9E+01	1,46	1,4E+02	2,16	3,0E+01	1,48	2,6E+02	2,41	1,7E+01	1,23
15	1,0E+01	1	2,9E+01	1,46	6,4E+01	1,81	2,2E+02	2,35	0,0E+00	0
16	4,0E+00	0,6	1,1E+01	1,05	2,4E+01	1,38	6,4E+02	2,81	6,0E+01	1,78
17	2,4E+01	1,38	6,4E+01	1,81	1,4E+01	1,16	1,6E+02	2,2	1,0E+01	1
18	1,2E+01	1,08	1,6E+01	1,2	8,0E+00	0,9	2,7E+01	1,43	3,5E+01	1,55
19	1,2E+00	0,08	6,4E+02	2,81	8,0E+00	0,9	4,3E+01	1,64	2,4E+00	0,38
20	2,4E+00	0,38	3,2E+02	2,51	3,2E+01	1,51	8,8E+01	1,94	9,6E+01	1,98
21	7,2E+00	0,86	1,9E+02	2,28	6,4E+01	1,81	5,6E+01	1,75	3,2E+01	1,51
22	8,4E+00	0,92	1,5E+02	2,18	2,7E+01	1,43	1,6E+02	2,2	0,0E+00	0
23	1,6E+01	1,2	6,0E+01	1,78	1,2E+01	1,08	2,0E+01	1,3	4,0E+00	0,6
24	1,2E+01	1,08	2,0E+01	1,3	1,3E+02	2,11	2,6E+02	2,41	1,3E+02	2,11
25	3,2E+01	1,51	6,4E+01	1,81	8,0E+01	1,9	1,6E+02	2,2	1,6E+00	0,2
26	1,4E+02	2,16	6,4E+02	2,81	3,2E+02	2,51	3,2E+02	2,51	6,4E+01	1,81
27	2,6E+02	2,41	1,3E+03	3,11	2,6E+02	2,41	6,4E+02	2,81	3,2E+01	1,51
28	1,6E+02	2,2	6,4E+02	2,81	2,6E+02	2,41	3,2E+02	2,51	1,9E+01	1,28
29	2,9E+02	2,46	1,6E+02	2,2	3,2E+02	2,51	3,2E+02	2,51	1,2E+01	1,08
30	9,6E+01	1,98	1,9E+02	2,28	1,6E+02	2,2	3,2E+02	2,51	2,4E+01	1,38
PROMEDIO	4,7E+01	1,26	1,9E+02	1,77	1,1E+02	1,75	4,6E+02	2,07	5,7E+01	1,13
DESV. ST.	72,91	0,63	285,05	0,80	111,4	0,54	986,91	0,78	158,86	0,76

Tabla 24: Resultados analíticos para enterobacterias en las distintas superficies de contacto directo con el alimento a las 3,5-4,5 h de procesado (en ufc/cm² y en log₁₀ (ufc/cm²)).

EVOLUCIÓN DE CONTAMINACIÓN EN MATADEROS, SALAS DESPIECE Y FÁBRICAS EMBUTIDOS

Nº muestra	MATADEROS		SALA DESPIECE PORCINO			SALA DESPIECE VACUNO			FABRICA ELABORADOS	
	GANCHO COLGADO CANAL	GANCHO COLGADO VÍSCERA ROJA	TABLA CORTE	MESA APOYO CARNES	GUANTE MALLA	TABLA CORTE	CINTA MÓVIL APOYO POSTCORTE	GUANTE MALLA	PICADORA	MESA CAÍDA EMBUTIDO FRESCO
	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)
1	0,00	0,00	1,98	2,28	0,68	1,30	1,81	2,38	2,16	1,90
2	0,00	0,00	2,24	2,39	2,09	0,87	1,74	2,24	1,72	1,70
3	0,00	0,00	2,11	2,65	2,33	1,18	1,16	2,00	2,08	1,14
4	0,00	0,00	1,95	2,79	2,60	1,14	1,25	1,82	1,70	0,85
5	0,00	0,04	1,77	2,55	2,62	1,09	1,00	1,63	1,59	0,68
6	0,00	0,15	1,58	2,18	2,60	1,11	0,99	1,54	1,37	1,06
7	0,00	0,14	1,80	2,17	2,60	1,08	1,22	1,62	1,69	1,06
8	0,00	0,25	1,94	2,15	2,59	0,95	1,14	1,64	1,93	1,09
9	0,00	0,22	2,07	2,17	2,62	1,03	1,26	1,67	2,04	1,05
10	0,00	0,20	2,11	2,14	2,64	1,05	1,24	1,75	2,00	1,02
11	0,01	0,30	2,15	2,03	2,58	1,07	1,25	1,82	1,98	0,98
12	0,01	0,35	2,18	2,02	2,56	1,13	1,36	1,77	1,92	1,05
13	0,01	0,37	2,21	2,08	2,53	1,16	1,35	1,77	1,88	1,11
14	0,01	0,35	2,22	2,10	2,50	1,19	1,41	1,75	1,92	1,12
15	0,02	0,32	2,20	2,08	2,44	1,17	1,41	1,75	1,95	1,04
16	0,02	0,30	2,19	2,01	2,41	1,14	1,39	1,73	2,00	1,09
17	0,02	0,29	2,17	2,04	2,44	1,15	1,41	1,69	2,02	1,08
18	0,02	0,27	2,18	2,04	2,41	1,15	1,40	1,65	1,98	1,11
19	0,01	0,26	2,13	1,99	2,40	1,09	1,48	1,61	1,96	1,07
20	0,04	0,29	2,10	2,03	2,35	1,06	1,53	1,60	1,96	1,12
21	0,07	0,27	2,07	2,01	2,32	1,05	1,56	1,61	1,95	1,13
22	0,07	0,27	2,08	2,00	2,29	1,04	1,59	1,61	1,96	1,08
23	0,06	0,25	2,05	1,98	2,29	1,05	1,60	1,58	1,94	1,06
24	0,06	0,27	2,05	1,95	2,29	1,05	1,59	1,60	1,96	1,11
25	0,06	0,26	2,04	1,92	2,28	1,07	1,60	1,62	1,97	1,07
26	0,06	0,25	2,02	1,98	2,25	1,11	1,64	1,65	1,99	1,10
27	0,08	0,31	2,08	2,04	2,30	1,16	1,70	1,68	2,02	1,11
28	0,07	0,30	2,09	2,08	2,32	1,20	1,74	1,70	2,03	1,12
29	0,07	0,28	2,09	2,10	2,35	1,24	1,75	1,73	2,05	1,12
30	0,10	0,28	2,07	2,14	2,39	1,26	1,77	1,75	2,07	1,13
PROME	0,03	0,23	2,06	2,14	2,37	1,11	1,44	1,73	1,93	1,11
DESV. s	0,03	0,11	0,14	0,21	0,35	0,09	0,23	0,18	0,16	0,21

Tabla 25: Resultados analíticos expresados en promedio acumulado (media 1 valor, media 2 valores, ... media n valores) para enterobacterias en las distintas superficies de contacto directo con el alimento a las 3,5-4,5 h de procesado (log₁₀ (ufc/cm²)).

A continuación se expresan los resultados para cada superficie en gráficos de barras.

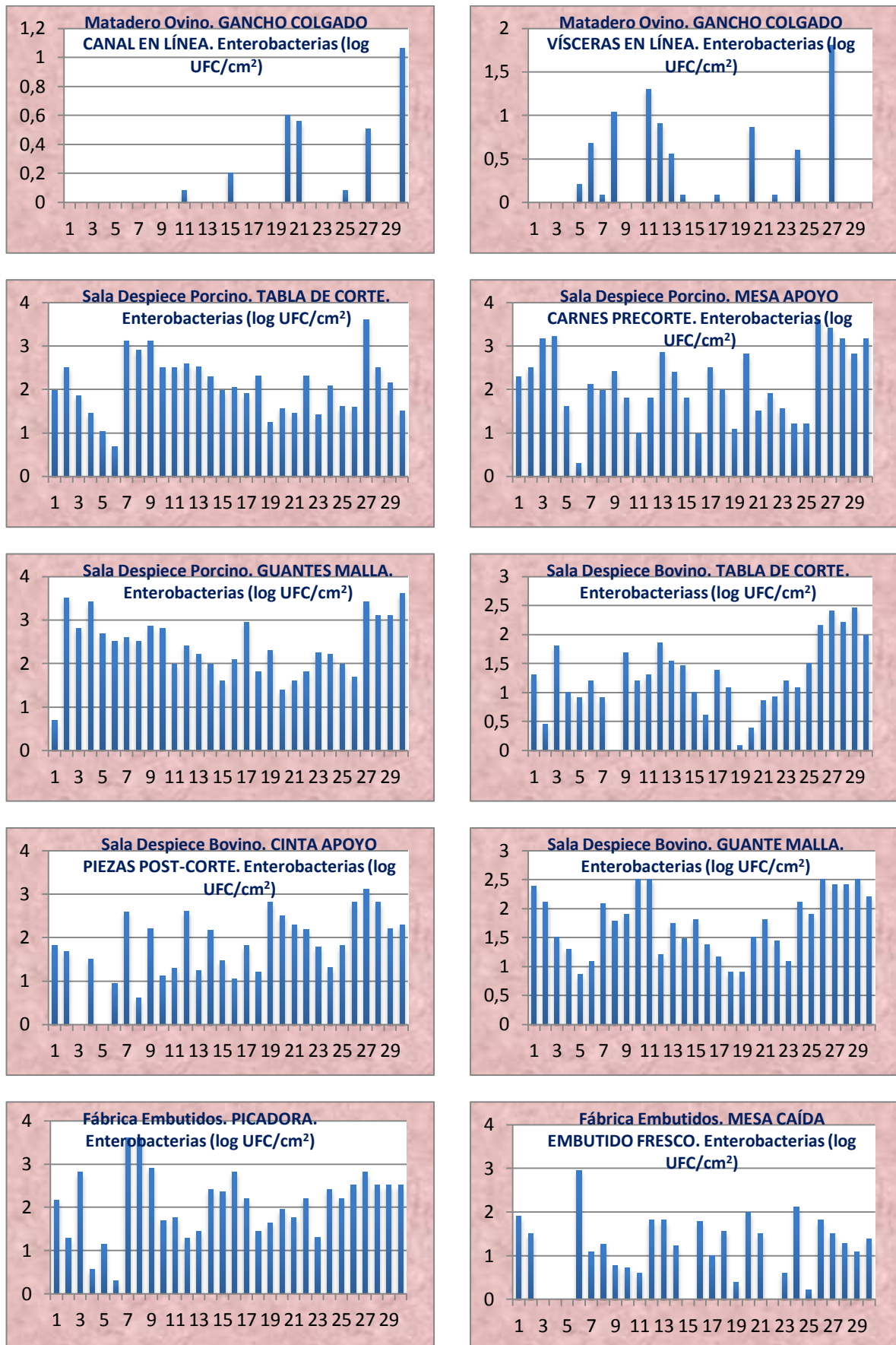


Figura 27: Representaciones gráficas de resultados analíticos para Enterobacterias para cada una de las superficies de contacto directo con el alimento evaluadas a las 3,5-4,5 h de procesado (log₁₀ (ufc/cm²)).

Ahora representamos los valores medios y desviaciones típicas de cada superficie.

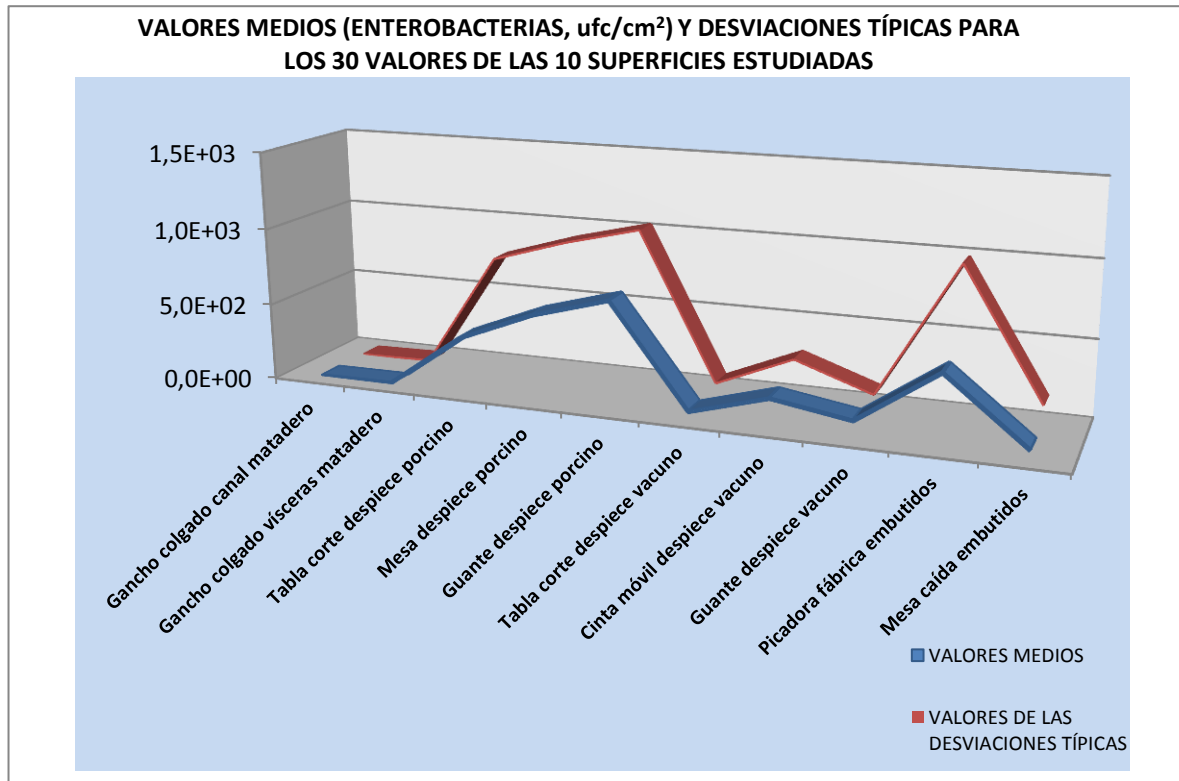
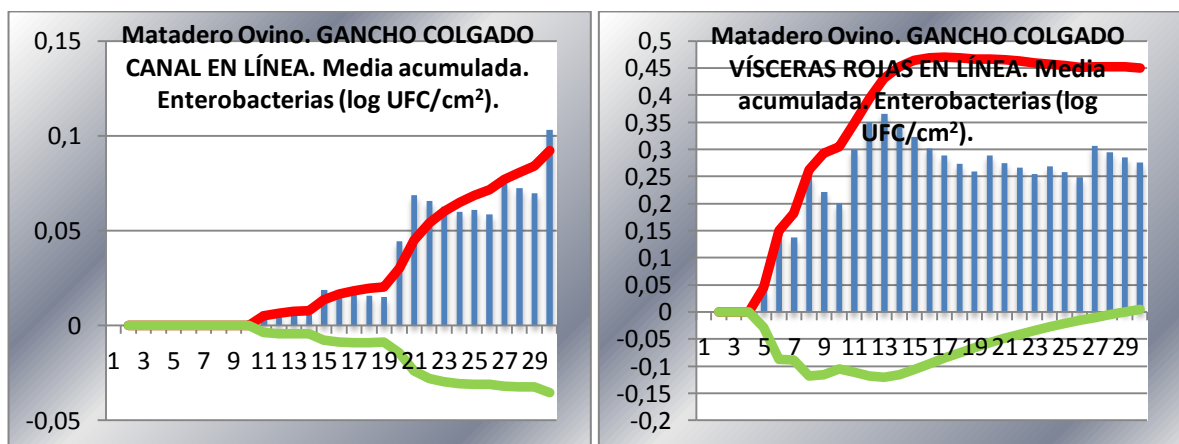


Figura 28: Representaciones gráficas de valores medios y desviaciones típicas de los 30 valores de las 10 superficies estudiadas. Enterobacterias (ufc/cm²).

Y a continuación las gráficas de valores medios acumulados, junto con el valor de valores medios más menos dos veces la desviación típica.



EVOLUCIÓN DE CONTAMINACIÓN EN MATADEROS, SALAS DESPIECE Y FÁBRICAS EMBUTIDOS

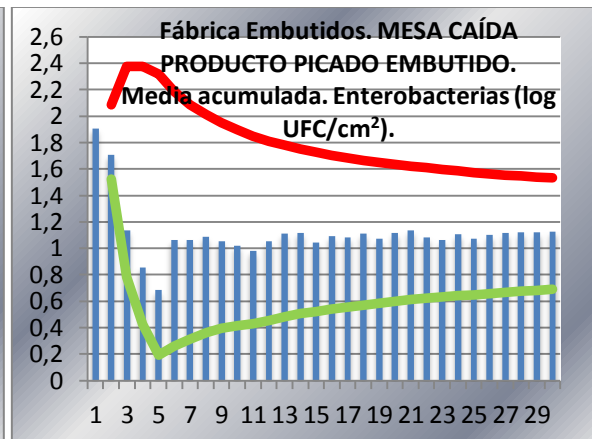
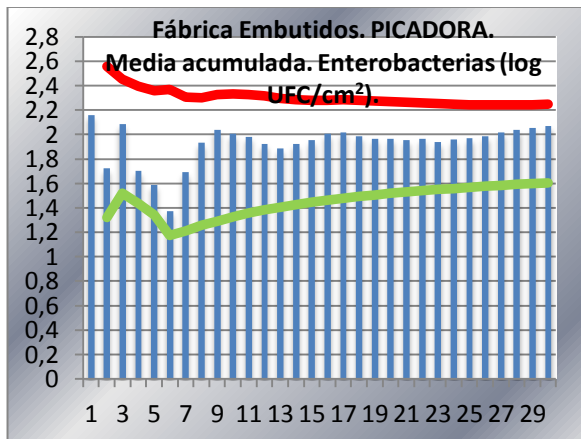
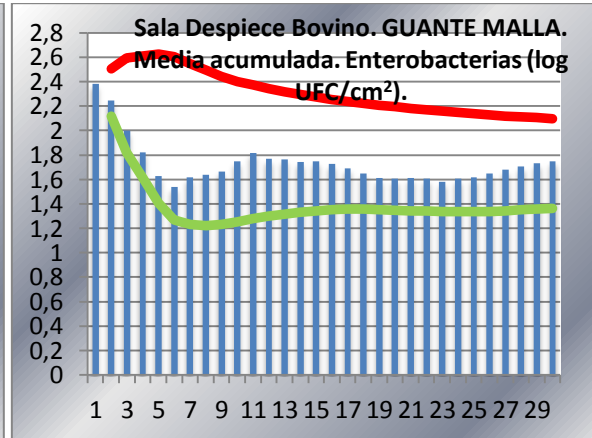
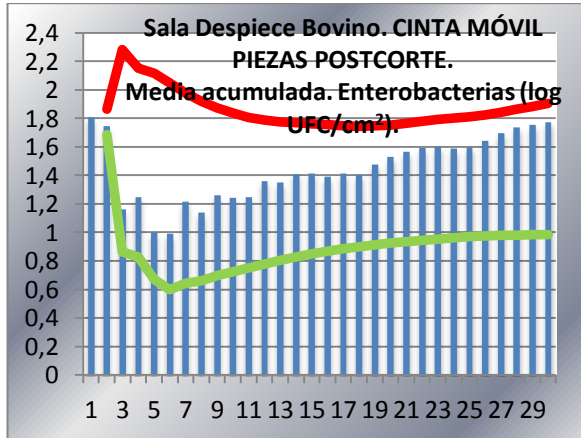
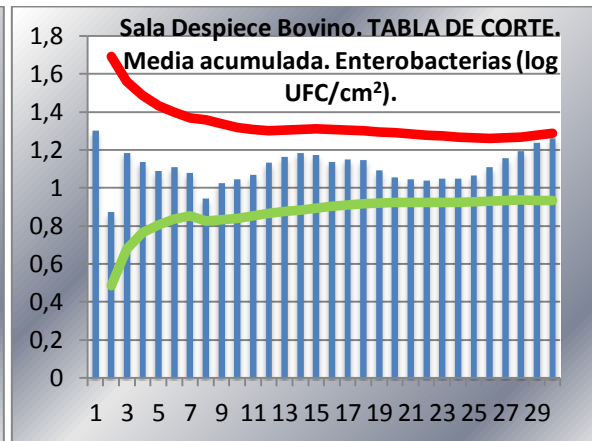
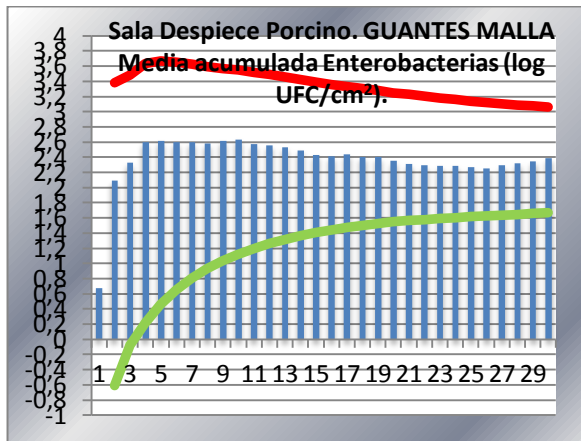
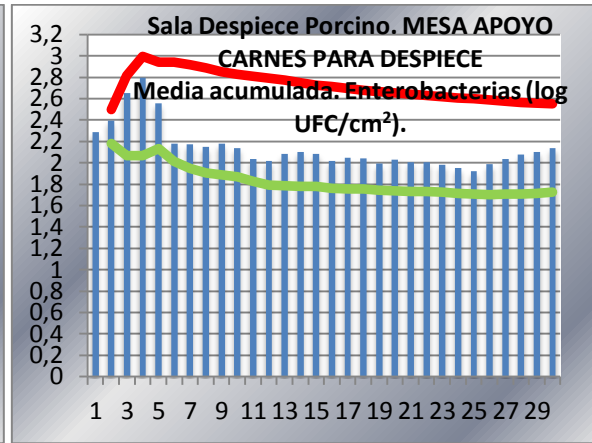
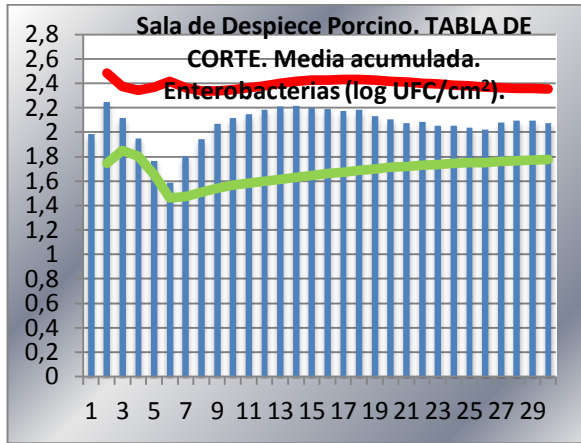


Figura 29: Representaciones gráficas de resultados analíticos, para las diez superficies de contacto en evolución evaluadas a las 3,5-4,5 h de procesado, con valores expresados en medias acumuladas (columna 1: media de 1 valor, columna 2: media de 2 valores, ... columna n: media de n valores) para enterobacterias (\log_{10} (ufc/cm²)). Línea de trazado roja: valor de la media más dos veces el valor de la desviación típica hasta cada uno de los puntos de lectura. Línea de trazado verde: valor de la media menos dos veces el valor de la desviación típica hasta cada uno de los puntos de lectura. El área entre las líneas roja y verde es el valor de la media \pm 2 veces la desviación típica. (En una distribución normal, encontraríamos en tal área el 95 % de los valores posibles).

COMENTARIOS SOBRE LOS RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN

- Los datos en general son bastante variables, salvo para las superficies estudiadas en el matadero de ovino, con valores muy bajos o nulos en todos los casos. Esto puede ser debido a distintas cargas microbianas de las carnes trabajadas en los distintos días, distintos puntos de apoyo en tablas y mesas en los distintos días y aún en cada día, etc. A causa de lo anterior, no se han eliminado datos analíticos aparentemente extremos. Además, tales datos extremos no se corresponden generalmente con un solo valor aislado de cada superficie. Podemos ver que la contaminación en tabla de corte de porcino entre valores menores de diez y unos pocos miles, la de tabla de corte de vacuno entre valores menores de uno y unos pocos cientos. Y esa es la tónica general del resto (con la excepción de los ganchos de colgado del matadero de cordero), variaciones desde valores bajos hasta unos pocos cientos o miles.

- El orden de contaminación por enterobacterias de las superficies, según valores medios, enunciado de mayor a menor, es: guante de malla de sala despiece porcino, mesa de sala de despiece de porcino, picadora, tabla de corte de sala de porcino, cinta móvil de sala de vacuno, guante de malla de sala de vacuno, mesa de caída de embutido fresco, tabla de corte de sala de vacuno, gancho de colgado de vísceras rojas y gancho de colgado de canales. Así, los resultados de contaminación existente a las 3,5-4,5 h de procesado en el matadero de ovino son los más bajos de todos los obtenidos, con una considerable diferencia frente a cualquier otra superficie de las otras industrias. La media de datos para la superficie "gancho de colgado de canal" es cinco veces menor a la media obtenida para la superficie "gancho de colgado de víscera de roja"; ambas son superficies del matadero. Pero a su vez, la media para esta última superficie es entre 10 y 170 veces menor que el resto de superficies de las otras empresas. Es decir, por tanto, la superficie del gancho donde se cuelga la canal de cordero, se contamina, para el caso de enterobacterias, entre 50 y 850 veces menos que el resto de superficies de otro tipo de industrias. Si determinamos las diferencias entre poblaciones de muestras tomadas dos a dos (30 muestras de una superficie

estudiada frente a 30 muestras de otra superficie), realizando un análisis de varianza (ANOVA), encontramos que los resultados, tanto para el gancho de colgado de canales, como para el gancho de colgado de vísceras, reflejan una diferencia significativa ($p > 0,05$) con el resto de superficies salvo para el caso de la mesa de caída de embutido fresco en fábrica de embutidos, que es, tras el gancho de colgado de canales, el gancho de colgado de vísceras, y la tabla de corte de la sala de despiece de vacuno, la superficie con menor valor medio de aerobios mesófilos de entre las estudiadas (a muy escasa diferencia de esta última). Esto corrobora lo antes mencionado, los ganchos de colgado de canales y, tras ellos, los de colgado de vísceras, son los que presentan, de modo significativo, menor carga microbiana que el resto, diferencia menor comparadas ambas con la mesa de caída de embutidos. Que en esta superficie (valor medio de enterobacterias 56,8) encontremos una diferencia no significativa ($p > 0,05$) con los ganchos de colgado y que no sea así para la tabla de corte de vacuno (valor medio 47,4), se debe a un dato bastante elevado en la mesa de caída, que hace subir la media para esta superficie (sin este resultado la media sería menor de 35), que en general presenta valores de contaminación más bajos que la tabla de corte.

- En todos los casos, salvo para los ganchos de colgado de canales y vísceras de ovino en el matadero, la situación es preocupante respecto a la carga microbiana de las superficies a media jornada, tanto si lo consideramos en función de lo requerido en normativa para superficies limpias ($< 1 \text{ ufc/cm}^2$, Decisión 2001/ 471/ CE, aplicable a mataderos y salas de despiece. Aunque se refiere en exclusiva a superficies higienizadas, podemos pensar que es un buen referente a tomar para el transcurso de la jornada), como si lo consideramos desde el punto de vista de las carnes en contacto con tales superficies durante los procesos, que recogerán parte de esa contaminación.

- Al realizar la representación gráfica ($\log_{10} (\text{ufc/cm}^2)$) de los valores medios (columna 1: media 1 valor, columna 2: media 2 valores, ... columna n: media n valores) para las diez superficies de contacto, incluyendo dos líneas de trazado, una (en rojo) resultado del valor de la media más dos veces el valor de la desviación típica hasta cada uno de los puntos de lectura, otra (en verde) resultado del valor de la media menos dos veces el valor de la desviación típica hasta cada uno de los puntos de lectura, vemos que ambas líneas tienden a confluir a medida que aumenta el número de datos representados. El área entre las dos líneas es el valor de la media ± 2 veces la desviación típica, y, en una distribución normal, encontraríamos en tal área el 95 % de los valores posibles. Es esperable por tanto que, si aumentamos el muestreo, veamos como esas dos líneas siguen confluyendo, puesto que nuestras tablas de valores para cada ítem, a pesar de la variedad en los datos obtenidos, tienden a comportarse como una distribución normal. En el caso del gráfico para el gancho de colgado de canales de ovino, el que presenta la tendencia de aproximación entre ambas líneas menos definida de todos los gráficos mostrados, ambas líneas comienzan juntas en el valor 0, para, en un momento dado, comenzar a distanciarse. Esto es

debido a que para los primeros diez datos analíticos obtenidos para esta superficie, su valor logarítmico es cero, valor que se repite de modo intercalado en otras posiciones.

2.3.2.2.2. A las 7,5-8 h de procesado y comparativa con las 3,5-4,5 h

Mostramos ahora los datos comparativos obtenidos (Tabla 26, dividida en dos partes), y sus representaciones gráficas (Figura 30, tres gráficas, Figura 31, gráfica para todos los valores contemplados en conjunto, y Figura 32, gráfica de valores medios de cada tipo de superficie) para enterobacterias, a media jornada y a final de jornada, para superficies en sala de despiece vacuno.

SALA DESPIECE VACUNO								
TABLA CORTE			APOYO POST-			GUANTE MALLA		
valor (ufc/cm ²)	valor (ufc/cm ²)	valor (ufc/cm ²)	valor (ufc/cm ²)	valor (ufc/cm ²)	valor (ufc/cm ²)	valor (ufc/cm ²)	valor (ufc/cm ²)	valor (ufc/cm ²)
3,5-4,5 h proceso	7,5-8 h proceso	INCREMENTO	3,5-4,5 h proceso	7,5-8 h proceso	INCREMENTO	3,5-4,5 h proceso	7,5-8 h proceso	INCREMENTO
1,20E+00	2,56E+02	2,55E+02	6,40E+02	4,00E+03	3,36E+03	8,00E+00	1,28E+02	1,20E+02
2,40E+00	1,28E+03	1,28E+03	3,20E+02	6,40E+02	3,20E+02	3,20E+01	4,80E+02	4,48E+02
7,20E+00	4,80E+01	4,08E+01	1,92E+02	1,28E+03	1,09E+03	6,40E+01	6,40E+02	5,76E+02
8,40E+00	1,28E+02	1,20E+02	1,50E+02	6,40E+02	4,90E+02	2,72E+01	2,56E+03	2,53E+03
1,60E+01	9,60E+01	8,00E+01	6,00E+01	4,80E+02	4,20E+02	1,20E+01	1,28E+02	1,16E+02
1,00E+01	1,00E+02	9,00E+01	9,60E+01	6,00E+02	5,04E+02	1,12E+01	1,52E+02	1,41E+02
2,56E+02	1,44E+03	1,18E+03	1,28E+03	2,56E+03	1,28E+03	2,56E+02	3,20E+03	2,94E+03
1,60E+02	2,56E+02	9,60E+01	6,40E+02	4,00E+03	3,36E+03	2,56E+02	6,40E+02	3,84E+02
2,88E+02	3,20E+02	3,20E+01	1,60E+02	1,28E+03	1,12E+03	3,20E+02	6,40E+02	3,20E+02
9,60E+01	6,40E+01	-3,20E+01	1,92E+02	8,80E+02	6,88E+02	1,60E+02	6,40E+02	4,80E+02
PROMEDIO								
8,45E+01	3,99E+02	3,14E+02	3,73E+02	1,64E+03	1,26E+03	1,15E+02	9,21E+02	8,06E+02
DESV. ST.								
111,7	516,1	489,1	380,5	1384,4	1152,3	121,9	1066,6	1035,1

SALA DESPIECE VACUNO								
TABLA CORTE			APOYO POST-			GUANTE MALLA		
log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)	log ₁₀ (valor)
3,5-4,5 h proceso	7,5-8 h proceso	INCREMENTO	3,5-4,5 h proceso	7,5-8 h proceso	INCREMENTO	3,5-4,5 h proceso	7,5-8 h proceso	INCREMENTO
0,07918	2,40824	2,329059	2,80618	3,60206	0,79588	0,90309	2,10721	1,20412
0,38021	3,10721	2,726999	2,50515	2,80618	0,30103	1,50515	2,68124	1,176091
0,85733	1,68124	0,823909	2,283301	3,10721	0,823909	1,80618	2,80618	1
0,92428	2,10721	1,182931	2,176091	2,80618	0,630089	1,434569	3,40824	1,973671
1,20412	1,98227	0,778151	1,778151	2,68124	0,90309	1,079181	2,10721	1,028029
1,00	2,00	1,00	1,982271	2,77815	0,79588	1,049218	2,18184	1,132626
2,40824	3,15836	0,750123	3,10721	3,40824	0,30103	2,40824	3,50515	1,09691
2,20412	2,40824	0,20412	2,80618	3,60206	0,79588	2,40824	2,80618	0,39794
2,45939	2,50515	0,045757	2,20412	3,10721	0,90309	2,50515	2,80618	0,30103
1,98227	1,80618	-0,17609	2,283301	2,94448	0,661181	2,20412	2,80618	0,60206
PROMEDIO								
1,3499148	2,3164105	0,96649569	2,39319561	3,0843015	0,69110589	1,7303138	2,7215615	0,99124766
DESV. ST.								
0,86	0,51	0,93	0,41	0,35	0,22	0,62	0,49	0,48

Tabla 26: Resultados analíticos para enterobacterias en las tres superficies de contacto directo con el alimento evaluadas, en los mismos días, a las 3,5-4,5 h de procesado y a las 7,5-8 h (en ufc/cm² y en log₁₀ (ufc/cm²)).

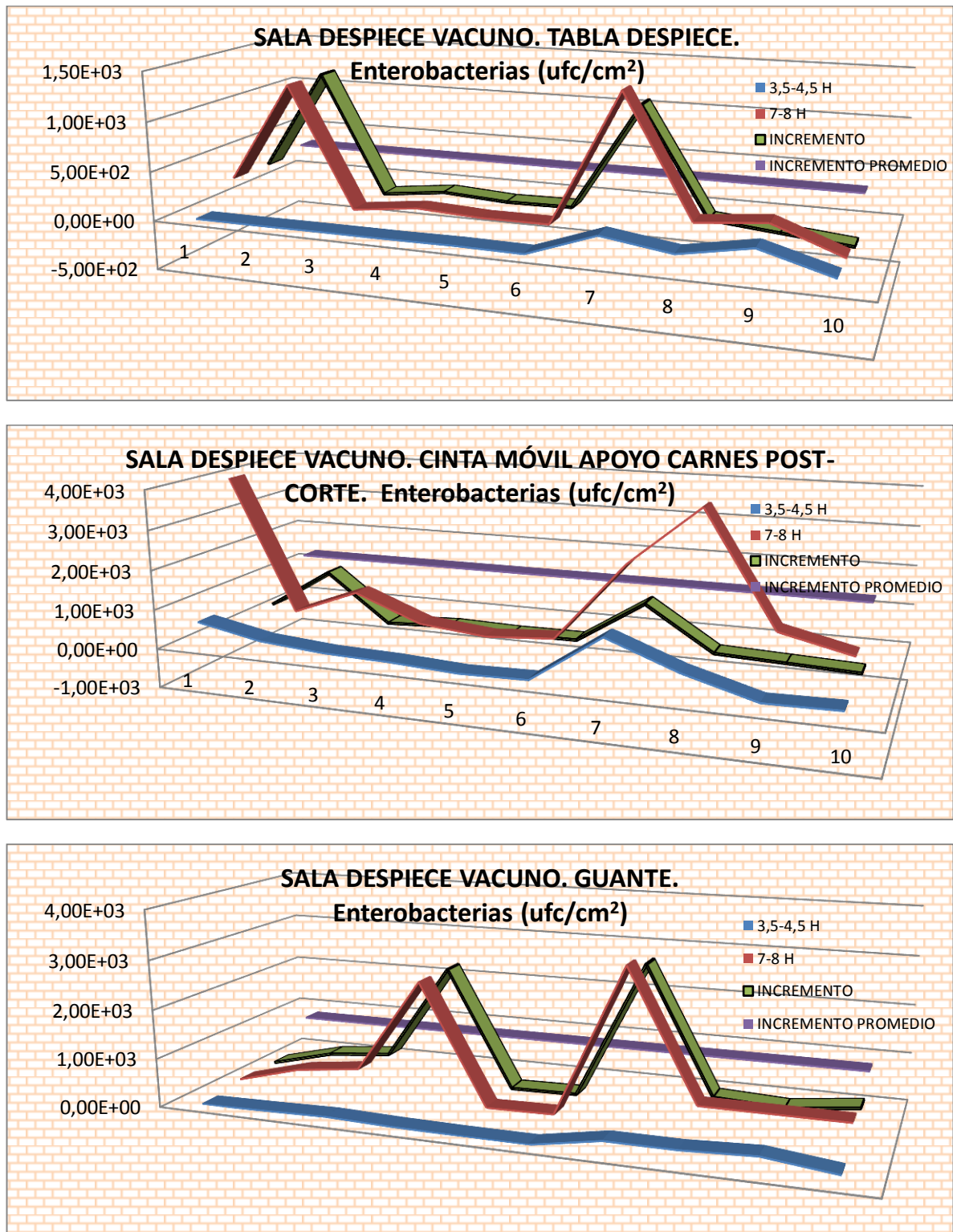


Figura 30: Representaciones gráficas de resultados analíticos, para enterobacterias, de las superficies de contacto en evolución contempladas individualmente, evaluadas a las 3,5-4,5 h de procesado y a las 7,5-8 h (\log_{10} (ufc/cm²)), e incremento reflejado en la contaminación entre los dos distintos tiempos.

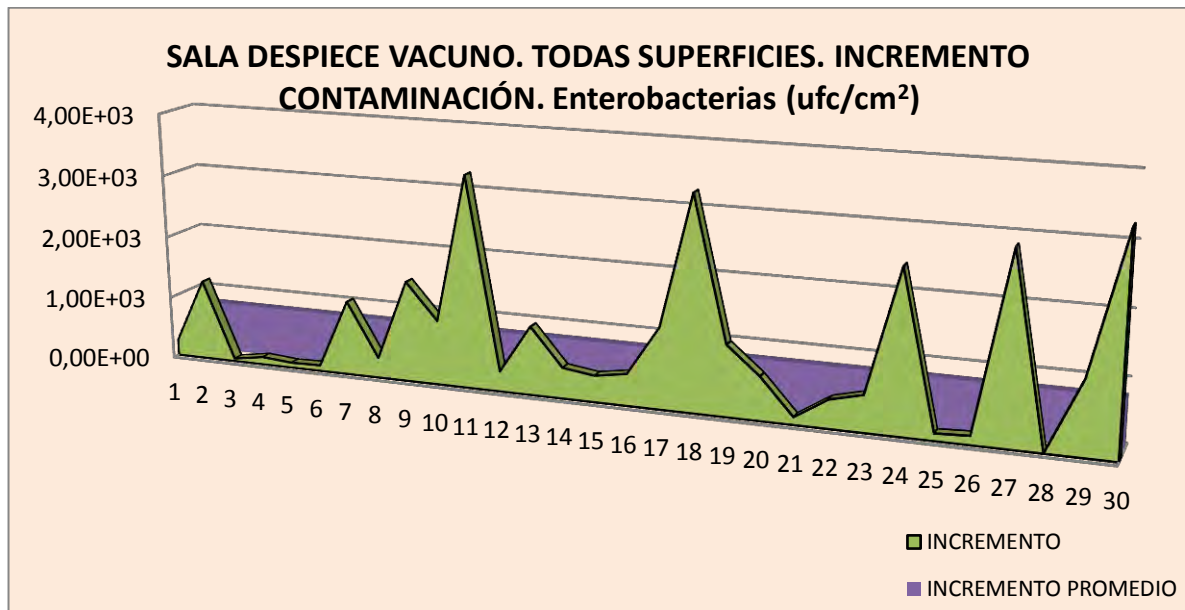


Figura 31: Representación gráfica de resultados analíticos, para enterobacterias, de las superficies de contacto en evolución contempladas en conjunto, evaluadas a las 3,5-4,5 h de procesado y a las 7,5-8 h (\log_{10} (ufc/cm²)), e incremento reflejado en la contaminación entre los dos distintos tiempos.

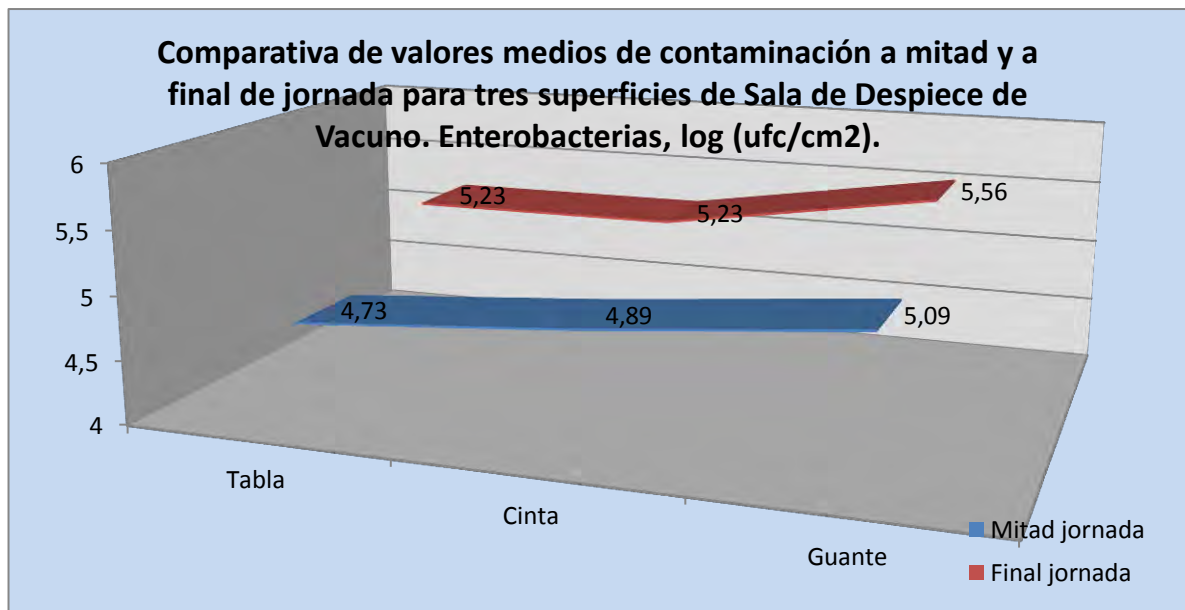


Figura 32: Representación gráfica de valores medios (enterobacterias, ufc/cm²), para las tres superficies estudiadas, a mitad de jornada y al finalizar la jornada de trabajo de la Sala de Despiece de Vacuno.

COMENTARIOS SOBRE LOS RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN

Los valores medidos son significativamente diferentes en todos los casos (tabla de despiece, cinta móvil y guante) entre las columnas de 3,5-4,5 y 7,5-8 h ($p < 0,05$). Es decir, cuando tomamos muestras de las mismas superficies a media jornada y al finalizar la jornada, la contaminación de

enterobacterias aumenta de tal modo que las diferencias se hacen muy significativas entre ambas tandas de muestras, la contaminación va creciendo con el tiempo de modo altamente considerable. El incremento de la contaminación entre las distintas bandas horarias está próximo a 1 unidad logarítmica en el caso de la tabla de corte y el guante de malla, y es de 0,7 unidades logarítmicas en el caso de la cinta móvil. Observado en valores promedio absolutos, el crecimiento microbiano al final de jornada es de 4,7 veces su valor a mitad de jornada para la tabla de corte, de 3,4 veces para la cinta móvil y de 7 veces para el guante de malla. No obstante, como puede observarse de los gráficos y analizando todos los datos numéricos, los valores de incremento no son homogéneos entre sí dentro del mismo tipo de superficie; hay una considerable variabilidad. Aunque se ha intentado tomar cada muestra, a mitad de jornada y al finalizar la jornada, de la misma zona, tales zonas no siempre siguen acumulando del mismo modo contaminación. Esto puede ser debido, en el caso de las tablas y la cinta móvil, a que las carnes se apoyan a veces más en un sitio, a veces más en otro, de modo aleatorio, durante el transcurso de la jornada, y, en el caso del guante, a que periódicamente diminutos fragmentos de carnes se adhieren a los intersticios de la malla, fragmentos que al azar pueden desprenderse, modificando la carga orgánica de las distintas zonas del guante.

2.3.2.3. *Listeria monocytogenes*

EMPRESA, Nº MUESTRAS Y TIPO DE SUPERFICIES EVALUADAS	Presencia	Ausencia
MATADERO OVINO		
15 ganchos colgado canal en línea	0	15
15 ganchos colgado vísceras en línea	0	15
SALA DESPIECE PORCINO		
15 tabla de despiece	1	14
15 mesa apoyo carnes antes de despiece	0	15
15 guante metálico	0	15
SALA DESPIECE BOVINO		
15 tabla de despiece	1	14
15 teflón móvil apoyo carnes tras despiece	1	14
15 guante metálico	0	15
FABRICA EMBUTIDOS		
15 picadora	0	15
15 mesa caída embutido fresco)	1	14

Tabla 27: Resultados analíticos para *Listeria monocytogenes* en las distintas superficies de contacto directo con el alimento evaluadas a las 3,5-4,5 h de procesado (presencia/ ausencia).

COMENTARIOS SOBRE LOS RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN

La presencia de *Listeria monocytogenes* ha sido muy esporádica en nuestro estudio, únicamente hay un 2,66 % de positivos en las muestras evaluadas en los distintos días. Se corresponde con tres elementos de polietileno de alta densidad (2 tablas de despiece y un teflón de engranajes móvil para apoyar y transportar la carne despiezada) y una mesa de inoxidable a la que caen embutidos recién salidos de la tolva de embutición. Aunque los positivos son muy pocos y el margen para la explicación del origen de causas es por tanto reducido al no contar con suficientes casos, hay que considerar que en las tablas de corte de material plástico se ocasionan hendiduras al contactar con los cuchillos durante los despieces. Estas hendiduras son difíciles de limpiar por métodos tradicionales de espumado, y pueden constituirse en un reservorio de distintos microorganismos.

2.3.2.4. Salmonella

EMPRESA, Nº MUESTRAS Y TIPO DE SUPERFICIES EVALUADAS	Presencia	Ausencia
MATADERO OVINO		
15 ganchos colgado canal en línea	0	15
15 ganchos colgado vísceras en línea	0	15
SALA DESPIECE PORCINO		
15 tabla de despiece	0	15
15 mesa apoyo carnes antes de despiece	0	15
15 guante metálico	0	15
SALA DESPIECE BOVINO		
15 tabla de despiece	0	15
15 teflón móvil apoyo carnes tras despiece	0	15
15 guante metálico	0	15
FABRICA EMBUTIDOS		
15 picadora	0	15
15 mesa caída embutido fresco)	0	15

Tabla 28: Resultados analíticos para *Salmonella* en las distintas superficies de contacto directo con el alimento evaluadas a las 3,5-4,5 h de procesado (presencia/ ausencia).

COMENTARIOS SOBRE LOS RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN

-No se ha obtenido ningún valor positivo para el parámetro *Salmonella* en las superficies de contacto muestreadas (sobre 100 cm²).

2.4. Resultados del control analítico de manipuladores en matadero de ovino

Tras los resultados obtenidos en el periodo de observación durante el desarrollo de los procesos, y dada la imposibilidad de lavar finalmente las canales de cordero con agua clorada, en nuestro estudio, se decidió, de acuerdo con el responsable del matadero, llevar a a cabo una serie de determinaciones analíticas de manipuladores empleados en el desuello de los corderos para intentar evaluar cómo minimizar los riesgos observados, según apreciación visual, en la manipulación de las canales. Habitualmente, en las industrias la productividad prima, por ello los manipuladores del desuello no lavaban sus manos con agua y jabón antes de 15 minutos de manipulación continuada. Este lavado implica dejar la operativa, acudir al lavabo más próximo (en este caso no más de 2-3 metros), lavarse con jabón, secarse, retornar al puesto y posicionarse. Es decir, emplear un tiempo en ningún caso inferior a 1 minuto. En otras palabras, pérdida aproximada de un 7 % de productividad con la frecuencia de lavado indicada, por lo que es una operación que difícilmente puede establecerse como norma con mucho menor intervalo de tiempo.

Con estos antecedentes se llevan a cabo, en dos días distintos, evaluaciones analíticas de manos según dos opciones: la primera tomando muestras de manos justamente antes del lavado una vez transcurridos 15 minutos de trabajo en desuello desde el último lavado de manos, la segunda opción consiste en el muestreo transcurridos 15 minutos desde el último lavado, pero realizando, cada 2-3 minutos de trabajo, enjuagues intermedios de manos exclusivamente con agua caliente (45-50°C) clorada a 1 ppm, y sin secarse después (esto no es problemático para continuar con la operativa de trabajo) .

La toma de muestras, sobre dos manipuladores en dos días distintos, se realiza mediante hisopado. Se presentan en Tablas 23 y 24 los resultados gráficos comparativos.

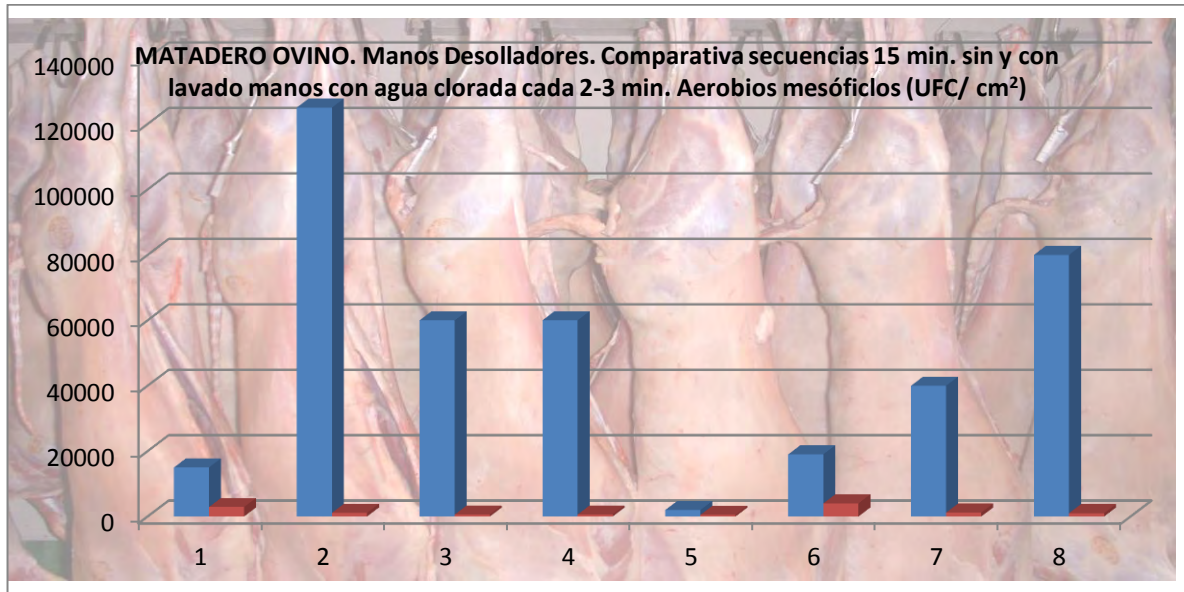


Figura 33: Resultados comparativos de evaluación analítica de manos en la manipulación de corderos durante el desuelle en mataderos, para Aerobios mesófilos. En azul resultados tras lavado una vez transcurridos 15 minutos de proceso. En rojo resultados tras el mismo periodo pero estableciendo enjuagues de manos intermedios cada 2-3 minutos con agua clorada (1 ppm) a 45-50 °C. Cada pareja de barras de distinto color corresponde a un análisis concreto con y sin lavados de manos intermedios.

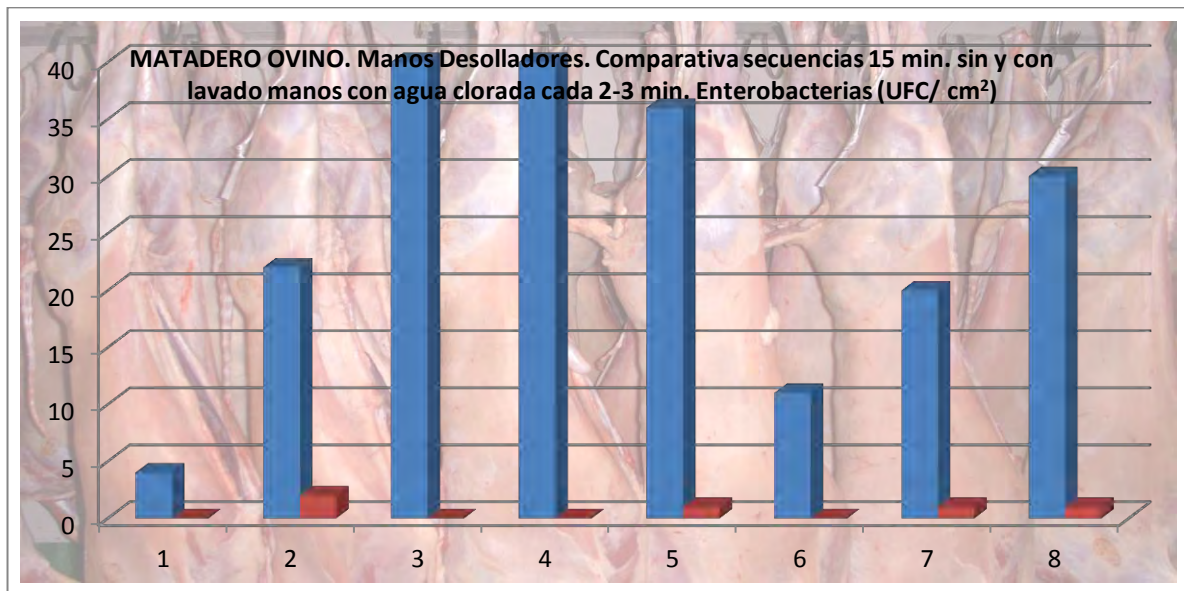


Figura 34: Resultados comparativos de evaluación analítica de manos en la manipulación de corderos durante el desuelle en mataderos, para enterobacterias. En azul resultados tras lavado una vez transcurridos 15 minutos de proceso. En rojo resultados tras el mismo periodo pero estableciendo enjuagues de manos intermedios cada 2-3 minutos con agua clorada (1 ppm) a 45-50 °C. Cada pareja de barras de distinto color corresponde a un análisis concreto con y sin lavados de manos intermedios.

COMENTARIOS SOBRE LOS RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN

Como puede observarse de los dos gráficos anteriores, el descenso en la contaminación del manipulador es tan categórico al efectuar el lavado de manos según la nueva metodología ensayada (promedios de descenso de contaminación de aerobios mesófilos del 97%, y del 97,5% para enterobacterias), que esta medida es implantada de inmediato en el matadero por parte de sus responsables. Para facilitar el lavado frecuente de manos con agua caliente clorada se instalan una serie de mangueras aéreas (hasta llegar con la boquilla a medio metro del suelo para evitar salpicar durante el lavado a las canales en proceso colgadas) junto a los puestos de los desolladores. Esta proximidad hace que el tiempo que se pierde en el enjuague de manos no sea superior a 12-15 segundos. Por tanto, y aunque finalmente el lavado se implanta cada 4-5 minutos en lugar de cada 2-3 minutos (tiempos ensayados inicialmente), con una pérdida de tiempo adicional total de unos 40 segundos cada 15 minutos, la posibilidad de contaminación cruzada por parte de los manipuladores queda ampliamente reducida.

2.5. Discusión

Las enfermedades transmitidas por alimentos constituyen uno de los problemas sanitarios más comunes y de mayor impacto sobre la salud de las personas en el mundo. Afectan principalmente a la población vulnerable y traen consigo perjuicios, no solo para la salud humana, sino también para el comercio, el turismo y el sector agroindustrial. El control de superficies de instalaciones, equipos y útiles es considerado como una herramienta fundamental para la gestión de la seguridad alimentaria por parte del operador económico, ya que facilita la comprobación de la eficacia en la ejecución de los programas de limpieza y desinfección y permite al gestor anticiparse a futuros problemas alimentarios (Caballero Torres y Lengomín Fernández, 1998).

De este modo se contribuye a garantizar la idoneidad de los procedimientos de trabajo definidos en el Plan de Limpieza y Desinfección (L+D), pre-requisito del Plan APPCC dentro del Sistema de Autocontrol de la industria alimentaria, y, en caso de desviación en los resultados, a orientar hacia la imposición de acciones correctoras.

2.5.1. Análisis visual de las superficies de trabajo.

2.5.1.1. Antes de los procesos de trabajo (sobre superficies limpias y desinfectadas)

Para mantener una vigilancia continua, y evitar incurrir en gastos analíticos excesivos, la percepción visual simple de superficies de trabajo en la industria cárnica, una vez higienizadas las instalaciones, puede resultar una buena aproximación para conocer si las actividades de limpieza y desinfección se están llevando a cabo de un modo razonablemente riguroso. Son no obstante imprescindibles, con cierta frecuencia (que dependerá de la fiabilidad de la aplicación del Plan de Limpieza y Desinfección en cada empresa), la realización de evaluaciones analíticas para verificar la idoneidad de las instalaciones ante el inicio de las operaciones de producción de alimentos, pues cierta contaminación residual o la presencia de biofilms no serán percibidas visualmente y se constituirán en un potencial peligro para los alimentos producidos.

Los biofilms consisten en comunidades de microorganismos primarios viables y no viables protegidos por sustancias poliméricas extracelulares (EPS) polianiónicas fijadas a la superficie. Las EPS pueden contener polisacáridos, proteínas, fosfolípidos, ácidos nucleicos, ácidos teicoicos y otras sustancias poliméricas hidratadas con un porcentaje de agua entre el 85 y el 95%. Las EPS previenen a los microorganismos que forman el biofilm contra agentes antimicrobianos, pues protegen ante el acceso de biocidas, secuestrantes metálicos y toxinas, evitan la deshidratación, refuerzan la resistencia del biofilm al estrés ambiental, y permiten a los microorganismos capturar los nutrientes. La sinergia existente dentro de la comunidad del biofilm, es el factor que permite que éste soporte condiciones adversas y pueda sobrevivir (Navia, 2010).

El control visual previo al inicio de las operaciones de producción de alimentos, conocido en el ámbito empresarial como Control Preoperativo de la Higiene, e integrado en el denominado Plan Normalizado de Control de la Higiene (PNCH), es de aplicación habitual en las industrias cárnicas españolas desde hace más de una década, coincidiendo con la exigencia de las autoridades veterinarias, influenciadas a su vez por los requisitos estadounidenses para exportación de alimentos a aquel país (el PNCH proviene de la solicitud de la FDA -Food and Drug Administration- de EEUU) (Berga y Martín, 2009). Consiste en la revisión visual de las superficies de trabajo, especialmente de aquellas que contactarán directamente con los alimentos, o de las sospechosas de influir directamente sobre los alimentos (por ejemplo techos que pueden desprender gotas de condensaciones, cascarilla u otras sustancias contaminantes).

Es sin embargo dudoso, a la vista de lo que hemos observado en nuestras inspecciones durante el desarrollo del presente trabajo, que tal revisión preoperativa se lleve a cabo rigurosamente, quizá porque en las PyMEs cárnicas es realizada por personal encargado de la producción, que suele tener como su mayor objetivo la productividad. Que un Encargado de Producción dé importancia a una deficiencia de limpieza hallada en un control preoperativo, requiere que ocupe a su personal para proceder a la higienización correcta antes del inicio de los procesos. En otras palabras, eso significa que no podremos comenzar a producir según lo previsto en un equipo o sección, soportando la demora correspondiente, algo difícil de asumir en el ámbito empresarial. Este personal encargado no ha sido en general escrupulosamente formado para realizar una inspección preoperativa comprendiendo los riesgos que para los productos significa la existencia de deficiencias. Esta deficiencia de formación y de concienciación se detecta en la supervisión de los registros preoperativos de las seis empresas evaluadas en este estudio (sin incidencias de limpieza reflejadas en dos meses); en una de ellas ni siquiera se lleva a cabo una inspección preoperativa documentada. Por tanto, de acuerdo con el sistema APPCC, hay un incumplimiento de la formación del personal, lo que indudablemente influirá en el resto de procesos preventivos, al desconocerse puntos clave. Es importante destacar los errores relativos al porqué de los procesos de higiene o de manipulación, pues esto afectará a la seguridad del producto y a la calidad de los alimentos elaborados.

En cuanto a la evaluación en sí, el porcentaje de superficies sucias de contacto directo con alimentos observadas visualmente en nuestro estudio antes del inicio de los procesos de producción, el 7,14 %, no dista en exceso del porcentaje de las evaluadas como sucias mediante analítica microbiológica tras toma de muestras con hisopo (para los parámetros aerobios mesófilos y enterobacterias, con un 13,83 % y un 3,72% de superficies incorrectas respectivamente). Hay que considerar que la apreciación de una superficie higienizada que tenga contaminación es difícil de percibir por debajo de los límites últimos indicados en las tablas de resultados de aerobios mesófilos y enterobacterias (que son los límites establecidos legalmente para superficies higiénicas de mataderos y salas de despiece). La evaluación visual y la evaluación analítica no se han llevado a cabo además en los mismos espacios temporales, es decir, no se han analizado las superficies concretas referidas en la apreciación visual.

Una mejor aproximación que la apreciación visual simple es la realizada tras la aplicación de un spray “revelador”, en nuestro caso el producto “Biofinder”, de la casa Itram. Dicho spray permite evaluar con mayor rigor las superficies de trabajo, y ha mostrado ser especialmente diferencial en la valoración de las superficies plásticas blancas, donde se realizan cortes de carne, pues, aunque visualmente limpias, pueden permanecer biofilms o microorganismos aislados en el

rayado ocasionado por el contacto con el filo del cuchillo, aunque tales rayas sean totalmente superficiales. La aplicación del spray nos ha permitido calificar como superficies mal higienizadas las tablas de corte en ocasiones en que aparecían visualmente como correctas.

Se ha localizado, empleando el spray mencionado, un porcentaje de superficies de contacto directo con alimentos mal higienizadas del 9,38%, por encima del valor apreciado mediante observación a simple vista, con un diferencial que se refiere casi en exclusiva a los resultados comentados sobre tablas de polietileno para corte de carnes.

Adicionalmente, el spray "Biofinder" es un complemento muy útil para la concienciación, pues es una herramienta que revela aquellas superficies mal higienizadas, y sirve por tanto para mostrar ejemplos tangibles de deficiencias a encargados de producción y al personal de limpieza de las industrias.

A la vista de las observaciones de percepción visual (corroboradas como se ha comentado por porcentajes no muy alejados al evaluar las superficies mediante muestreo con hisopos) sobre superficies limpias que contactarán con los alimentos, puede concluirse que, si bien la limpieza no es calificable rotundamente como mala, sí que en algunos casos concretos es mejorable. Es necesario poner especial atención en aquellas superficies que no son de acero inoxidable, en concreto en las tablas para corte de polietileno de alta densidad y, en el caso del matadero de porcino, en las lamas de pelado.

Además, debe establecerse como norma vigilada el secado completo de las superficies para evitar riesgos innecesarios asociados al crecimiento de posibles remanentes microbianos. Tal secado no es una circunstancia, hoy por hoy, en absoluto asegurada en las industrias evaluadas en nuestro estudio.

Por otra parte, la higienización de elementos no afectos a la operativa general de limpieza diaria realizada mediante manguedo y espumado (cuadros de luz, enchufes, pulsadores de luz y cables, tuberías y conducciones altas, techos, partes bajas de máquinas, pulsadores de estas, manillas de puertas, etc), para los cuales es preciso emplear procedimientos de limpieza más "domésticos", tales como bayetas y estropajos, no está en general suficientemente programada a nivel documental, ni se efectúa con adecuado rigor, tal y como hemos detectado. Ninguna de las empresas ha realizado nunca un estudio sobre la frecuencia de los contactos con estos elementos por parte de los trabajadores sin que laven sus manos antes de contactar posteriormente con los alimentos sin envasar. En consonancia con nuestras observaciones, Navia (2010) indica que en la mayoría de las industrias alimentarias, las superficies de contacto con los alimentos son higienizadas diariamente, sin embargo muchas otras superficies como los tanques de

almacenamiento y los exteriores de las bombas, paredes y techos no presentan un plan de limpieza efectivo. Estos aspectos generan una oportunidad para la formación de biofilms en presencia de humedad.

Incluso, como se ha comentado, en algunos elementos sometidos a limpieza diaria, su naturaleza o su estado de conservación pueden resultar problemáticos, como es el caso de algunos suelos, inicialmente impermeables, que con el transcurso del tiempo devienen en permeables y potencial lugar de residencia de biofilms bacterianos.

Como se ha indicado en la revisión bibliográfica, hay una serie de recubrimientos de superficie en estudio, y otros ya técnicamente comprobados, que aportan protección a las superficies convencionales frente a la contaminación o proliferación microbiana. Es posible, y a un tiempo conveniente, que las PyMEs cárnicas evalúen posibilidades de incorporación de superficies tecnológicamente mejoradas en sus instalaciones.

Por otra parte hay elementos que, a causa de su elevada humedad y de la carga microbiana que les llega, suponen un riesgo importante como puntos de reservorio de biofilms. El ejemplo más claro en este tipo de industrias y en la práctica totalidad de empresas alimentarias, es el de las rejillas de los desagües, en algún caso no limpiadas a diario con excesivo rigor.

Sería prudente por tanto llevar a cabo una mejora general de las actividades de limpieza y desinfección en las PyMEs del sector cárnico. Esta mejora bien podría orientarse vía formación, pues el personal que se dedica a la limpieza de las instalaciones no está especialmente entrenado en conceptos de higiene alimentaria. Puede decirse que este personal realiza la operativa de limpieza y desinfección de un modo mecánico, que no carece de cierta eficiencia, pero el conocimiento de la existencia de microorganismos y sus modos de asociación en biofilms, y la importancia que tiene el eliminarlos para proteger a los alimentos y a sus consumidores, puede favorecer la concienciación de las personas respecto a la importancia de la adecuada higienización de las instalaciones, equipamiento y útiles de trabajo.

2.5.1.2. Análisis visual de las superficies en contacto con alimentos durante los procesos de producción

Las buenas prácticas de limpieza y desinfección en las empresas de elaboración de carnes y productos cárnicos nos permiten abordar las producciones de modo sanitariamente seguro. Pero esta preocupación, que se examina con frecuencia de modo interno vía registros preoperativos (aunque no es evidente el rigor con que se llevan a cabo) y mediante análisis microbiológicos

periódicos, y que además es exigida por clientes (auditorías) o inspecciones oficiales, es insuficiente. Con el transcurso de la jornada diaria trabajamos sobre superficies sucias de modo continuo, con lo que la escrupulosa preocupación por la asepsia de superficies en el inicio, carece de sentido si no va acompañada por una vigilancia posterior y una sistemática que permita regenerar la limpieza de tales superficies.

Es completamente evidente, como hemos constatado, que una buena parte de las superficies de trabajo con carnes y productos cárnicos acumulan de modo considerable suciedad durante el periodo de actividad. Este acúmulo de contaminación se detecta tanto visualmente, mediante mera observación (gotas de sangre que van convirtiéndose en charcos, tablas de despiece que van oscureciendo y quedando pringosas y manchadas de sangre, etc.) o empleando el spray “Biofinder” (intensísimo burbujeo de espuma blanca), como llevando a cabo análisis microbiológicos, que han revelado una elevadísima carga de aerobios mesófilos con el transcurso de la jornada de trabajo, una considerable carga de enterobacterias en muchos casos, y la posible eventual presencia de *Listeria monocytogenes*, como vemos al evaluar los resultados analíticos sobre estas superficies.

Se ha detectado que las pocas rutinas establecidas para la higienización de superficies durante los procesos en las PyMEs del sector estudiadas, generalmente limitadas al cambio de cuchillos a media jornada o al secado, en algún caso, de mesas con papel desechable (sin limpieza propiamente dicha ni desinfección), no siempre se cumplen. Es necesario respetar estas rutinas tanto como introducir otras, como por ejemplo, dar la vuelta a las tablas de corte a media jornada, cambiar los guantes de malla a media jornada, desinfectar mediante pulverización algunas superficies tras secado con papel desechable, u otras medidas similares de escasa implicación de tiempo, y por tanto fácilmente realizables.

Es pues una necesidad de las PyMEs del sector cárnico llevar a cabo las indagaciones pertinentes que permitan establecer sistemas de regeneración de la higiene de las superficies de trabajo con la mayor frecuencia posible durante el transcurso de la jornada. En caso contrario, los industriales se enfrentan a una posibilidad de contaminación cruzada de sus productos cárnicos a partir de la carga microbiana traspasada por otros anteriores a las superficies de trabajo, carga que, con el transcurso del tiempo, puede además incrementarse.

2.5.2. Resultados de los análisis en laboratorio de las superficies de trabajo en contacto con los alimentos.

2.5.2.1. Resultados analíticos para superficies higienizadas.

Como se ha indicado anteriormente, el porcentaje de superficies sucias que contactarán directamente con las carnes, tras toma de muestras con hisopo, ha sido de un 13,83% para aerobios mesófilos y de un 3,72% para enterobacterias, tomando en conjunto todas las empresas estudiadas. Se consideran sucias aquellas muestras en las que, según los criterios de la Decisión 2001/ 471/ CE, aplicables a mataderos y salas de despiece, se superan los valores de 10 ufc/cm² para aerobios mesófilos y de 1 ufc/cm² para enterobacterias.

Evaluando los datos con mayor nivel de detalle, el porcentaje de muestras con resultados insatisfactorios ha sido, para aerobios mesófilos, el 17,18 % en mataderos, el 15 % en salas de despiece y el 9,37 % en fábricas de embutidos, y, para enterobacterias, el 6,25%, el 3,33 % y el 1,56 % respectivamente.

En 2006 y 2007, en evaluación de matadero y sala de despiece en Jaén (España), Gata Díaz y cols. (2007), hallaron, verificando la eficacia de los procedimientos de limpieza y desinfección, un porcentaje de resultados insatisfactorios, para el matadero, del 16%, sobre 81 muestras totales, para aerobios mesófilos, y del 21%, sobre 63 muestras, para enterobacterias. De estas superficies, la mitad aproximadamente eran de contacto directo con alimentos (otras no tenían contacto directo, como paredes o útiles de afilado). Para la sala de despiece los porcentajes de resultados insatisfactorios obtenidos fueron del 4% para aerobios mesófilos, sobre 72 muestras totales y del 7% para enterobacterias sobre 75 muestras. En este caso el 75% de los resultados aproximadamente se refiere a superficies de contacto directo con las carnes. Resulta no obstante llamativo que los autores encontraran mayor contaminación para enterobacterias que para aerobios mesófilos, esto es lo contrario de lo obtenido en nuestro estudio y lo contrario de lo constatado en otras industrias cárnicas. Estos autores concluyeron que los resultados de controles microbiológicos eran aceptables a nivel global, aunque indicaron la posibilidad de fallos durante 2006, quizá explicables por la poca eficacia en la ejecución del plan de limpieza o por la poca dedicación derivada de un exceso de trabajo en periodos de máximo sacrificio, o incluso por la escasez de mano de obra en el periodo estival (en nuestro estudio hemos evitado la toma de muestras en este periodo).

En cuanto a *Listeria monocytogenes*, sólo se ha detectado en un caso en nuestro estudio, realizando un muestreo tradicional con hisopos de 58 superficies (abarcando un área de 100 cm² por muestra). Es decir un 1,72%. El positivo corresponde a una tabla de polietileno para despiece.

Todos los resultados han sido negativos en el muestreo de 58 superficies para *Salmonella* (100 cm² por muestra).

2.5.2.2. Interpretación de resultados analíticos de las superficies en contacto con alimentos durante los procesos de producción. Puntos críticos de acumulación de contaminación en virtud de tales análisis y de las percepciones visuales.

2.5.2.2.1. Interpretación general

Como puede observarse en la exposición de los datos analíticos obtenidos, aunque en casi todos los casos se da un acúmulo considerable de contaminación microbiológica durante el procesado de carnes y embutidos, los datos son bastante variables.

En esta variabilidad puede influir, en gran medida, la calidad microbiológica de las carnes de partida, influenciada tanto por las condiciones de obtención (los proveedores en cada caso son a menudo distintos) como por el tiempo transcurrido desde el sacrificio del animal (en la sala de despiece de porcino las carnes que se despiezan pueden tener de 1 a 4 días desde sacrificio del animal, en la sala de despiece de vacuno las carnes que se despiezan pueden tener de 5 a 10 días desde sacrificio, y en fábrica de embutidos la carnes pueden tener entre 1 y 5 días desde el despiece). También puede influir la zona del útil/ equipo de donde se tome la muestra. Aunque se ha procurado mantener las mismas zonas de hisopado en los distintos días, hay elementos, como por ejemplo la cinta móvil de la sala de despiece de bovino, para los que resulta difícil identificar la misma zona en los distintos muestreos, y además sería irrelevante, pues la contaminación no se reparte de modo similar, ya que las piezas cárnicas no caen siempre en los mismos sitios de esta cinta cada día. Tampoco se trabaja exactamente sobre los mismos sitios cada día en las tablas de corte del despiece. Por otra parte, para el caso de la mesa de caída de productos picados recién embutidos, además de la microbiología propia del producto (hay masas que, a causa de rotura de la tripa contactan eventualmente con la mesa), influirá la calidad microbiológica de la tripa empleada ese día.

Por todo ello, de los resultados analíticos obtenidos, no hemos considerado oportuno eliminar casos extremos, pues además, en general los casos extremos no se corresponden con datos aislados, sino con más de un dato dentro de un rango de valores alejado de la media.

Lo anterior sugiere que son precisas futuras investigaciones para, entrando en detalle de fechas de los productos de partida y de los distintos proveedores de canales cárnicas o carnes, obtener información de la evolución de contaminación en cada caso y en cada tipo de empresa.

Por otra parte, hay probabilidad de un más que notable crecimiento de la contaminación superficial con el paso del tiempo en las superficies de trabajo con carnes, como se ha constatado en nuestro caso para la sala de despiece de vacuno, evaluada a las 3,5-4,5 h frente a las 7,5-8 h, es decir, a media jornada y al finalizar la jornada. Este aumento de carga puede ser debido tanto a la acumulación reiterada de contaminación sobre las superficies al colocar nuevas piezas cárnicas (o contactar eventualmente con ellas, caso del guante de malla), como al crecimiento en sí en el tiempo de la flora microbiana de tales superficies (a pesar de que la sala se encuentra siempre a un máximo de 11-12 °C), o, como parece más probable, a la acumulación de ambas circunstancias.

Es preciso también destacar que no se ha hallado contaminación por *Salmonella* en ninguna de las muestras estudiadas y que el porcentaje de positivos por *Listeria monocytogenes* es muy bajo (2,66 %). Como se indica en la revisión bibliográfica, Martín y cols. (2011) encuentran un 11% (10 de 85 muestras) de positivos para este microorganismo en superficies de contacto directo e indirecto en industrias de elaboración de fuet de Cataluña. Gudbjörnsdóttir y cols. (2004), a las dos horas de proceso en ocho industrias cárnicas y cinco de pescado, observan un 14,9% de positivos, y Bouvet y cols. (2002) detectan presencia de *Listeria monocytogenes* en el 25% de las muestras de superficies a las 2 h de proceso y en el 20% a las 6 h en tres plantas francesas de despiece de cerdo.

A pesar, como se ha dicho, de la necesidad de investigaciones adicionales concretando algunos parámetros relativos a productos y tiempos, en el ánimo de este estudio estaba obtener información, para poder proporcionarla a las empresas y a las PyMEs del sector, acerca de la evolución de la contaminación en las superficies de trabajo que no fueren de un solo uso en la jornada (como ocurre con las cajas o carros de volcado de carne, por ejemplo) y que no se higienizaran o cambiaran con regularidad (como sucede por ejemplo con los cuchillos de corte). Independientemente pues de que los resultados hayan sido bastante variables, la información obtenida, tanto visual como analíticamente, nos permite establecer con nitidez algunas conclusiones, que abordaremos a continuación.

Por último resaltar que, en nuestro caso, hemos empleado un método tradicional de recogida de muestras, el hisopado (según Norma de referencia UNE-ISO 18593: 2013), para evaluar la contaminación superficial, y que según distintos estudios, como se ha expuesto en la revisión bibliográfica, esta metodología permite tan sólo una recuperación parcial de la contaminación. Consecuentemente con esto, pensemos en que, si con nuestro sistema de recogida, los resultados analíticos obtenidos han de observarse con cierta preocupación, esta podría haber sido sensiblemente mayor de emplear técnicas actuales más resolutivas para la recogida de muestras, según distintos métodos referenciados en la revisión bibliográfica.

Pasaremos ahora a particularizar los resultados según el tipo de industria cárnica evaluada en nuestro estudio.

2.5.2.2.2. Mataderos

En cuanto al matadero de porcino, ya se ha citado que la mesa de caída de las canales tras la cuba de escaldado y las lamas de las peladoras, podrían ser, según percepción visual, los puntos más conflictivos. No se han evaluado analíticamente, en un caso, el de la mesa, porque el producto sufre inmediatamente un tratamiento de calor, y en otro, caso de las lamas, por la dificultad de acceder a su ubicación durante los procesos, con lo cual tampoco sería viable una limpieza a mitad de producción (requeriría un paro de cadena durante muchos minutos). Por otra parte el matadero sólo trabaja en jornadas de 2-3 h, con lo que finalmente las posibilidades de acumulación de contaminación se reducen considerablemente.

Dicho esto, se entiende que el principal riesgo microbiológico para las canales de porcino, una vez inspeccionado adecuadamente el proceso, se centra en eventuales roturas o desprendimientos desde el tracto intestinal durante las actividades de eviscerado.

En cuanto al matadero de cordero evaluado, no pueden considerarse como críticos los resultados obtenidos para los elementos en contacto con las canales de carne o sus vísceras rojas según resultados analíticos. La explicación puede resultar simple, el producto, canales animales, va colgado de un gancho por el tendón de Aquiles con un contacto mínimo hasta llegar a la salida de la cadena. En general para toda la canal no hay otros contactos superficiales distintos de los cuchillos o manos de manipulador, pues las operaciones son esencialmente manuales. Algo similar ocurre con las vísceras rojas, que también se conducen colgadas una vez extraídas. Las vísceras blancas se vehiculan mediante cinta de transporte con lavado en continuo. Todo ello a pesar de que, a diferencia del resto de empresas estudiadas, en las que se trabaja entre 10 y 12 °C, en el

matadero se opera a temperatura ambiente (por tanto en algunos periodos se han recogido muestras de proceso a temperaturas superiores a los 12°C). Por otra parte, el tiempo de trabajo en la jornada del matadero con esta especie animal suele oscilar entre las 3 y las 6 h, lo que limita el periodo posible de acumulación de contaminación.

Se detecta nítidamente, en virtud de una minuciosa observación visual, que los principales peligros microbiológicos para el producto recaen en el matadero de ovino, en cuanto a contactos con superficies contaminadas, sobre la citada manipulación de las canales. Las operaciones de desuello pueden conllevar, además de eventuales contactos manuales con la canal, considerando que las manos tocan también la piel del animal, contactos de la propia piel con la canal por la dificultad de mantener estrictamente situada la piel desollada en las distintas etapas, tendente a enrollarse sobre sí misma y, en ese caso, con posibilidades de contacto de la parte sucia con la carne. Esto puede ocurrir aun a pesar de la antigüedad de los trabajadores en los puestos y su elevada experiencia en el caso matadero evaluado.

Hay que considerar también la posibilidad de rotura con desprendimiento de heces desde el tracto digestivo, lo cual se controla muy correctamente en este caso.

2.5.2.2.3. Salas de Despiece

Según los resultados obtenidos en nuestro estudio, el principal problema en salas de despiece, en cuanto a superficies que en contacto con alimentos pueden acumular contaminación, son las tablas de polietileno de las mesas de corte de las piezas cárnicas, las superficies accesorias para el depósito de la carne a despiezar o despiezada y los guantes metálicos.

Los cuchillos, en ambas salas de despiece, son cambiados a media jornada, por tanto el recurso ante una posible acumulación de contaminación, ya está previamente establecido, si bien, sería sin duda más aconsejable un cambio a las dos horas de proceso.

Para el caso de los teflones y superficies de apoyo de carnes no hay en las empresas evaluadas (al igual que en otras muchas PyMEs en las que se realiza despiece, según hemos observado en otras ocasiones) costumbre alguna de lavado, cambio o vuelta de tablas de corte durante la jornada de trabajo.

Con referencia a los guantes metálicos, la carga microbiana acumulada durante la producción es muy considerable, y no hay costumbre de lavado intermedio o cambio.

2.5.2.2.4. Fábrica de embutidos

Sólo Picadora y mesa de caída de embutido fresco son propensas a acumular contaminación. Como se ha comentado con anterioridad, otros elementos son de un solo uso y, en el caso de amasadora y tolva de embutidora o la cánula de salida desde esta, las paredes se renuevan continuamente con el pegado de las masas con las que se trabaja, con lo que su contaminación será aproximadamente la de dichas masas (por ello no se ha realizado seguimiento analítico en estas superficies).

En el caso de la picadora, con recuentos elevados durante el transcurso de jornada, no se realiza en ningún momento un lavado, limpieza o desinfección parcial a lo largo del día.

Tampoco se realiza en las mesas de caída de embutido fresco, desde la cánula de embutición, ningún lavado intermedio. En este caso no obstante suele pasarse a media jornada un papel desechable para su secado (coincidiendo con el descanso del personal).

2.5.3. Posibilidad de implantación de medidas de corrección económicas y viables desde el punto de vista productivo

2.5.3.1. Matadero porcino

Dado que el principal riesgo microbiológico para las canales de porcino se centra en eventuales roturas o desprendimientos desde el tracto intestinal, es esencial llevar a cabo un amplio lavado final de la canal. La elevada temperatura de la misma (una de las fases de la producción es el escaldado a 62 °C) y el volumen de carne contenido, facilitan la rápida evaporación del agua externa, que además se sitúa en gran medida sobre la corteza, aislante, y no sobre la carne. El lavado por tanto es un recurso muy válido y necesario para este tipo de canal. Es importante que se vigile la cloración del agua de lavado y, si no va a ser usada para consumo, se mantenga entre 1 y 2 ppm para lograr una mayor eficacia (mayores concentraciones conllevarían el riesgo de carga ambiental de cloro).

En cuanto a la mesa de caída de canales tras escaldado y primera peladora, basta con retirar regularmente los restos (vello y sangre esencialmente) con una rasqueta limpia para evitar posibilidades de contaminación cruzada. Aun cuando después la canal se hornee y el proceso de sacrificio no se prolongue, es conveniente llevar a cabo esta medida, por ejemplo cada quince o

veinte minutos, pues además el tiempo necesario para ello no va más allá de unos pocos segundos. Pero aún existe una solución más eficaz y definitiva con un coste económico muy moderado: sustituir la mesa existente por otra de rodillos anchos fijos, que no podrán acumular vello y sangre (existe este modelo de mesas en catálogos de equipamiento de mataderos de porcino).

Para el caso de las lamas de las peladoras, dado que su acceso para limpieza intermedia es poco viable durante la producción (requiere el paro de durante muchos minutos de toda la línea de procesado en continuo para que quede vacía, pues en caso contrario las canales permanecerían un tiempo excesivo en el baño de escaldado de la fase anterior y se deteriorarían gravemente), es esencial que se mantengan inicialmente en buen estado de limpieza, lo cual no se ha hecho evidente con los análisis realizados sobre superficies higienizadas.

2.5.3.2. Matadero ovino

Como se ha indicado al presentar los resultados, durante el desarrollo del presente estudio, y para intentar evaluar cómo minimizar los riesgos en la manipulación de las canales de cordero durante su desuello, se llevó a cabo un ensayo con el personal operario, evaluando la contaminación de sus manos según dos distintas secuencias de trabajo: tomando muestras una vez transcurridos 15 minutos de manipulación en desuelle desde el último lavado y en el mismo periodo pero realizando, cada 2-3 minutos, enjuagues intermedios de manos exclusivamente con agua caliente (45-50°C) clorada a 1 ppm sin secarse después (así se evitaba perder más tiempo). El descenso de contaminación observado según resultados analíticos en las manos de los manipuladores fue tan elevado al trabajar según este segundo método, que la medida de mejora se implantó de inmediato en la empresa, instalando mangueras aéreas (con la boquilla a medio metro del suelo) junto a los puestos de los desolladores para favorecer su lavado frecuente con agua clorada.

Además, a un tiempo, aunque cada desollador dispone de 2 cuchillos y estos se colocan en baño de agua a 82°C cada 1-2 horas, una vez instaladas las mangueras se comenzó a enjuagarlos levemente al mismo tiempo que las manos, pues al igual que ocurre con estas, es difícil evitar la contaminación cruzada piel-cuchillo-carne de la canal. Los cuchillos se emplean, en primer lugar, para rallar la piel, en contacto directo con esta, y luego para apoyo de la operativa de desuelle, momento en que el filo pueden contactar con la carne. El cambio de cuchillos entre una y otra operación, para realizar con uno el rallado y con otro el apoyo, es prácticamente inviable considerando la productividad, puesto que el cambio rallado-apoyo puede repetirse tres o cuatro veces por cada operador con cada canal.

Como medida adicional de prevención de la contaminación cruzada, se explica a los responsables de la producción del matadero de ovino la importancia de vigilar el movimiento de la piel de las canales, cuando estas están a medio desollar, para evitar en lo posible que la parte sucia de esta pueda tocar la carne de la canal. Además se debe continuar con el rigor habitual al manejar el tracto digestivo de la canal para evitar roturas o desprendimientos.

2.5.3.3. Salas de despiece

Cuchillos: aunque se cambien a media jornada, es recomendable hacerlo al menos cada dos horas, un recurso sencillo de establecer pues se trata de un material que no es caro.

Tablas de despiece: a la vista de los datos obtenidos se evidencia que es más que aconsejable, al menos, el cambio de tabla a media jornada, lo cual puede hacerse simplemente dando la vuelta a la tabla donde se trabaja. Es recomendable mayor frecuencia de cambio (mediante la adquisición de nuevos juegos de tablas).

Zonas auxiliares de apoyos de carnes (mesas fijas o cintas móviles): es también aconsejable al menos una limpieza a media jornada. Un recurso higiénico disponible, sin alterar básicamente el ritmo del proceso, sería la pulverización con alcohol, u otro desinfectante que no deje residuo. Pero el enjabonado, aclarado, secado con papel desechable y desinfectado por pulverización, es una opción más recomendable para realizar a media jornada, que por añadidura no excedería de dos o tres minutos si se hace de modo coordinado. En el caso de la mesa de inoxidable de la sala de despiece de porcino, sería conveniente evaluar la posibilidad de sustituirla por una mesa de perforado regular, para evitar encharcamientos de sangre.

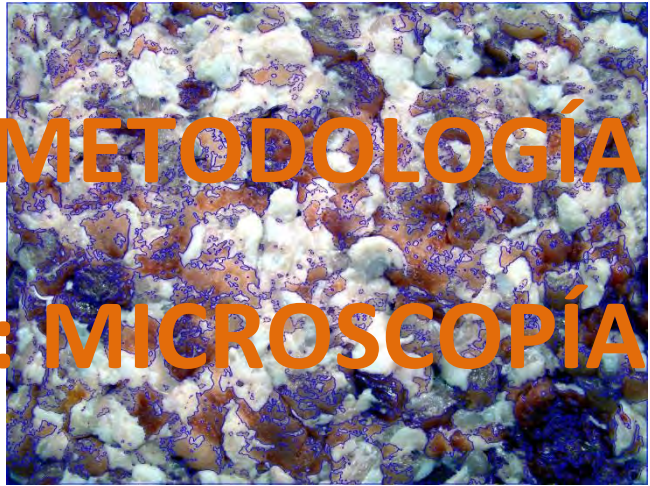
Guantes metálicos: es muy importante que se cambien (el coste de adquirir dos por persona no se estima demasiado elevado) o laven y desinfecten, como mínimo, también a media jornada.

2.5.3.4. Industrias de embutidos

Picadoras: el recurso de pulverización con alcohol, u otro desinfectante que no deje residuo, del interior del equipo a media jornada, es válido en este caso. Como posibilidades añadidas, que ya requieren una inversión de tiempo mayor, estaría el llevar a cabo antes de esta desinfección un breve manguado con agua clorada sin presión (evitar en todo momento la generación de aerosoles) de la caja de la picadora, recogiendo el agua con un carro a la salida de esta.

Mesas de caída de embutido fresco: El mismo recurso de pulverización con desinfectante puede aplicarse a estas superficies. Si bien en este caso el enjabonado, aclarado, secado con papel desechable y desinfectado por pulverización, es más recomendable y puede realizarse a media jornada. Aunque las mesas tienen alguna perforación, estas son insuficientes; sería conveniente evaluar la posibilidad de sustituirlas por otras de perforado regular, para evitar encharcamientos.

**V. EVALUACIÓN DE LA
CONTAMINACIÓN EN
SUPERFICIES DE CORTE
MEDIANTE METODOLOGÍA
AVANZADA: MICROSCOPIA
DE EPIFLUORESCENCIA
DIRECTA Y APLICACIÓN DE
ESPRAV REVELADOR**





V. EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN EN SUPERFICIES DE CORTE MEDIANTE METODOLOGÍA AVANZADA: MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA DIRECTA Y APLICACIÓN DE ESPRAY REVELADOR

1. Material y métodos

1.1. Planificación del trabajo

El trabajo se ha llevado a cabo aprovechando la circunstancia de que lo evaluado, dos tablas de corte de polietileno de alta densidad, ha sido retirado de servicio por dos salas de despiece de carnes. Esto ha ocurrido en el primer trimestre del año 2015, desarrollándose todos nuestros ensayos entre el mes tercero y el mes sexto de dicho año.

1.2. Descripción de las inspecciones y muestreos

Se estudiaron dos tipos de tabla de corte de carnes empleadas en salas de despiece, ambas de polietileno, pero con diferente color, blanca y roja. La tabla roja, de mayor grosor (3 cm) que la tabla blanca, es un útil recién retirado de una sala de despiece de vacuno para sustitución por tabla nueva. Antes de su retirada fue higienizada según el procedimiento de limpieza habitual de la industria. La tabla blanca (1,5 cm de espesor) corresponde a una superficie recién retirada de una sala de despiece de porcino. Igualmente, antes de su retirada fue higienizada según el procedimiento de limpieza de la industria.

En principio, las tablas blancas son más fáciles de identificar si están limpias o sucias, puesto que su oscurecimiento nos indica claramente la presencia de suciedad, y es un buen referente para

conocer si han sido correctamente higienizadas. En el caso de las tablas rojas, *a priori* son menos higiénicas, debido a que se aprecia peor la posible suciedad remanente, especialmente las manchas de sangre o carne, siendo complicado detectar a simple vista la presencia de restos orgánicos en función de los cambios de coloración u oscurecimientos de la tabla.

Ambas tablas se evaluaban periódicamente en las dos empresas, si bien con amplios intervalos de tiempo (cada 12 meses), para conocer su estado higiénico, mediante frotado con hisopos. En nuestro caso se realizó un análisis duplicado de las mismas. Para la toma de muestras, se empleó como referencia la Norma UNE-ISO 18593: 2013: “Métodos horizontales para las técnicas de toma de muestras a partir de superficies utilizando placas de contacto e hisopos”, llevando a cabo la operativa descrita en el apartado “Material y métodos” del Capítulo IV de esta tesis, para un área de 25 cm². La siembra y recuento de microorganismos aerobios mesófilos y enterobacterias, se realizó igualmente del modo indicado en el apartado “Material y métodos” del Capítulo IV, con la referencia de los métodos allí citados para tales microorganismos. Los datos que indicaremos en el apartado referido a resultados, son la media, para cada tabla, de dos determinaciones de distintas zonas de estas.

También se llevó a cabo una percepción visual de las tablas, por un lado de modo simple y por otro mediante el empleo del Biofinder, que, en presencia de carga contaminante, genera un burbujeo blanco claramente distinguible. Se aplicó en un área aproximada de 5 cm² de cada tabla en cuatro localizaciones distintas (cuatro aplicaciones por tabla). El Biofinder es un espray convencional de sencillo uso, que tiene la virtud de “delatar” la contaminación microbiológica sobre la superficie en la que se aplica. Ha de pulverizarse (sin agitar) a una distancia de 10-15 cm y realizarse una inspección visual a partir de los 30 segundos. Si la superficie no está contaminada se mantiene inalterado el espray aplicado (con su ligera coloración naranja). Si la superficie está contaminada, se ocasiona un burbujeo de espuma blanca que contrasta con el color anaranjado del producto. El burbujeo es más intenso cuanto mayor es la contaminación, y permanece durante más de 10 minutos. La fórmula está registrada ante la Oficina Española de Patentes y Marcas del Ministerio de Industria, Turismo y Comercio. Reacciona al detectar la agrupación de microorganismos adheridos a superficies (biofilms). Revela por tanto de manera inmediata las zonas contaminadas mediante una simple inspección visual.

Después, para evaluar la suciedad y la presencia de microorganismos sobre estas dos tablas de corte mediante una tecnología moderna, se aplicó la microscopía de epifluorescencia directa (DEM). Para ello, se empleó la tinción vital LIVE/DEAD[®] BacLight™ kit de viabilidad bacteriana (L13152; Molecular Probes Inc., Oregon, USA), que también nos permite la tinción de restos de

suciedad. Este kit emplea dos fluorocromos: SYTO 9 y yoduro de propidio (PI). El SYTO 9 penetra en las células tanto con membranas lesionadas como intactas. En contraste, el PI penetra sólo las células con la membrana lesionada y reduce el colorante SYTO 9. Por lo tanto, con la aplicación simultánea de los dos colorantes en proporción adecuada, las células viables con membrana intacta fluorescen en verde y las células muertas o lesionadas en rojo.

Al mismo tiempo, se utilizó el colorante DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (Sigma, Saint Louis, USA), a una concentración de 10 mg/ 0,5 ml de agua desionizada estéril (120°C/ 15 minutos en autoclave). Una vez disuelto completamente el colorante, se mantuvo en refrigeración (4°C±1°C) para conservar una solución de almacenamiento concentrada. Para su uso, se añadieron 50 µg en 0,5 ml de agua desionizada estéril, lo que suponía añadir 2,5 µl de la solución de almacenamiento. Para facilitar el trabajo de laboratorio, se emplearon siempre viales Eppendorf con tapón de rosca de 2 ml, mantenidos siempre en refrigeración (4°C±1°C).

En el caso de los residuos orgánicos, las proteínas se tiñen de color verde, dada la afinidad de las proteínas por el colorante SYTO 9. Sin embargo el PI tiene especial afinidad por los restos hidrocarbonados, dando una tonalidad roja. En el caso de las grasas, no se detectará tinción alguna, por lo que aparecerán como áreas no teñidas. En el caso del material estudiado, al ser un polímero plástico, no hay afinidad por ninguno de los colorantes, por lo que no es esperable ningún ruido de fondo. En el caso del colorante DAPI, los restos proteicos se tiñen de color azul, mientras que las bacterias tienden a hacerlo de color rojo.

Las muestras de las tablas (cortes de 5 x 5 cm de superficie) fueron teñidas con 20 µl de la tinción vital LIVE/DEAD o con 50 µl de DAPI. Dichas muestras se incubaron en oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente, para luego ser evaluadas bajo un microscopio de epifluorescencia Olympus BX51/BX52 (Olympus, Tokyo, Japón), equipado con una lámpara de mercurio de 100 W (USH-1030L), un filtro de doble paso (U-M51004 F/R – V2) y acoplado a una cámara digital DP50 - CU. Las muestras teñidas se observaron con objetivos 10X, 20X y 40X para examinar la estructura del material, la cantidad de residuo y el estado vital de las células bacterianas.

Las imágenes se analizaron usando el programa analySIS Auto 3.2 (Fuster-Valls y cols., 2008; Montañez-Izquierdo y cols., 2012).

2. Resultados y discusión

Las tablas de corte son elementos esenciales para el desarrollo de los trabajos en las industrias cárnicas, especialmente cuando hay que realizar un despiece de canales o procesar piezas cárnicas de distintos volúmenes para su fragmentación o pulido (limpieza para la retirada de huesos, tejido conectivo, grasas, etc.). En todos los casos, se emplean estas tablas como elementos de soporte, que aíslan el producto del contacto directo con las mesas de trabajo (que son habitualmente de acero inoxidable, material sobre el que no puede cortarse a causa del elevado deterioro que provocaría en los útiles de corte al contactarlos). Tradicionalmente, estas tablas de apoyo han sido de madera (aún lo siguen siendo a escala doméstica en muchos hogares). Debido a la consideración, tras los avances científico-técnicos de las últimas décadas en el ámbito relativo a la seguridad alimentaria, de la madera como material de superficie antihigiénico, se han sustituido por tablas de corte plásticas, normalmente de polipropileno o de polietileno de variadas densidades, debido a su menor adherencia y mayor facilidad teórica de lavado. Estos materiales plásticos se han extendido por todas las industrias en las últimas décadas, siendo los elementos de referencia en cuanto a superficies de corte se refiere.

La efectividad de la agresión bacteriana sobre las superficies de trabajo y la posible formación de biofilms depende, entre otros factores, de la naturaleza y características de la superficie atacada (Van Houdt y Michiels, 2010). El material plástico es, en principio, un material muy adecuado para el trabajo con todo tipo de alimentos, según se ha comprobado. Por ejemplo, en ensayos de adherencia de *Listeria monocytogenes* a materiales (Beresford y cols., 2001; Chmielewski y Frank, 2003), superficies de polipropileno y de polietileno daban mejores resultados que superficies de acero inoxidable. No obstante, estos materiales plásticos, especialmente cuando son empleados como soporte para realizar cortes sobre ellos, son víctimas de un rápido deterioro que se manifiesta con la aparición de piques y surcos o ralladuras de distintas dimensiones, y con la rápida pérdida del pulido superficial inicial. Si no se realizan una limpieza y desinfección adecuadas, y, con cierta frecuencia, un repulido de estos elementos, quedarán restos de materia orgánica en ellos, en las numerosas estrías o surcos conformados tras el contacto persistente con los elementos de corte. Así, las tablas de plástico, inicialmente muy adecuadas, pueden finalmente convertirse en un importante factor de diseminación de contaminación microbiológica en las industrias de elaboración de alimentos.

2.1. Resultados de la percepción visual simple y de la aplicación de microscopía de epifluorescencia directa

2.1.1. Tabla blanca

Según nuestra apreciación visual simple, la tabla blanca evaluada en nuestro estudio tiene un aspecto higiénico adecuado a grandes rasgos, aunque pueden observarse líneas o zonas oscurecidas a causa de las erosiones ocurridas al contactar con cuchillos en los cortes frecuentes.

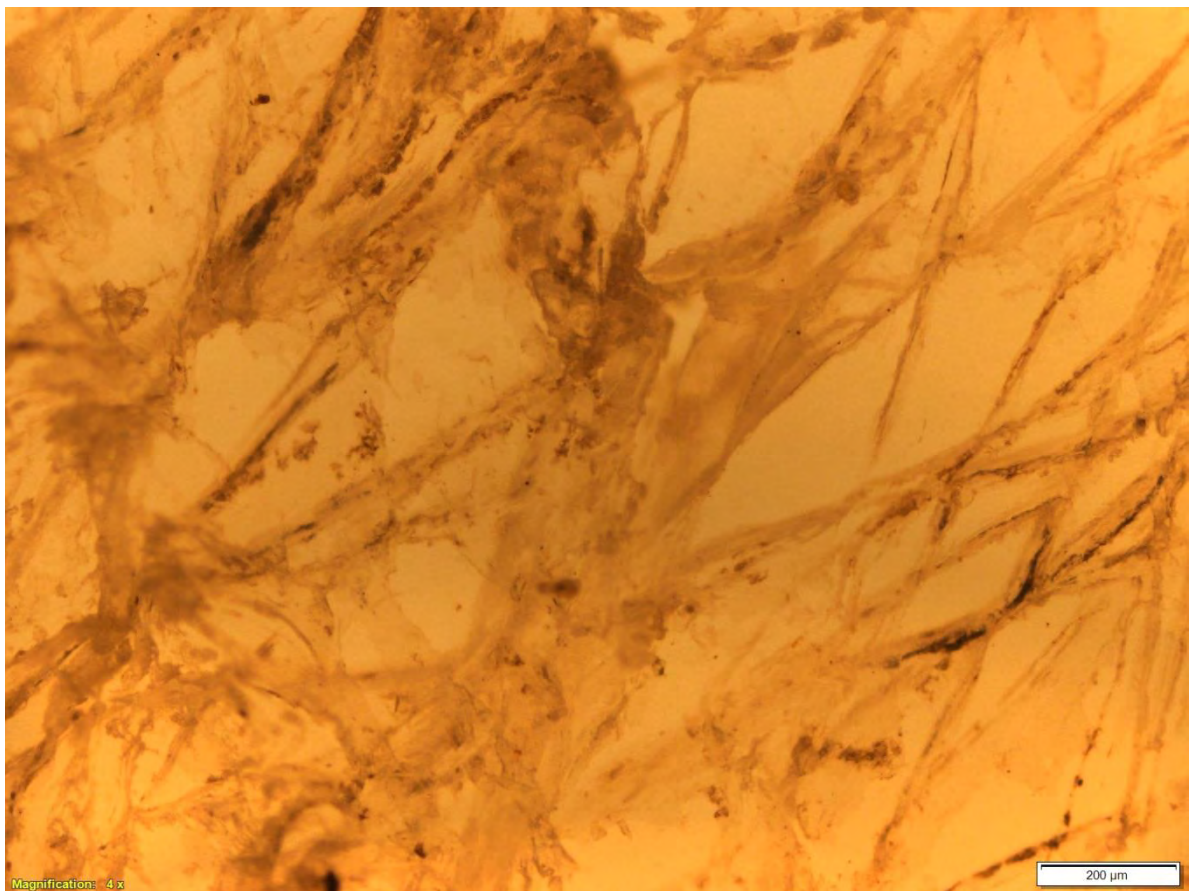


Figura 35: Tabla de corte blanca: imagen sin teñir de la superficie.

En la Figura 35 podemos ver el aspecto macroscópico superficial de la tabla, donde se aprecian con nitidez una gran cantidad de surcos, provocados por el contacto frecuente con los cuchillos u otros elementos de corte en las operaciones de trabajo con las carnes (despieces, retirada de huesos y tejido conectivo). Esta erosión facilita la entrada de suciedad y la colonización por parte de los microorganismos.

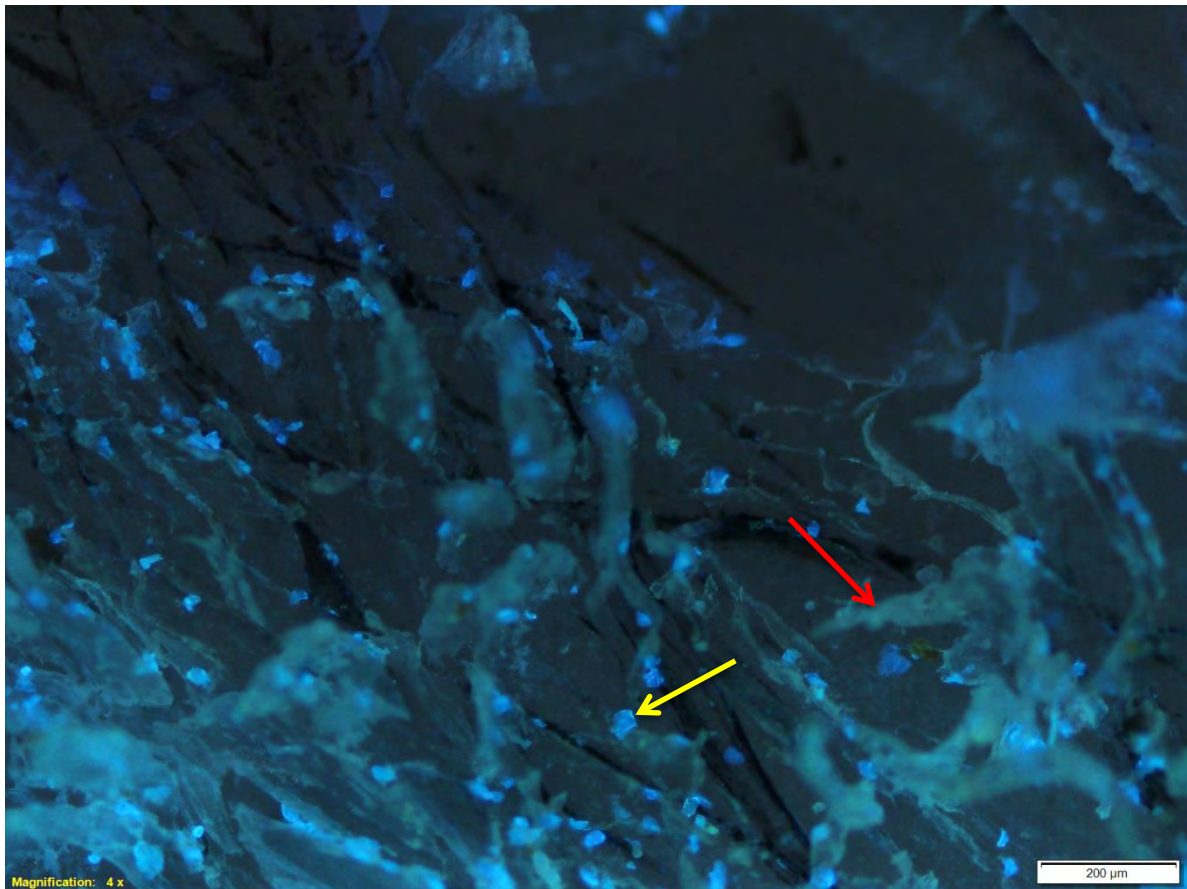


Figura 36: Contaminación orgánica de la tabla de corte blanca, tras su tinción con DAPI.

En la Figura 36 podemos ver cómo estos surcos en la tabla aparecen con restos orgánicos, fundamentalmente de tipo proteico. La intensidad de color depende de la concentración y del ángulo de reflexión de la radiación. Todo lo que aparece de un color azul, azulado o azul-verdoso, son restos o residuos de proteína. Las manchas que aparecen en un primer plano como velos azul-verdosos o azul-verdoso-anaranjados, son formaciones poliméricas de proteína con agua (ver ejemplo marcado con flecha roja). El color también depende del foco. Lo que está claramente enfocado es de un azul intenso (ver ejemplo en lo indicado con flecha amarilla), lo que no está bien enfocado, aparece verdoso. La intensidad del azul está también relacionada con la concentración, de forma que si el residuo está altamente concentrado en proteína aparece un color azul brillante, y aparece de color azul-verdoso cuando está más diluido.

Al ampliar la imagen, podemos apreciar cómo la presencia de estos restos es masiva en el interior de los surcos (tales surcos aparecen como líneas oscuras) formados al golpear la tabla con los cuchillos durante el corte de las carnes (Figura 37).



Figura 37: Tinción a 20x de la superficie de la tabla de corte blanca teñida con DAPI.

Al realizar la tinción con Live-Dead, apreciamos, igualmente, que la mayor parte de los residuos detectados son de naturaleza proteica, con la aparición de claras coloraciones verdes con una elevada extensión (Figura 38). La intensidad del color es dependiente de la concentración. No obstante, se ha detectado la presencia de algunos aglomerados de color rojizo. Estos agregados difícilmente van a tener una composición hidrocarbonada, sino que corresponden a microcolonias microbianas que se han ido formando en el material.

En este caso, si la hidratación sobre tales agregados fuera suficiente (lo cual puede ocurrir si, por ejemplo, permanecen restos sanguíneos de las carnes sobre las tablas de corte durante la jornada sin ser retirados con frecuencia o no se secan adecuadamente las superficies de trabajo para

comenzar a trabajar tras una limpieza poco eficaz), se produciría una reactivación, extensión y apertura del biofilm, con la correspondiente recolonización de toda la superficie y la aparición de una contaminación cruzada hacia el producto, los manipuladores u otras superficies contactadas.

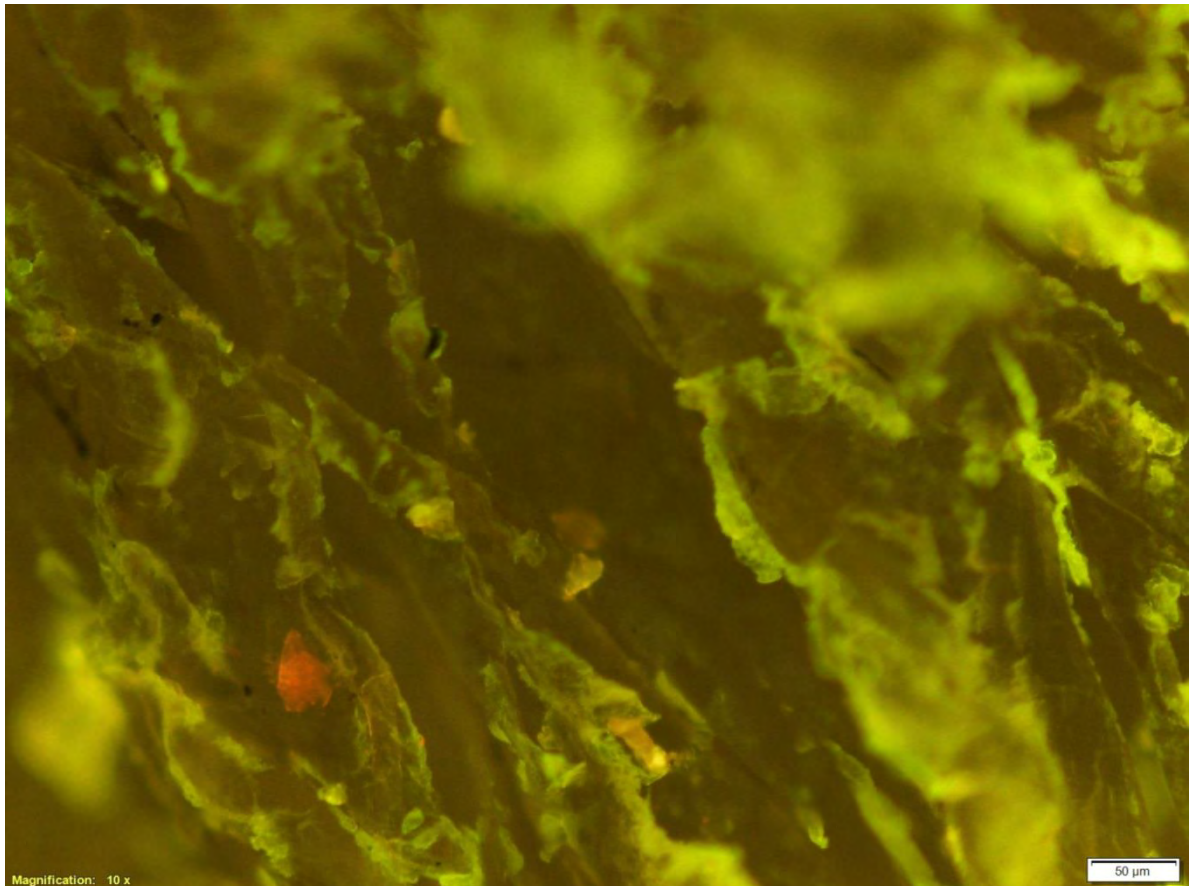


Figura 38: Tinción con Live-Dead de la tabla de teflón blanco, con la presencia de restos proteicos de color verde y acúmulos microbianos de color rojo.

En la Figura 39 podemos apreciar la presencia de una mancha roja, junto a los restos proteicos verdes, con la estructura típica de una micro-colonia, a la espera de hidratarse y convertirse en un biofilm.

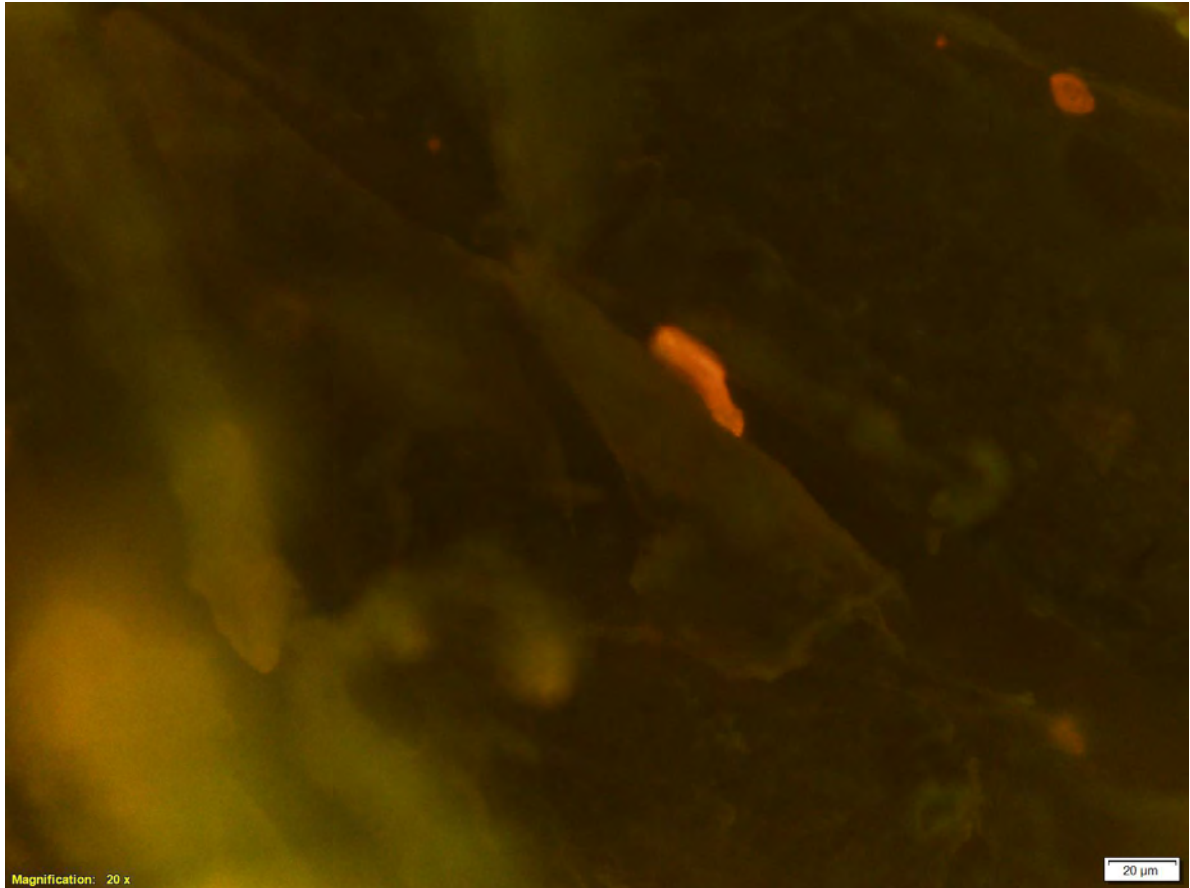


Figura 39: Tabla de teflón blanco, teñida con Live-Dead, apreciándose la estructura de una microcolonia.

Por tanto, de acuerdo con nuestras observaciones, parece claro que aunque la tabla blanca tenga un aspecto visual limpio, existen restos residuales de materia orgánica, especialmente en los surcos formados por los cuchillos, donde se percibe contaminación microbiana. En el caso de que no haya un correcto secado o durante las operaciones de trabajo se mantenga la zona humedecida demasiado tiempo, estas tablas permitirán la proliferación microbiana y nos encontraremos con problemas higiénicos de contaminación cruzada.

Como conclusión, las tablas, después de su higienización, deben secarse y mantenerse en condiciones de sequedad estrictas, para impedir contaminaciones cruzadas importantes una vez comencemos a trabajar en ellas. Dado que la higienización es muy complicada de resolver en la parte interna de los surcos de corte, el secado se convierte en una acción esencial. Además, como se ha comentado, se debe evitar que la superficie de las tablas permanezca húmeda (con restos de sangre) durante periodos prolongados al realizar las operaciones de corte en el transcurso la jornada.

2.1.2. Tabla roja

Este es un material más comprometido, tanto a la hora de limpiarlo como a la hora de trabajar sobre él (para evaluar si se está ensuciando demasiado), ya que al tener un color rojo, disimula la aparición de manchas debidas a la presencia de restos de sangre y carne.

En una primera observación de la tabla examinada, a simple vista, no podemos asegurar que la tabla sea sospechosa de presentar una importante contaminación, pero está muy erosionada (ha perdido todo su pulido inicial) y su color rojo superficial ha adquirido en algunas zonas matices muy levemente grisáceos, por lo que es difícil predecir con certeza su estado, ya que incluso posibles cortes por filo de cuchillo quedan enmascarados por la erosión superficial, y otros posibles cortes se han ampliado con el tiempo dando lugar, en mitad de lo erosionado, a rayas más anchas con aspecto aseado y pulido (puede decirse incluso que estas son las zonas más brillantes y visualmente limpias de la tabla). Además, aproximándonos al límite, se percibe para esta superficie un olor incorrecto.

Al realizar un primer análisis microscópico con DAPI, detectamos que la superficie estaba completamente recubierta de residuos orgánicos (Figura 40).

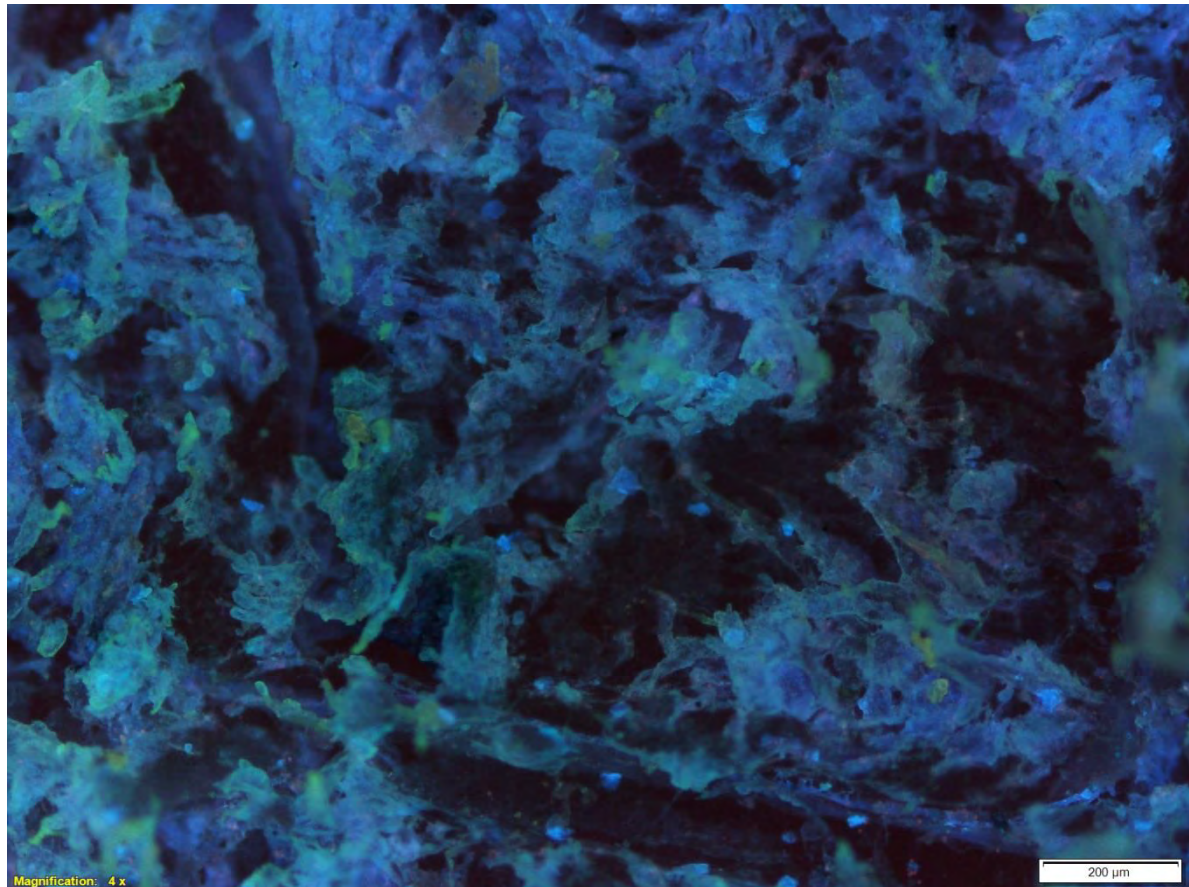


Figura 40: Tinción con DAPI de la superficie de la tabla roja.

Como decimos, en esta ilustración se puede apreciar cómo la casi totalidad de la superficie está recubierta, no apreciándose la existencia de surcos asociados a los cuchillos de corte. La cantidad de residuos es tan importante, que se aprecia cómo ocupan toda la superficie, no sólo con una extensión en el plano del material, sino que sobresalen del mismo, creando una nítida imagen tridimensional (Figura 41).

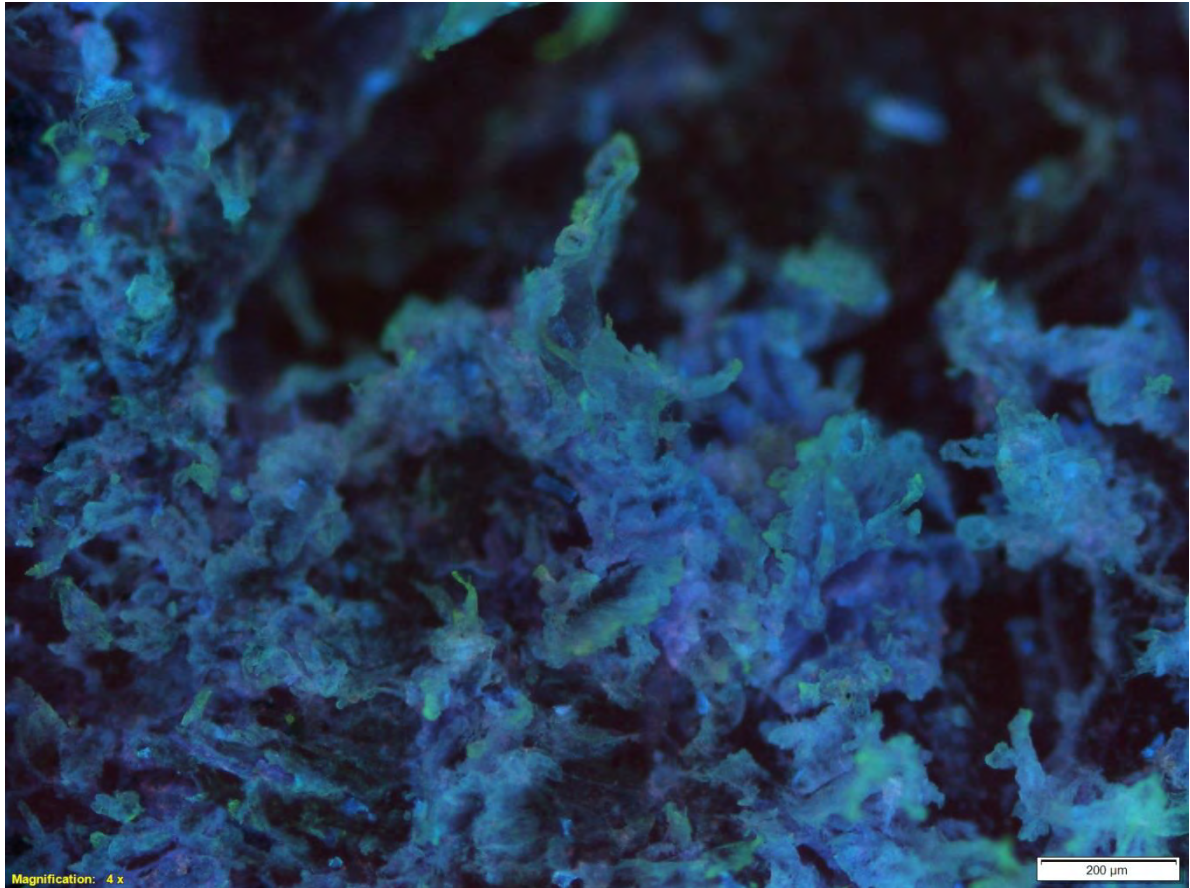


Figura 41: Imagen de los residuos orgánicos sobre la tabla roja, tras su tinción con DAPI.

Estas imágenes nos indican que la higiene y desinfección de la tabla roja ha sido muy deficiente, al menos en el último periodo de existencia operativa en la industria, pudiendo haberse constituido en un problema de higiene para los productos allí trabajados, al poder aparecer en las tablas, en estas condiciones, áreas contaminadas con microorganismos.

Esta contaminación se demuestra al hacer un zoom sobre la imagen con el microscopio de epifluorescencia. Podemos apreciar cómo, en las capas profundas de la suciedad adherida a la superficie, aparecen áreas coloreadas en rojo, con estructuras puntiformes. Estas estructuras son microorganismos, que están proliferando en el interior de los residuos orgánicos (Figura 42). Esto supone un riesgo higiénico importante, puesto que estos microorganismos pueden ser traspasados a las carnes que contacten con esta tabla, lo que implica un claro riesgo de contaminación cruzada, con influencia sobre la calidad y la seguridad del producto elaborado.

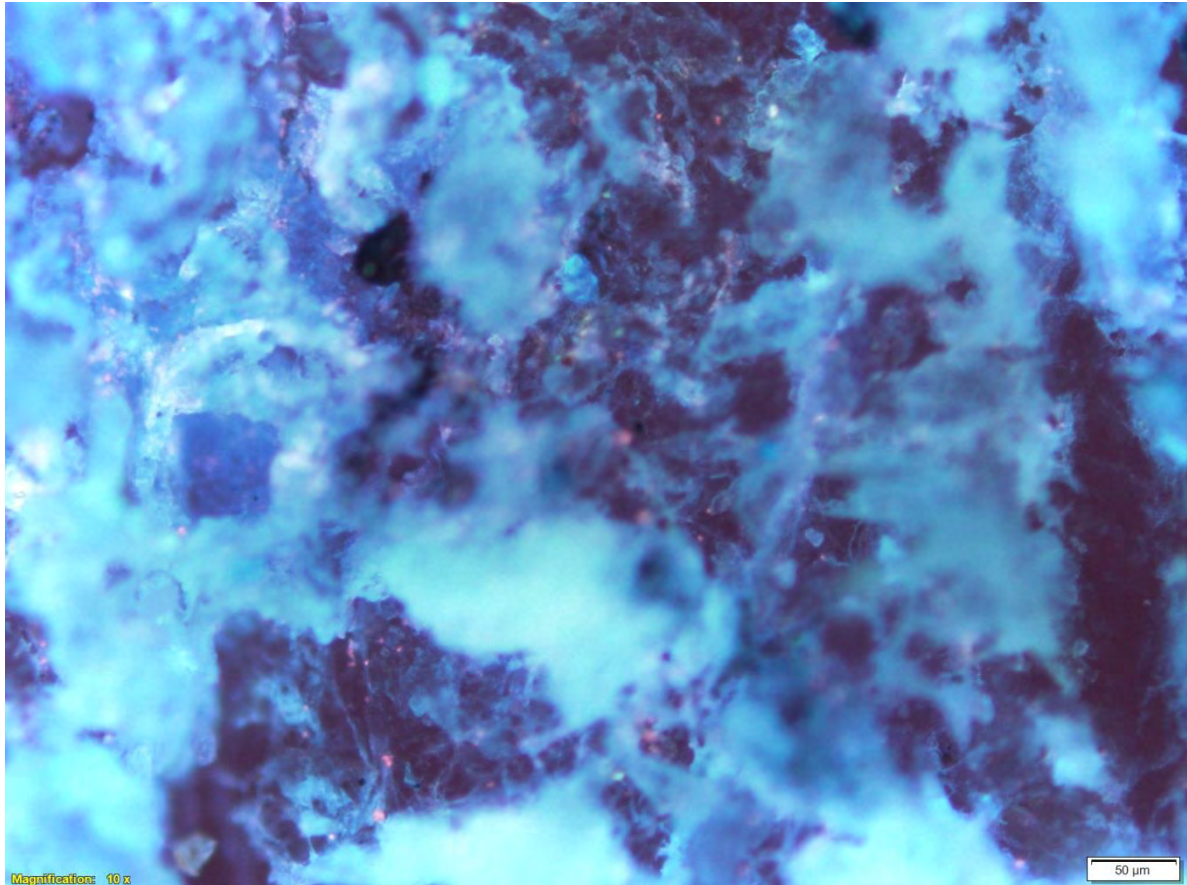


Figura 42: Imagen de la superficie de la tabla de corte roja, con la presencia de grandes cantidades de residuos orgánicos y microorganismos activos en su interior.

Al cambiar el colorante, por el Live-Dead, podemos apreciar cómo, no sólo hay crecimiento microbiano en la superficie de contacto, sino que dentro de la masa de residuos orgánicos también se aprecia un crecimiento masivo de microorganismos, lo que indudablemente apoya el criterio del riesgo higiénico en superficies de corte como esta, que no han sido objeto de las medidas adecuadas de higiene (Figura 43).

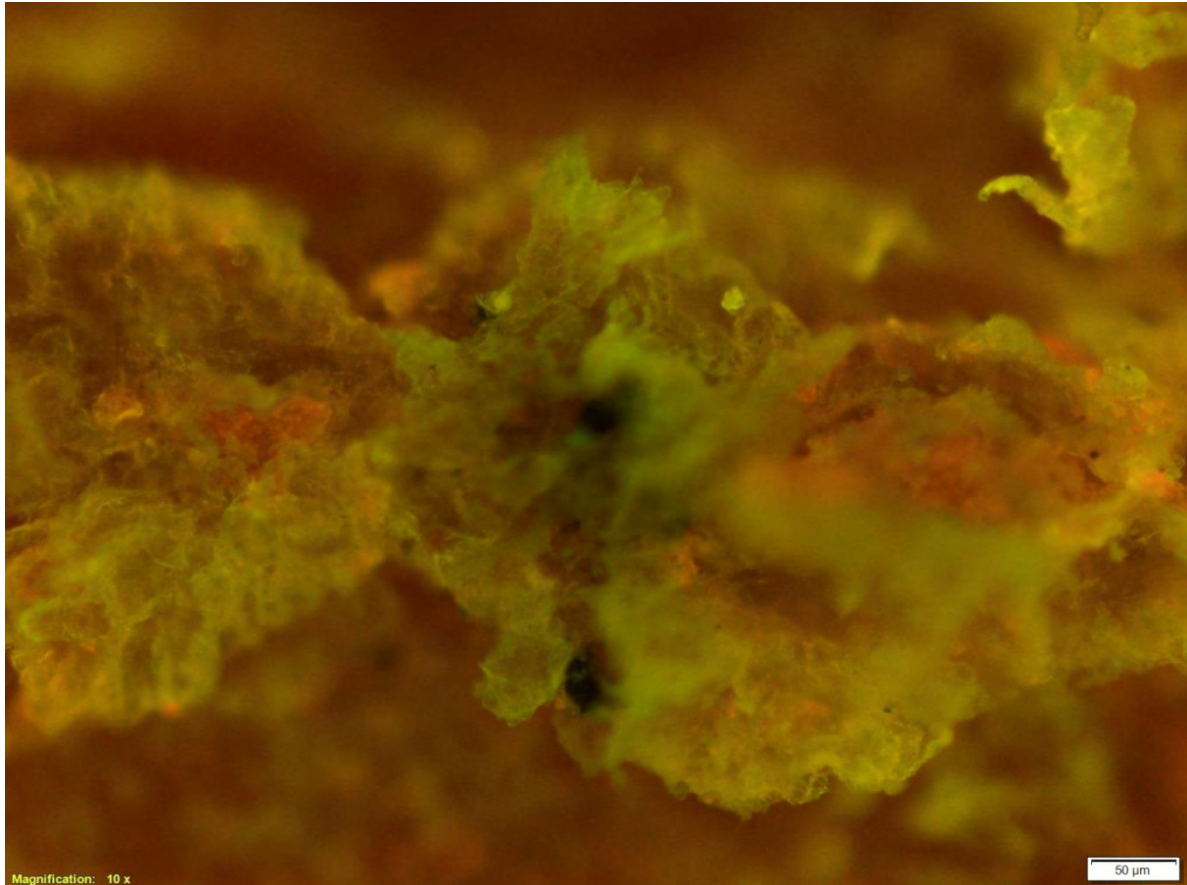


Figura 43: Imagen de restos de suciedad (verde) en la tabla roja, con la presencia de colonización microbiana en su interior (tonos naranja-rojizos).

2.2. Resultados microbiológicos

Mediante toma de muestras por hisopado, los resultados microbiológicos para la tabla roja, realizados antes de proceder a los muestreos con la metodología DEM, fueron de 7,72 ufc/cm² para aerobios mesófilos y 1,2 ufc/cm² para enterobacterias (se trata de la media de dos determinaciones en ambos casos). Para la tabla blanca, 6 ufc/cm² para aerobios mesófilos y 0,12 ufc/cm² para enterobacterias (media de dos determinaciones). El valor de enterobacterias para la tabla roja excede en un 20% lo requerido según los criterios de la Decisión 2001/ 471/ CE, aplicable a mataderos y salas de despiece, que indica un máximo de 10 ufc/cm² para aerobios mesófilos y de 1 ufc/cm² para enterobacterias.

De acuerdo con las observaciones microscópicas, los resultados de la tabla blanca podrían ser similares a los recuentos microbianos detectados (independientemente de la existencia adicional

comprobada de suciedad orgánica). Sin embargo, para la tabla roja, los niveles de contaminación microbiológica detectados por microscopía epifluorescente, han sido, según las imágenes mostradas, claramente muy superiores a los obtenidos mediante analítica convencional. Esto se debe a que las bacterias se encuentran con frecuencia ocultas en las capas profundas de la suciedad orgánica. Por tanto, si no se consiguen eliminar las capas superficiales de la costra de proteína acumulada, no es posible arrastrar los microorganismos que se encuentran en su interior, lo que supone un riesgo higiénico de primer orden. Durante los periodos de trabajo, donde se conjugan humedad (restos sanguíneos, o de agua sin secar tras la limpieza), suciedad y tiempo, se producirá el crecimiento y la transferencia de bacterias desde a tabla a los productos procesados, con la consiguiente contaminación cruzada.

Es imprescindible, por tanto, mejorar las técnicas de limpieza y desinfección para que se asegure la eliminación de la suciedad residual en las superficies de contacto de alimentos, a fin que los resultados microbiológicos sean reflejo de la realidad higiénica de la industria.

2.3. Resultados de la percepción visual mediante spray “Biofinder”

Mostramos a continuación una imagen de la aplicación en cada tabla del spray revelador.

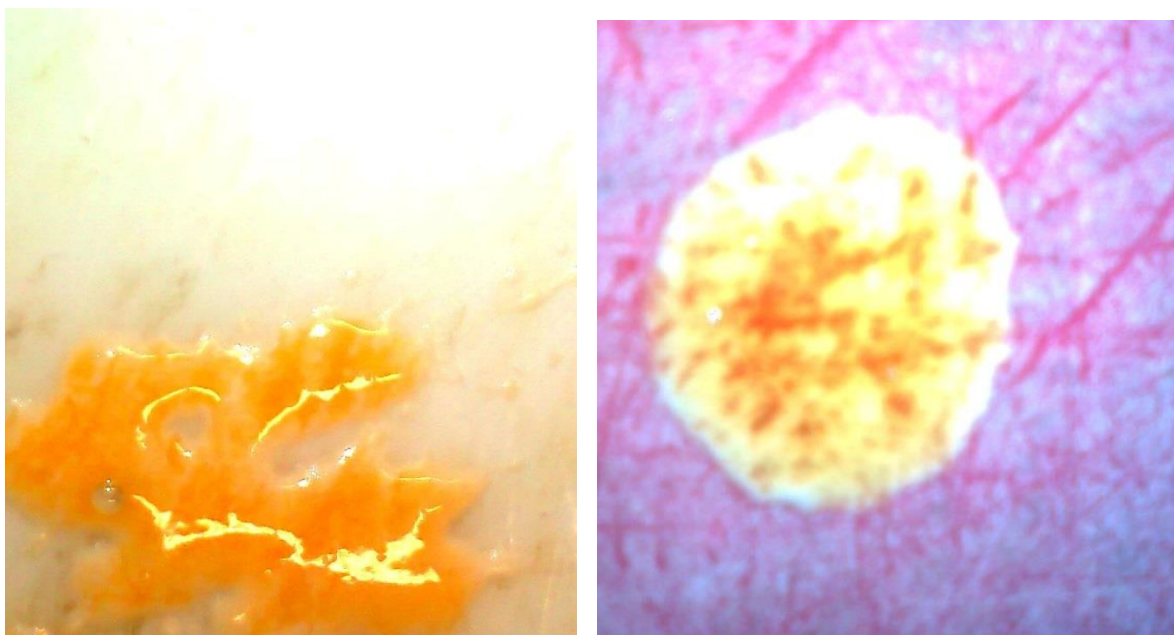


Figura 44: Imagen de las tablas blanca y roja una vez aplicado el spray “Biofinder”.

Como puede observarse de las imágenes, de la tabla blanca emana un burbujeo discontinuo y leve, pero en la tabla roja puede observarse un burbujeo muy intenso. Esto, que se repitió de modo aproximado en las cuatro aplicaciones llevadas a cabo en cuatro localizaciones distintas de cada tabla, está en consonancia con los resultados obtenidos tras la evaluación con microscopía de epifluorescencia directa. Como en ese caso, el Biofinder revela una contaminación limitada en la superficie de la tabla blanca y una contaminación muy acusada en la tabla roja. Esta pronunciada contaminación no fue reflejada al evaluarse la tabla roja con el muestreo por hisopado.

Por tanto (aunque sería conveniente corroborar nuestros ensayos con más tablas y otras superficies de distintos materiales), podemos indicar que el spray Biofinder puede ser un método rapidísimo (lo que permite la toma instantánea de decisiones si se requieren correcciones), y completamente económico, de obtener indicaciones acerca de la posible contaminación en las industrias alimentarias, con una fiabilidad sensiblemente mayor que la que obtenemos cuando evaluamos esas superficies mediante muestreos tradicionales con hisopos, y comparable a la fiabilidad que nos da la aplicación de tecnologías más complejas. El producto puede además ser aplicado de modo extraordinariamente sencillo por los propios encargados u operarios de las empresas, sin requerirse los servicios de un laboratorio externo (como ocurre hoy día prácticamente con la totalidad de las PyMEs alimentarias que desean conocer el estado higiénico de sus superficies de trabajo), o propio, para realizar muestreos analíticos convencionales o determinaciones mediante microscopía.

VI. CONCLUSIONES



VI. CONCLUSIONES

1. La percepción visual simple de superficies de trabajo en la industria cárnica, una vez higienizadas estas, puede resultar una buena aproximación para conocer si las actividades de limpieza y desinfección se están llevando a cabo de un modo razonablemente riguroso. Las industrias cárnicas hacen uso de esta herramienta desde hace varios años, según el denominado “Control Preoperativo de la Higiene”. Ahora bien, en las PyMEs del sector evaluadas, esta herramienta no se utiliza de modo estricto, y su eficacia, por tanto, es dudosa. La percepción visual no obstante nos dará sobre todo orientación de si los restos de suciedad han sido eliminados. Sin embargo, la existencia de biofilms o contaminación aislada quedará encubierta, por lo que se hace necesario llevar a cabo análisis de laboratorio con una frecuencia regularizada.

2. Una mejora de esta percepción visual puede obtenerse contando con la ayuda de productos que “delaten” la contaminación, lo cual se consigue mediante cambios en las características físicas de tales productos, una vez aplicados sobre las superficies, si estas están contaminadas. Esto nos permite juzgar con mucho más rigor que una evaluación visual convencional, y lo más importante, también *in situ*, lo que posibilita la toma de decisiones inmediatas en los lugares de trabajo. Además de su acción inmediata, este tipo de productos son muy económicos, de modo que, no siendo hoy día mayoritariamente empleados, su uso puede ser una excelente apuesta de futuro para la mejora de los controles preoperativos en las empresas alimentarias sin necesidad de recurrir continuamente a laboratorios (con los que además hemos de esperar resultados durante más de un día, haciendo imposible cualquier corrección inmediata). El producto empleado en nuestro caso, el “Biofinder”, ha demostrado además que es capaz de detectar de modo muy útil cuándo, determinados elementos como las tablas de corte de carnes, han sido colonizados por poblaciones bacterianas, tal y como se ha demostrado realizando ensayos de microscopía de epifluorescencia directa sobre las mismas tablas y comparando resultados en ambos casos.

3. A la vista de los datos analíticos obtenidos sobre superficies limpias en contacto con los alimentos en las industrias cárnicas evaluadas, puede concluirse que la limpieza en algunos casos concretos es mejorable, siendo necesario poner especial atención en aquellas superficies que no son de acero inoxidable, como las tablas plásticas para corte o las lamas de plástico o caucho para el pelado de canales de porcino.

4. La limpieza de superficies sin contacto directo con los alimentos y la limpieza en zonas no abordables mediante manguedo diario general con agua y espuma, tales como cuadros de luz, pulsadores, cables y tuberías, manillas o techos, debe ser incluida adecuadamente en un plan general de limpieza y desinfección, con frecuencias y responsabilidades que aseguren su cumplimiento. En caso contrario pueden ser fuente habitual de contaminaciones cruzadas.

5. La formación y entrenamiento del personal dedicado a la limpieza de las PyMEs alimentarias deben ser correctamente planificados y realizados. En general el personal atiende esta tarea sin entender la implicación que un deficiente desarrollo puede conllevar para los productos elaborados en cada industria, y sin conocer algunos conceptos básicos de microbiología que le ayuden a tomar conciencia de la importancia de esta actividad.

6. Las buenas prácticas de limpieza y desinfección en las empresas de producción de carnes y productos cárnicos nos permiten iniciar las producciones de modo higiénico, pero con el transcurso de las operaciones de producción, las superficies van acumulando carga contaminante y se hace necesaria una vigilancia posterior y una sistemática que permita regenerar la limpieza de las superficies, hoy día limitada a poco más que el cambio de cuchillería.

7. Las superficies de trabajo con carnes y productos cárnicos acumulan pues suciedad y contaminación microbiológica durante el periodo de actividad, lo cual es detectable tanto visual como analíticamente. Según nuestro estudio, los ganchos de colgado de la línea del matadero de ovino pueden considerarse una excepción, apenas se evidencia para estos elementos acumulación de carga microbiana a medida que se desarrolla la actividad. Pero para el resto de las superficies evaluadas, tal acumulación es notable.

8. Aunque no han sido objeto de evaluación analítica extensiva en este estudio (salvo la indagación concreta con los manipuladores en el matadero de ovino), es importante indicar que hay que concienciar adecuadamente a los manipuladores acerca de la necesidad del lavado de manos con frecuencia. Sus manos serán, obviamente, dadas sus características físicas, una de las superficies que acumule más contaminación con el paso del tiempo si no son lavadas periódicamente.

9. En cuanto a nuestro estudio con las tablas de corte, podemos concluir que el empleo de tablas rojas o con colores que no permitan la detección clara de los restos de suciedad en la superficie, es un riesgo higiénico adicional al que ya de por sí constituye el empleo de superficies de corte de fácil rallado con los filos de los cuchillos, puesto que la suciedad acumulada permite el crecimiento de microorganismos, lo que constituye un riesgo que afectará a la calidad y seguridad de los alimentos que sobre esas tablas se trabajen.

10. Cuando se empleen tablas de corte se hace necesario, además de la limpieza y desinfección adecuadas, el mantenimiento de estas en condiciones de sequedad de modo inmediato, puesto que es una buena medida preventiva eficaz para el control de la proliferación microbiana en los residuos orgánicos que pueden acumularse en las grietas formadas por los cuchillos de corte. Por el mismo motivo es necesario mantener las tablas convenientemente secas durante el transcurso de la jornada de trabajo, pues la presencia de restos de sangre encharcados posibilitará la reactivación de posibles biofilms existentes.

11. Si consideramos los datos microbiológicos obtenidos para las dos tablas mediante muestreo convencional con hisopos, comparados con el resultado de nuestro estudio mediante microscopía de epifluorescencia directa, y también con el resultado de la aplicación de un spray revelador, podemos concluir que la aplicación de tecnologías de muestreo y análisis más modernas, como la microscopía indicada, o muy sencillas y económicas, como el spray empleado, permite evaluar con mucha mayor nitidez la posible existencia de contaminación en las superficies de trabajo con alimentos.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamopoulos, L., Montegna, J., Hanpikian, G., Argyropoulos, D.S., Heitmann, J. y Lucia, L.A., 2007. A simple method to tune the gross antibacterial activity of cellulosic biomaterials. *Carbohydrate polymers*, 69: 805-810.

AFNOR, 2013. Validation EN ISO 16140 de la méthode TEMPO TVC pour le dénombrement de la flore aérobie mésophile. Disponible en: http://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/BIO-12-15-09-05_en.pdf

AECOSAN. 2014. Materiales en contacto con alimentos. Disponible en: http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/web/cadena_alimentaria/subseccion/materia_contacto_alimentos.shtml

Almeida, G., Magalhães, R., Carneiro, L., Santos, I., Silva, J., Ferreira, V., Hogg, T., Teixeira, P., 2013. Foci of contamination of *Listeria monocytogenes* in different cheese processing plants. *Int. J. Food Microbiology*, 167: 303-309.

Altmajer-Vaz, D. 2004. Formulaciones detergentes biodegradables: ensayos de lavado. Tesis. Univ. Granada, Fac. Ciencias. Dpto. de Ing. Química.

Alvarado Salinas, P. A., Vásquez Valles, M.N., Saldaña Sevilla, W.H. y Vargas Huamán, A. *Clostridium perfringens* in hamburgers sold at markets in the city of Trujillo, Peru. 2013. *Revista de la Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Nacional de Trujillo*. Trujillo. Perú. REBIOL 33: 1-5.

Álvarez, F., Sanz, S. y Rodríguez-Jerez, J. J.. 2005. Rapid evaluation of surface sanitation by electrical measurement. *Journal of AOAC International*, 88, nº 4.

Álvarez-Astorga, M., Cápita, R., Alonso Calleja, C., Moreno, B., García Fernández, M.C. 2002. Microbiological quality of retail chicken by-products in Spain. *Meat Science*, 62: 45-50

An, Y.H. y Friedman, R.J. 1998. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*, 43: 338-348.

Anderson, J.B., Shuster, T.A., Hansen, K.E., Levy, A.S. y Volk, A. 2004. A camera's view of consumer food-handling behaviors. *Journal of The American Dietetic Association*, 104: 186-191.

Andersen, J.K., Hald, T., Nielsen, N.L., Fiedler, C.S. y Nørrung, B. 2007. New strategies for the use of microbial examination in food control in Denmark. *Food Control*, 18: 273-277.

ANICE (Asoc. Nacional de Industrias de la Carne de España), 2015. "El sector cárnico español". Disponible en: http://www.anice.es/v_portal/informacion/informacionver.asp?cod=9776&te=7&idage=11909&vap=0&npag=1

Anónimo 1988. Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de febrero de 1998 relativa a la comercialización de biocidas. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:123:0001:0063:ES:PDF>

Anónimo, 1989. Council Directive 89/437/ECC of 20 June 1989 on hygiene and health problems affecting the production and the placing on the market of egg products. *Official Journal of the European Communities*, L 122.

Anónimo, 2000. Antimicrobial products – Test for antimicrobial activity and efficacy. *Japanese Industrial Standard Z 2801:11*.

Anónimo. 2001a. Code of hygienic practice for the transport of food in bulk and semi-packed food. CAC/RCP 47-2001.

Anónimo. 2001b. Guía para la elaboración de un plan de limpieza y desinfección: de aplicación en empresas del sector agroalimentario. Acribia, Zaragoza.

Anónimo. 2003. Recommended International Code of Practice: General Principles of Hygiene. Codex Standard CAC/RCP 1e 1969, revision 4. Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO standards program, Rome, Italy.

Anónimo. 2005. Code of Practice for the Transport of Primary Produce and Seafood. New South Wales Food Authority, Newington, Australia.

Anónimo. 2010. Factors affecting fouling and cleanability of open food contact surfaces. A report on findings from the EU Integrated Project Pathogen Combat. Disponible en: <http://www2.mmu.ac.uk/media/mmuacuk/content/documents/rke/A%20-%20Factors%20affecting%20fouling%20and%20cleanability%20of%20open%20food%20contact%20surface.ashx.pdf>

Anónimo, 2014. BBC. Disponible en: http://www.bbc.co.uk/mundo/ultimas_noticias/2014/08/140812_ultnot_dinamarca_carne_listeria_en

ASINCAR (Asociación de Industrias Cárnicas del Principado de Asturias). 2014. Presentación. Jornadas de Centros Tecnológicos, Montevideo (Uruguay), 2014. Proyectos Vuchek y Meatcheck (Incorporación de tecnologías rápidas “on line” para el control microbiológico y de la vida útil, en alimentos envasados y/o en fresco, mediante la tecnología NIR portátil. Identificación de origen de piezas cárnicas en fresco y en elaborados cárnicos para evitar fraudes). Disponible en: <http://www.anii.org.uy/web/sites/default/files/files/Juan%20D%C3%ADaz%20%28ASINCAR%29.pdf>

Austin, J., Bergeron, G. 1995, Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. *Journal of Dairy Research*, 62: 509-519

Bacon, R. T., Sofos, J. N., Belk, K. E., Hyatt, D. R., & Smith, G. C. (2002). Prevalence and antibiotic susceptibility of *Salmonella* isolated from beef animal hides and carcasses. *Journal of Food Protection.*, 65, 284–290

Bacon, R.T. y Sofos, J.N. 2003. Characteristics of biological hazards in foods. *Food Safety Handbook*, ed. Schmidt y Rodrick. John Wiley & Sons Inc. Hoboken, 157-195.

Bacus, J. 2006. Natural ingredients for cured and smoked meats. Proceedings of the 59th meat conference. 77-78. 18-21. Champaign-Urbana, IL, USA.

Bagge-Ravn, D., Gardshodn, K., Gram, L. y Vogel, B.F. 2003. Comparison of sodium hypochlorite-based foam and peroxyacetic acid-based fog sanitizing procedures in a salmon smokehouse: survival of the general microflora and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 66: 592-598.

BgVV-FAO/WHO. 2003. WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe., Eighth Report 1999-2000. Disponible en: http://www.bfr.bund.de/internet/8threport/8threp_fr.htm

Bajpai, D. y Tyagi, V.K. 2007. Laundry detergents; an overview. *Journal of Oleo Science*, 56: 327-340.

Bari, M.L., Kawasaki, S. 2014. Rapid methods for food hygiene inspection. *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition), 269-279

Barnes, L. M., Lo, M.F., Adams, M.R. y Chamberlain, H. L. 1999. Effect of milk proteins on adhesión of bacteria to stainless Steel surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4543-4548.

Benenson, A. S. (Ed.). (1995). Control of Communicable Diseases Manual. Washington, USA: American Public Health Association.

Berends, B. R., Van Knapen, F., Mossel, D. A., Burt, S. A. y Snijders, J. M. (1998). Impact on human health of *Salmonella* spp. on pork in The Netherlands and anticipated effects of some currently proposed control strategies. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 219–229.

Beresford, M.R., Andrew, P.W. y Shama, G. 2001. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 1000-1005.

Berga Monge, A.M y Martín, S. 2009. Marco de Excelencia en Seguridad Alimentaria. II Jornadas de Seguridad Alimentaria. Dpto. de Agricultura y Economía Agraria. Universidad de Zaragoza. Disponible en: http://cederul.unizar.es/docs/seguridad_alimentariall/Ponencia4Berga.pdf

Bernbom, N., Ng, Y.Y., Jørgensen, R.L. , Arnapei, A., Meyer, R.L., Kingshott, P., Vejborg, R.M., Klemm, P. y Gram, L. 2009. Adhesion of food-borne bacteria to satinless steel is reduced by food conditioning films. *Journal of Applied Microbiology*, 73: 3283-3290.

Bhagwat, A. 2003. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*., 84: 217-224.

Bishop, P.L.. 1997. Biofilm structure and kinetics. *Water Scienc e Technology*, 36: 287-294.

Blaschek, H.P., Wang, H. y Agle, M.E. 2007. *Biofilms in the food environment*. Wiley, Blackwell Publishing. Iowa, USA.

Blenkinsopp, S.A., Khoury, A.E. y Costerton, J.W. 1992. Electrical enhacement of biocide efficacy against *Pseudomona aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 3770-3773.

Boer, E.D. y Beumer, R.R. 1999. Methodology for detection and typing on foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50: 119-130.

- Boisnault, A., Cassaing, S. Morelle, K, Dubarry, A., Berry, Linas, M.D. y Rance, F. 2005. Allergie alimentaire à une moisure présente sur à une croute de fromage: A propos d'une observation pédiatrique. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 45: 597-600.
- Borch, E., Nesbakken, T., & Christensen, H. 1996. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 30, 9–25.
- Botteldoorn, N., Heyndrickx, M., Rijpens, N., Grijspeerdt, K., & Herman, L. 2003. *Salmonella* on pig carcasses: Positive pigs and cross contamination in the slaughterhouse. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 891–903
- 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. *Journal of Food Microbiological Methods*, 37: 77-86.
- Boursillon, D., & Riethmüller, V. 2005. The use of wooden cutting boards is hygienically safe. *Hauswirtschaft und Wissenschaft*, 53, 80–85.
- Bouvet, J., Bavai, C., Rossel, R., Le Roux, A., Montet, M.P., Ray-Gueniot, S., Mazuy, C., Atrache, V., Vernozy-Rozand, C. 2002. Effects of cutting process on pork meat contamination by verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *E. coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*, 77: 91-97.
- Bower, C.K. y Daeschel, M.A. 1999. Resistance responses of microorganisms in food environments. *International Journal of Food Microbiology*, 50: 33-44.
- Bozariis, I.S. 2014. Novel food preservation and microbial assessment techniques. CRC Press. Taylor & Francis Group, LLC. 386.
- Bravo, V.J.B. y Villalobos de Bastardo, L.B. 2002. *Escherichia coli* enterohemorrágica en productos cárnicos comercializados en el mercado municipal de Cumaná, Venezuela. *Rev. Venez. de Microbiología*, 22: 2
- Breeuwer, p. y Abee, T. 2000. Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 55: 193-200.
- Bremer, P. J., Monk, I., & Osborne, C. M. 2001. Survival of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel surfaces in the presence or absence of *Flavobacterium* spp. *Journal of Food Protection*, 64: 1369-1376.
- Bridier, A. Sánchez-Vizueté, P., Guilbaud, M., Piard, J.C., Naïtali, M., Briandet, R. 2014. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiology*, 45: 167-178.
- Brooks, J.D., Flint, S.H. 2008. Biofilm in the food industry: problems and potential solutions. *International Journal of Food Science and Technology*, 43: 2163-2176.
- Brown, M.R., Allison, D.G. y Gilbert, P. 1988. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 22: 777-783.
- Bryaskova, R., Pencheva, D., Kale, G.M., Lad, U. y Kantardjiev, T. 2010. Synthesis, characterization and antibacterial activity of PVA/ TEOS/A-Np hybrid thin films. *Journal Colloid and Interface Science*, 349: 77-85

- Buncic, S., Sofos, J. 2012. Interventions to control *Salmonella* contamination during poultry, cattle and pig slaughter. *Food Research International*, 45: 641-655.
- Burfoot, D., Reavell, S., Tuck, C. y Wilkinson, D. 2003. Generation and dispersion of droplets from cleaning equipment used in the chilled food industry. *Journal of Food Engineering*, 58: 343-353.
- Burmølle, M., Webb, J. S., Rao, D. Hansen, L.H., Sørensen, S.J., Kjelleberg, S.. 2006: Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied and environmental microbiology*; 72: 3916-3923
- Busscher, H.J. y Van der Mei, H.C. 1997. Physico-chemical interaction initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Advances in Dental Research*, 11: 24-32.
- Buttner, M.P., Cruz-Pérez, P. y Stetzenbach, L.D. 2001. Enhanced detection of surface-associated bacteria in indoor environments by quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2564-2570.
- Buttner, M.P., Cruz-Pérez, P., Stetzenbach, L.D. y Cronin. 2007. Evaluation of two surface sampling methods for detection of *Erwinia herbicola* on a variety of materials by culture and quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 3505-3510.
- Caballero Torres, A., Grave de Peralta, O., Cárdenas Valdés, T., Carreño, M., Arauz Dihigo, R. y Peraza Escoto, F. 2002. Guía para la confección de programas de limpieza y desinfección en establecimientos de alimentos. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. *Revista Cubana Aliment Nutr.*, 16: 77-80.
- Caballero Torres, A y Lengomín Fernández, M. A. 1998. Causas más frecuentes de problemas sanitarios en alimentos. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. *Revista Cubana Aliment. Nutr.*, 12: 20-23.
- Campbell-Platt. 1995. Fermented meats - A world perspective. *Fermented Meats*. G. Campbell-Platt & P.E. Cook, eds. Glasgow, UK.
- Cao, Z., Sun, Y. y Fong, H. 2009. Rechargeable antibacterial and antifungal polymeric silver sulfadiazines. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 24: 350-367.
- Cápita R., Álvrae Astorga, M., Alonso calleja, C., Moreno, B., García Fernández, M.C. 2003. Occurrence of *Salmonella* in retail chicken carcasses and their products in Spain. *International Journal of Food Microbiology*, 81: 169-173.
- Carpentier, B. y Cerf, O. 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*, 75: 499-511.
- Carpentier, B. 2009. Biofilms in red meat processing. Biofilms in the food and beverage industries. Ed. Fratamico, P.M, Annous, B.A. & Gunther, N.W. 373-395.
- Carpentier, B. y Cerf, O. 2011. Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 145: 1-8.

- Carrasco, E., Rueda, A. y García, R.M. 2012. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. *Food Research International*, 45: 545-556.
- Carrascosa, C., Saavedra, P., Millán, R., Jaber, J.R., Pérez, E., Grau, R., Raposo, A., Mauricio, C y Sanjuán, E. 2012. Monitoring of cleanliness and disinfection in dairies: Comparison of traditional microbiological and ATP bioluminescence methods. *Food Control*, 28: 368-73.
- Carsberg, H.C. 2003. Food Plant Sanitation. *Food Safety Handbook*, ed. Schmidt y Rodrick. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, 383-401.
- Cen, L., Neoh, K.G., Kang, E.T. 2003. Surface functionalization technique for conferring antibacterial properties to polymeric and cellulosic surface. *Langmuir*, 19: 10295-10303.
- Chambless, J.D., Hunt, S.M. y Stewart, P.S. 2006. A three-dimensional computer model of four hypothetical mechanisms protecting biofilms from antimicrobials. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 2005-2013.
- Champiat, D., Matas, N., Monfort, B. y Fraass, H. 2001. Applications of biochemiluminescence to HACCP. *Luminiscence*, 16: 193-198.
- Characklis, W. G. y Marshall, K.C. 1990. Biofilms. Ed. Characklis, W. G. and Marshall, K.C. 1990, John Wiley & Sons, Inc. New York. 195-231.
- Chaturongkasumrit, Y., Takahashi, H., Keeratipibul S., Kuda, T. y Kimura, B. 2011. The effect of polyesterurethane belt surface roughness on *Listeria monocytogenes* biofilm formation and its cleaning efficiency. *Food Control*, 22: 1893-1899.
- Chavarrías, M. 2008. Detección de *Yersinia enterocolitica*. Disponible en <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2008/11/19/181516.php>
- Chen, J. 2003. Contemporary monitoring methods. *Food Safety Handbook*, ed. Schmidt y Rodrick. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, p. 197-210.
- Cheng, Q., Li, C., Pavlinek, V., Saha, P. y Wang, H. 2006. Surface-modified antibacterial TiO₂/ Ag⁺ nanoparticles: Preparation and properties. *Applied Surface Science*, 252: 4154-4160.
- Cheng, Q., Li, J. Teply, B., Sherifi, I., Sung, J., Luther, G., Gu, F. X., Levy, E., Radovic, A.F., Langer, R. y Farokhzad, O.C. 2007. Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials*, 28: 869-876.
- Chmielewski, R.A.N. y Frank, J.F. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*, 2: 22-32.
- Christian, R.R., Manchester, J.T. y Mellor, M.T. 1983. Bacteriological quality of fabrics washed at lower-than-standar temperatures in a hospital laundry facility. *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 591-597.
- Christiansen, L.N., Tompkin, R.B., Shaparis, A.B., Johnston, R.W. y Kautter, D.A. 1975. Effect of sodium nitrite and nitrate on clostridium botulinum growth and toxin production in a summer-style sausage. *Journal of Food Science* 40: 488-490

- Christison, C.A., Lindsay, D. y von Holy, A. 2007. Cleaning and handling implements as potential reservoirs of bacterial contamination of some ready-to-eat foods in retail delicatessen environments. *Journal of Food Protection*, 70: 2878-2883.
- Cockerill, F. y Reischl, U. 2002. Rapid cycle real-time PCR: methods and applications. *Microbiology and Food Analysis*. Berlin: Springer-Verlag, 130.
- Codex Alimentarius FAO/WHO. 2003. Basics Texts Food Hygiene. CAC/RCP 1-1969, Rev. 4-2003, (3):1. Disponible en: http://www.sfi.is/attachments/029_FoodHygiene_2003e.pdf
- Corbitt, A.J., Bennion, N. y Forsythe, S.J. 2000. Adenylate kinase amplification of ATP bioluminescence for hygiene monitoring in the food and beverage industry. *Letters in Applied Microbiology*, 30: 443-447.
- Costa, P.D., Andrade, N.J., Brando, S.C.C., Passos, F.J.V. y Soares, N.F.F. 2006. ATP-bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless Steel milk contact surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36: 345-349.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R. y Lappin-Scott, H.M. 1995. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49: 711-745.
- Costerton, J.W., Stewart, P. y Greenberg, E.P. 1999. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, 5418: 1318-1322.
- Cowan, M.M., Abshire, K.Z., Houk, S.L. y Evans, S.M. 2003. Antimicrobial efficacy of a silver-zeolite matrix coating on satinless steel. *Journal of Industry Microbiology Biotechnology*, 30: 102-106.
- Cuenca Díaz, F.M. 2011. Aplicación de las técnicas de espectroscopía de impedancias y potenciometría para la determinación de la calidad higiénica del jamón curado. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Rural. Universidad de Valencia (España). Tesis.
- Criquelion, J., Durand, F., Olivier, F., Rauwel, G. y Sabat, F. 2002. Características generales de las funciones químicas desinfectantes. *Manual Técnico de Higiene, Limpieza y Desinfección*. Editores: Leveau, J-Y, Bouix, M. Mundi-Prensa, Madrid.
- Dallas, P., Sharma, V.K. y Zboril, R. 2011. Silver polymeric nanocomposites as advanced antimicrobial agents: classification, synthetic paths, applications and perspectives. *Advances in Colloid and Interface Science*, 166: 119-135.
- Dallos, R.A. Técnica de bioluminiscencia del ATP en productos UHT. 2008. Disponible en: http://www.tecnolacteos.com/project/tecnolacteos/resumen/dateien/3M_MLS_Tecnolacteos_2011.pdf
- D'Arcy. 2001. Antimicrobial additive systems see increased use in polymers. *Plastics, Additives and Compounds*, 3: 16-18.
- Davey, M.E. y O'toole, G.A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64: 847-867.
- Davidson, C. A., Griffith, c.J., Peters, A.C. y Fielding, L.M. 1999. Evaluation of two methods for monitoring surface cleanliness- ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing. *Luminiscence*, 14: 3-38.

- De Cesare, A., Sheldon, B.W., Smith, K.S., Jaykus, L-A. 2003. Survival and persistence of *Campylobacter* and *Salmonella* species under various organic loads on food contact surfaces. *Journal of Food Protection*, 66: 1587-1594..
- Denyer, S.P. y Stewart, C.S.A.B. 1998 Mechanisms of action of disinfectants. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 41: 261-268.
- Dhillon. G.S., Kaur, S. y Brar S.K.V. 2014. Facile fabrication and characterization of chitosan-based zinc oxide nanoparticles and evaluation of their antimicrobial and antibiofilm activity. *Int. Nano Lett.*, 4:107
- Dinning, A.J., Al-Adham, I.S.I., Austin, P. and Collier, P.J. 1998. A novel assay for the distribution of pyriithione biocides in bacterial cells. *Letters in Applied Microbiology* , 27: 1-4
- D'Mello, J.P.F. y McDonald, A.M.C. 1997. Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 69: 155-166.
- Donian, R.M. y Costerton, J. W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15: 167-193.
- Dowling, D. P., Donnelly, K., McConnell, M.L., Eloy, R., Arnaud, M.N. 2001. Deposition of anti-bacterial silver coatings on polymeric substrates. *Thin Solid Films*, 398-399: 602-606.
- Duguid, J. P., Anderson, E. S. y Campbell, I. 1966. Fimbriae and adhesive properties in *Salmonella*. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 92: 107.
- Earnshaw, A. M., and L. M. Lawrence. 1998. Sensitivity to commercial disinfectants and the occurrence of plasmids within various *Listeria monocytogenes* genotypes isolated from poultry products and the poultry-processing environment. *Journal of Applied Microbiology*, 84: 642-648.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2009. The community summary report on food-borne outbreaks in the European Union in 2007. 271: 128.
- EFSA/ ACSA (Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria). 2005. Dictamen del Grupo Científico de Peligros Biológicos sobre una solicitud de la Comisión en relación con *Clostridium* spp . en productos alimentarios(EFSA-Q-2004-009). Accesible en: <https://www.gencat.cat/salut/acsa/html/es/dir3162/doc11618.html>
- EFSA. Journal 2015; 13 (1): 3991. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3991.pdf>
- EFSA y ECDC, 2012. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. Disponible en <http://www.efsa.europa.eu/de/search/doc/2597.pdf>
- EFSA. (2013). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA Journal*, 11(4), 3129.

Ellis, D.I., Broadhurst, D.; Kell, D. B.; Rowland, J. J.; Goodacre, R. 2002. Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of meat by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. *Applied Environmental Microbiology*, 68: 2822-2828.

Evans, D.J., Allison, D.G., Brown, M.R. y Gilbert, P. 1991. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms towards ciprofloxacin: effect of specific growth rate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 27: 177-184.

Eversdijk, J., Erich, S.J., Hermanns, S.P., Adan, O.C., De Bolle, M., De Meyer, K., Bylemans, D., Bekker, M. y Ten Cate, A.T. 2012. Development and evaluation of a biocide release system for prolonged antifungal activity in finishing materials. *Progress in Organic Coatings*, 74: 640-644.

Faille, C. y Carpentier, B. 2009. Food contact surfaces, surface soiling and biofilm formation. Ed. P. M. Fratamico, B. A. Annous, & N. W. Gunther. *Biofilms in the food and beverage industries*, 304-330. Oxford, Cambridge, New Delhi: Woodhead Publishing Limited.

Felice, C.J. 2005 Monitor digital de microorganismos: aspectos teóricos y prácticos. Dpto. Bioingeniería del INSIBIO, UNT. Argentina. Tesis.

Fente Sampayo, C. A.; Vázquez Belda, B. ; Rodríguez Otero, J. L. ; Franco-Abuin, C. ; Quinto-Fernández, E. y Cepeda-Saez, A. 2002. Microflora predominante en las queserías de Arzúa (España). *Journal of Food*, 3: 271-276.

Fernández, P. 2008. Detección rápida de contaminación microbiana de alimentos 2008. Aplicación del sistema Bactrac Impedancia Eléctrica en alimentación. Disponible en: http://www.cresca.upc.es/sites/default/files/docs/3.%20Ejemplo%20aplicaci%C3%B3n_JUVER.PDF

Ferreira, V., Barbosa, J., Stasiewicz, M., Vongkamjan, K., Moreno Switt, A., Hogg, T., Gibbs, P., Teixeira, P., Wiedmann, M. 2011. Diverse geno- and phenotypes of persistent *Listeria monocytogenes* isolates from fermented meat sausage production facilities in Portugal. *Applied of Environmental Microbiology*, 77: 2701-2715.

Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., & Stasiewicz, M. J. 2014. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of Food Protection*, 77: 150-170.

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.

Fischer, G., Dott, W. 2003. Relevance of airborne fungi and their secondary metabolites for environmental, occupational and indoor hygiene. *Archives of Microbiology*, 179: 75-82.

Flemming, H.C. y Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8: 623-633.

Flint, S.H., Brenner, P.J. y Brooks, J.D. 1997. Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. *Biofouling*, 11: 81-97.

Forsythe, S. J. The microbiology of safe food. 2010. 2nd ed. Ed. Wiley-Blackwell. Malasya.

- Fox, E., Hunt, K., O'Brien, M., Jordan, K., 2011. *Listeria monocytogenes* in Irish farmhouse cheese processing environments. *International Journal of Food Microbiology*, 145 (Suppl. 1), S39-S45.
- Frank, J.F. y Chmielewski, R.A. 1997. Effectiveness of sanitation with quaternary ammonium compound or chlorine on stainless steel and other domestic food-preparation surfaces. *Journal of Food Protection*, 60: 1-6.
- Frantsen, J.E. y Mathiesen, T. 2009. Specifying stainless Steel surfaces for the brewery, dairy and pharmaceutical sectors. Disponible en: http://www.forcetechnology.com/NR/rdonlyres/D1E1985C-50B1-42F7-B21B-EA93600558EA/2414/090527_NACE_Corrosion_2009_Paper_09373_web1.pdf
- Fukushima, H., Katsube, K., Hata, Y., Kishi, R. y Fujiwara, S. 2007. Rapid separation and concentration of food-borne pathogens in food samples prior to quantification by viable-cell counting and real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 92-100.
- Fung, D.Y.C. 2002. Rapid Methods and Automation in Microbiology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1: 3-22.
- Fuster-Valls, N., Hernandez-Herrero, M., Marín-de Mateo, M. y Rodríguez-Jeréz, J.J. 2008. Effect of different environmental conditions on the bacterial survival on stainless steel surfaces. *Food Control*, 19: 308-314.
- García A., 1989. Programa de limpieza e higiene. *Alimentaria*, 3: 29-50.
- Garret, T.R., Bhakoo, M. y Zhang, Z. 2008. Bacterial adhesión and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18: 1049-1056.
- Gasnov, U., Hughes, D. y Hansbro, P.M. 2005. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. And *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 851-875.
- Gata Díaz, J. Á., Cuesta Bertomeu, I., Frías Mora, J. J., Santiago Millán, M., Amaro López, M. A. 2007. La verificación del procedimiento de limpieza y desinfección en matadero mediante el análisis de superficies. *Eurocarne*, 162.
- Gerba, C.P. y Kennedy, D. 2007. Enteric virus survival during household laundering and impact of disinfection with sodium hypochlorite. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 4425-4428.
- Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Doulgeraki, A. y Nychas, G.-J. 2013. Co-Culture with *Listeria monocytogenes* within a dual-species biofilm community strongly increases resistance of *Pseudomonas putida* to benzalkonium chloride. *PLoS One*: 8 (10) 77276
- Gibson, H., Taylor, J.H., Hall, K.E., Holah, J.T. 1999. Effectiveness of cleaning techniques used in food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 87: 41-48.
- Gilbert, P., Collier, P.J. y Brown, M.R. 1990. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy and stringent response. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34: 1865-1868.

Giménez Torres, E. 2011. Nuevos Materiales Poliméricos Nanoestructurados. XIII Jornada de Materiales de la Universidad Carlos III de Madrid. Disponible en: http://e-archivo.uc3m.es/bitstream/handle/10016/11833/nuevos_gimenez_JMCIII_2011.pdf?sequence=1

Gill, C.O. y Jones, T. 1995. The presence of *Aeromonas*, *Listeria* and *Yersinia* in carcass processing equipment at two pig slaughtering plants. *Food Microbiology*, 12: 135-141

Girón Hernández, L.J., Grau Meló, R. 2009. Aplicación de la Técnica de espectrofotometría de infrarrojo cercano (SW-NIR) para determinación de la frescura de carne de pollo fileteada y envasada. Universitat Politècnica de València. Servicio de Alumnado. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10251/14421>

Glinel, K., Thebault, P., Humblot, V., Pradier, C.M. y Jouenne, T. 2012. Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches. *Acta Biomaterialia*, 8: 1670-1664.

Goh, S.G. Leili, A.-H., Kuan, C.H., Loo, Y.Y., Lye, Y.L., Chang, W.S., Soopna, P., Najwa, M.S., Huat Tang, J.Y., Yaya, R., Nishibuchi, M., Nakaguchi, Y. y Son, R. 2014. Transmission of *Listeria monocytogenes* from raw chicken meat to cooked chicken meat through cutting boards. *Food Control*, 37: 51-55

Gómez, D., Ariño, A., Carramiñana, J.J., Rota, C. y Yangüela, J. 2012. Sponge versus mini-roller for the surface microbiological control of *Listeria monocytogenes*, total aerobic mesophiles and *Enterobacteriaceae* in the meat industry. *Food Control*, 27: 242-247

González, B. 2009. Enfermedades de Transmisión Alimentaria. *Revistas Énfasis. Alimentación*. Disponible en: <http://www.alimentacion.enfasis.com/articulos/14765-enfermedades-transmision-alimentaria->

González Redondo, P., Velarde Gómez, L., Guerreiro Herrero, L. y Fernández-Cabanás, V.M. Composición química de la carne de conejo silvestre (*Oryctolagus cuniculus*) y viabilidad de su predicción mediante espectroscopía de infrarrojo cercano. *ITEA*, vol 106 (3), p. 184-196. 2010.

Gots, R.E., Layton, N. y Pirages, S. 2003. Indoor health: Background levels of fungi. *AHIA Journal*, 64: 427-438.

Gracias, K.S. y McKillip, J.L. 2004. A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food. *Canadian Journal Microbiology*, 50: 883-890.

Green Brown, L., Khargonekar, S., Bushnell, L. y The Environmental Health Specialists Network Working Group. 2013. Research Note Frequency of Inadequate Chicken Cross-Contamination Prevention and Cooking Practices in Restaurants. *Journal of Food Protection*, 76: 2141-2145.

Griffiths, M.W. 1996. The role of ATP bioluminescence in the food industry: new light on old problems. *Food Technology*, 50: 7.

Griffiths, M.W. 1997. Rapid microbiological methods with hazard analysis critical control point. *Journal of AOAC International*, 80: 1143-1150.

Grönholm, L., Wirtanen, G., Ahlgren, K., Nordström, K. y Sjöberg, A.M. 1999. Screening of antimicrobial activities of disinfectants and cleaning agents against foodborne spoilage microbes. *Z Lebensm Unters Forsch A*, 208: 289-298.

Gudbjörnsdóttir, B., Suihko, M-L., Gustavsson, P., Thorkelsson, G., Salo, S., Sjöberg, A.-M., Niclasen, O y Bredholt, S. 2004. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. *Food Microbiology*, 21: 217–225

Guzel-Seydim, Z.B., Greene, A.K. y Sydim, A.C. 2004. Use of ozone in the food industry. *LWT-Food Science and Technology*, 37: 453-460.

Habimana, O. Heir. E., Langsrud, S., Åsli, A.W. y Møretrø, T. 2010. Enhanced surface colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in biofilms formed by an *Acinetobacter calcoaceticus* isolate from meat-processing environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 4557-4559.

Haeghebaert, S., Sulem, P., Deroudille, L., Vanneroy-Adenot, E., Bagnis O. y Bouvet, P. 2003. Two outbreaks of *Salmonella enteritidis* phage type 8 linked to the consumption of *Cantal* cheese made with raw milk, France, 2001. *Eurosurveillance*, 8: 151-156

Halberg Larsen, M., Dalmasso, M, Ingmer, H., Langsrud, S., Malakauskas, M., Mader, A., Møretrø, T., Možina, S.S., Rychli, K. Wagner, M, Wallace, R.J., Zentek, J. y Jordan, K. 2014. Persistence of foodborne pathogens and their control in primary and secondary food production chains. *Food Control*, 44: 92-109.

Hald, T. , Wingstrand, A., Swanenburg, M., von Altröck, A., Thorberg, B.M. 2003. The occurrence and epidemiology of *Salmonella* in European pig slaughterhouses. *Epidemiology and Infection*, 131: 1187-1203

Healy, B., Cooney, S., O'Brien, S., Iversen, C., Whyte, P., Nally, J., et al. (2010). *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*): an opportunistic foodborne pathogen. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7: 339-350.

Hein, I., Flekna, G., Krassnig, M. y Wagner, M. 2006. Real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. In food: An alternative approach to a conventional PCR system suggested by the FOOD-PCR project. *Journal of Microbiological Methods*, 66: 538-547.

Herman, B. 1998. Fluorescence microscopy. 2nd edn. Springer-Verlag, New York.

Hermidia, M., Taboada, M., Menéndez, S. y Rodríguez Otero, J.L. 2000. Semi-automated direct epifluorescent filter technique for total bacterial count in raw milk. *Journal of AOAC International*, 83: 1345-1348.

Herruzo, R. 2000. Desinfectantes españoles para el siglo XXI. *Anuales de la Real Academia Nacional de Medicina*, 791-806.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. y Watson, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nat. Biotechnology*, 11: 1026-1030.

Hirai, Y. 1991. Survival of bacteria under dry conditions; from a viewpoint of nosocomial infection. *Journal of Hospital Infection*, 19: 191-200.

Hofbauer, W., Krueger, N. Mayer, F. y Breuer, K.. 2011. Biocide Tolerance in Microorganisms with Respect to Durability of Building Coatings. XII DBMC (International Conference on Durability on Building Materials and Components) , Porto, Portugal. Disponible en: <http://www.irbnet.de/daten/iconda/CIB22572.pdf>

- Holah, J.T., Betts, R. P. y Thorpe, R. H., 1988. The use of direct epifluorescence microscopy (DEM) and the direct epifluorescent filter technique (DEFT) to assess microbial populations on food contact surfaces. *Journal of Applied and Bacteriology*, 65: 215-221.
- Holah, J.T., Higgs, C., Robinson, S., Worthington, D. y Spenceley, H. 1990. A conductance-based surface disinfection test for food hygiene. *Letters in Applied Microbiology*, 11: 255-259.
- Holah, J.T. y Thorpe, R.H. 1990. Cleanability in relation to bacterial retention on unused and abraded domestic sink materials. *Journal of Applied Microbiology*, 69: 599-608.
- Holah, J.T. 1995. Progress report on CEN/TC 216/working group 3: Disinfectant test methods for hygiene, institutional, industrial and domestic applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 36: 355-365.
- Holah, J.T., Taylor, J.H., Dawson, D.J. y Hall, K.E. 2002. Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 111S-120S.
- Holah, J.T. 2014 Hygiene factory design for food processing. *Hygiene in Food Processing* (Second Edition). Principles and Practice. 53-90.
- Holch, A., Webb, K., Lukjancenko, O., Ussery, D., Rosenthal, B.M., Gram, L., 2013. Genome sequencing identifies two nearly unchanged strains of persistent *Listeria monocytogenes* isolated at two different fish processing plants sampled 6 years apart. *Applied Environmental Microbiology*, 79: 2944-2951.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R. y Gelfand, D.H. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 88: 7276-7280.
- Hood, S.K. y Zottola, E.A. 1995. Biofilms in food processing. *Food Control*, 6: 9-18.
- Hood, S.K. y Zottola, E.A. 1997. Growth media and surface conditioning influence the adherence of *Pseudomonas fragi*, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* cells to stainless steel. *Journal of Food Protection*, 60: 1034-1037.
- Hood, S.K. y Zottola, E.A. 1997. Isolation and identification of adherent Gram-negative microorganisms from four meat-processing facilities. *Journal of Food Protection*, 60: 1135-1138.
- Hoorfar, J., Malorny, B., Abdulmawjood, A., Cook, N., Wagner, M. y Fach, P. 2004. Practical considerations in design of international amplification controls for diagnostic PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 1863-1868.
- Horváth, K., Seregély, Z., Andrassy, e., Dalmadi, I., Farkas, J. 2008. A preliminary study using near infrared spectroscopy to evaluate freshness and detect spoilage in sliced pork meat. *Acta Alimentaria*, 37: 93-102.
- Houry A., Gohar, M., Deschamps, J., Tischenko, E., Aymerich, S., Gruss, A. y Briandet, R. 2012. Bacterial swimmers that infiltrate and take over the biofilm matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109:13088–13093

- Hui, Y.H., Nip, W. y Gorham, J.R. 2003. Chapter 3: The FDA's GMP's, HACCP and the Food Code. En Food Plant Sanitation. Ed. Hui, Bruinsma, Gorham, Nip, Tong y Ventresca. Marcel Dekker, Inc. New York, p. 31-50
- Humphrey, T.J., Martin, K. W. y Whitehead, A. 1994. Contamination of hands and work surfaces with *Salmonella enteritidis* PT4 during the preparation of egg dishes. *Epidemiology and Infection*, 113: 403-409.
- Hunter, C. J. y Bean, J. F. 2013. Cronobacter: an emerging opportunistic pathogen associated with neonatal meningitis, sepsis and necrotizing enterocolitis. *Journal of Perinatology*, 33: 581-585.
- Hüsmark, U. y Rönner, U. 1990. Forces involved in adhesion of *Bacillus cereus* spores to solid surfaces under different environmental conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 69: 557-562.
- ICMSF. 2011. Use of data for assessing process control and product acceptance. *Microorganisms in Foods 8*. Springer Science+Business media.
- Imokawa, G., Shimizu, H. y Okamoto, K. Antimicrobial effect of zinc pyrithione. 1982. *Cosmet. Chem.*, 33: 27-37.
- Ingham, S., Becker, K. y Fanslau, M. 2003. Comparison of the Baird-Parker agar and 3M Petrifilm Staph Express Count Plate methods for enumeration of *Staphylococcus aureus* in naturally and artificially contaminated foods. *Journal of Food Protection*, 66: 2151-2155.
- Iversen, C., Druggan, P. y Forsythe S. 2004. A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. *International Journal of Food Microbiology*, 96: 133-139.
- Izano, E.A., Amarante, M.A., Kher, W.B., Kaplan, J.B. 2008. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Applied Environmental Microbiology*, 74: 470-476
- Jackson, L.A., Keene, W.E., McAnulty, J.M., Alexander, E., Diermayer, M., Davis, M., Hedberg, K. Boase, J., Barret, T.J., Samadpour, M. y Fleming, D.W. 2000. Where's the beef?: The role of cross-contamination in 4 chain restaurant-associated outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 in the Pacific Northwest. *Archives of International Medicine*, 160: 2380-2385.
- Jahid, I.K. y Ha, S.-D. 2012. A Review of Microbial Biofilms of Produce: Future Challenge to Food Safety. *Food Science and Biotechnology*, 21: 299-316.
- Janning, B., Veld, P.H., Notermans, S. y Krämer, J. 1994. Resistance of bacterial strains to dry conditions: use of anhydrous silica gel in a desiccation model system. *Journal of Applied Bacteriology*, 77: 319-324.
- Jansen, B. y Kohnen, W. 1995. Prevention of biofilm by polymer modification. *Journal of Industrial Microbiology*, 15: 391-396.
- Jarvis, B.B. 2002. Chemistry and toxicology of molds isolated from water-damaged buildings. Mycotoxins and Food Safety. Editores: DeVries, J.W., Trucksess, M.W., Jackson, L.S. Kluwer Academic/Plenum. New York.

Johansson, I. y Somasundaran, P. 2007. Handbook for cleaning/decontamination of surfaces. Elsevier. Amsterdam, Holanda.

Jones, A. 2009 Choosing antimicrobial additives for plastics. *Plastics, Additives and Compounding*, 11: 26-28.

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

Kakurinov, V. 2014. Food safety assurance systems: Cleaning and Disinfection. *Encyclopedia of Food Safety*, 4: 211-225

Kamgang-Youbi, G., Herry, J.M., Meylheuc, T., Brisset, J.L., Bellon-Fontaine, M.N., Doubla, A. y Naitali, M. 2009. Microbial inactivation using plasma-activated water obtained by gliding electric discharges. *Letters of Applied Microbiology*, 48: 13-18.

Kastbjerg, V. G. Y Gram, L. 2009. Model systems allowing quantification of sensitivity to disinfectants and comparison of disinfectant susceptibility of persistent and presumed nonpersistent *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, 106: 1667-1681.

Keith, M. 1997. Evaluation of an automated enzyme-linked immunoassay system for the detection of Salmonella in foods. *Journal of Food Protection*, 60: 682-685.

Khamisse, E., Firmesse, O., Christieans, S., Chassaing D. y Carpentier, B. 2012. Impact of cleaning and disinfection on the non-culturable and culturable bacterial loads of food-contact surfaces at a beef processing plant. *International Journal of Food Microbiology*, 158: 163-168.

Khan, S.T., Ahamed, M., Al-Khedhairi, A. y Musarrat, J. 2013. Biocidal effect of copper and zinc oxide nanoparticles on human oral microbiome and biofilm formation. *Material Letters*, 97: 67-70.

Kiepek-Pearson, K.; Karatan, E. 2005. Biofilm development in bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 79-111.

Kiermeier, F; Wildbrett, G. y Mrozek, H. 2000. Productos químicos auxiliares para la limpieza y desinfección. *Limpieza y Desinfección de la Industria Alimentaria*. Ed. Wildbrett, G. Acribia, Zaragoza.

Klein, D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8: 257-260.

Kraigsley, A., Ronney, P.D. y Finkel, S.E. 2002. Dynamics of self-propagating fronts of motile bacteria. Disponible en: <http://carambola.usc.edu/research/biophysics/BacterialFronts.html>

Kristensen, J.B., Meyer, R.L., Laursen, B.S., Shipovskov, S., Besenbacher, F. y Poulsen, c.H. 2008. Antibiofouling enzymes and the biochemistry of marine settlement. *Biotechnology Advances*, 26: 417-481.

Kumar, C.G. y Anand, S.K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42: 9-27.

- Kusumaningrum, H.D., Riboldi, G., Hazeleger, W.C. y Beumer, R.R. 2003. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology*, 85: 227-236.
- Kusumaningrum, H.D., Van Asselt, E.D., Beumer, R.R. y Zwietering, M.H. 2004. A quantitative analysis of cross-contamination of Salmonella and Campylobacter spp. via domestic kitchen surfaces. *Journal of Food Protection*, 9: 1824-2074.
- Lagaron, J.M., Ocio, M.J., Rubio, A. 2012. Antimicrobial polymers. Publicado por John Wiley & Sons, INC., Hoboken, New Jersey.
- Lai, K. K. 2001. Enterobacter sakazakii infections among neonates, infants, children, and adults e case reports and a review of the literature. *Medicine*, 80: 113-122.
- Langsrud, S., Sidhu, M.S., Heir, E. y Holck, A.L. 2003. Bacterial disinfectant resistance: a challenge for the food industry. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 51: 283-290.
- Lelieveld, H.L., Mostert, M.A., Holah, J. y White, B. 2003. Hygiene in food processing. CRC Press LLC. Boca Ratón, FL, EEUU.
- Lepot, N., Van Bael, M.K., Van den Rul, H. D'Haen, J., Peeters, R., Franco, D. y Mullens, J.. 2010. Influence of incorporation of ZnO nanoparticles and biaxial orientation on mechanical and oxygen barrier properties of polypropylene films for food packaging applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 120: 1616-1623
- Leveau, J. y Bouix, M. 2002. Manual técnico de higiene, limpieza y desinfección. Antonio Madrid Vicente. Madrid, España.
- Lewis, K. 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 999-107.
- Li, Y., Dick, W.A. y Tuovinen, O.H. 2004. Fluorescence microscopy for visualization of soil microorganisms – a review. *Biology and Fertility of Soils*, 39: 301-311.
- Li, Z., Lee, D., Sheng, X., Cohen, R.E., Rubner, M.F. 2006. Two-level antibacterial coating with both release-killing and contact-killing capabilities. *Langmuir*, 22: 9820-9823.
- Lichtman, J.W. y Conchello, J.A. 2005. Fluorescence microscopy. *Nature Methods*, 2: 910-919.
- Lin, J., Qiu, S., Lewis, K. y Kilbanov, A. 2002a. Bactericidal properties of flat surfaces and nanoparticles derivatized with alkylated polyethylenimines. *Biotechnology Progress*, 18: 1082-1086.
- Lin J., Tiller, J.C., Lee, B.S., lewis, K., Kilbanov, M.A. 2002b. Insights into bactericidal action of surface-attached poly(vinyl-N-hexylpyridinium) chains. *Biotechnology Letters*, 24: 801-805.
- Lin, M. Al-Holy, M., Mousavi-Hesary, M., Al-Qadiri, H., Cavinato, A.G. y Rasco, B.A. 2004. Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage in chicken meat by diffuse reflectance spectroscopy (600–1100 nm). *Letters in Applied Microbiology*, 39: 148-155.
- Lindsay, d. y von Holy, A. 1997. Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms. *Food Microbiology*, 14: 383-390.

- Linsebigler, A., Lu, G., Yates, J. 1995. Photocatalysis on TiO₂ surfaces: Principles, mechanisms and selected results. *Chemical Reviews*, 95: 735-758.
- Liu, X., Tang, B., Gu, Q. y Yu, X. 2014. Elimination of the formation of biofilm in industrial pipes using enzyme cleaning technique. *MethodsX*, 1: 130-136.
- Liu, Y., Yang, S.-F., Li, Y., Xu, H., Quin, L. y Tay, J.-H. 2004. The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment. *Journal of Biotechnology*, 110:251-256.
- Liu, Y., Li, J., Qiu, X., Burda, C. 2007. Bactericidal activity of nitrogen doped metal oxide nanocatalysts and the influence on bacterial extracellular polymeric substances. *Journal of Photochemistry and Photobiology A*, 190: 94-100.
- Lourenco A., Neves E., Brito L. 2009: Susceptibility of *Listeria monocytogenes* from traditional cheese-dairies to in-use sanitizers. *Food Control*, 20: 585-589.
- Lücke, F.K. 1998. Fermented sausages. *Microbiology of Fermented Foods*, Wood, B.J.B. (ed), 441-483. Blackie Academic and Professional. Londres, Reino Unido.
- Lundén, J.M., Miettinen, M.K., Autio, T.J. y Korkeala, H.J. 2000. Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. *Journal of Food Protection*, 63: 1204-1207.
- Lundén, J.M., Autio, T.J., Sjöberg, A.M y Korkeala, H.J. 2003. Persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants. *Journal of Food Protection*, 66: 2062-2069.
- Luppens, SB, Kara, D, Bandounas L, Jonker MJ, Wittink FR, Bruning O, Breit TM, Ten Cate JM Y Crielaard, W. 2008. Effect of *Veillonella parvula* on the antimicrobial resistance and gene expression of *Streptococcus mutans* grown in a dual-species biofilm. *Oral Microbiol Immunol.*, 23: 183-189.
- Mackay, I.M.. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiological and Infection*, 10: 190-212.
- Mafu, A.A., Roy, D., Goulet, J. y Magny, P. 1990. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact times. *Journal of Food Protection*, 53: 742-746.
- Malachová, K., Praus, P, Rybková, Z. y Kozák, O. 2011. Antibacterial and antifungal activities of silver, copper and zinc montmorillonites. *Applied Clay Science*, 53: 642-645.
- Malorny, B., Hoofar, J., Bunge, C. y Helmunt, R., 2003a. Multicenter validation of the analytical accuracy of Salmonella PCR: towards an international standard. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 290-296.
- Malorny, B., Hoofar, J., Hugas, M., Heuvelink, A., Fach, P., Ellerbroek, L., Bunge, C., Dorn, C. y Helmunt, R., 2003b. Interlaboratory diagnostic accuracy of A Salmonella specific PCR-based method. *International Journal of Food Microbiology*, 89: 241-249.

- Malorny, B., Tassions, P.T., Radstrom, P., Cook, N., Wagner, M. y Hoorfar, J. 2003c. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 83: 39-48.
- Marshall, K.C. 1992. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. *American for Society Microbiology News*, 58: 202-207.
- Martín, B. Garriga, M., Aymerich, T. 2011. Prevalence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* at small-scale Spanish factories producing traditional fermented sausages. *Journal of Food Protection*, 74: 812-815.
- Martín, Perich, A., Gómez, D., Yangüela, J., Rodríguez, A., Garriga, M. y Aymerich, T. 2014. Diversity and distribution of *Listeria monocytogenes* in meat processing plants. *Food Microbiology*, 44: 119-127.
- Martínez, L.C. y Vadyvaloo, V. 2014. Mechanisms of post-transcriptional gene regulation in bacterial biofilms. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 4 : 38.
- Martinon, A., Cronin, U.P., Quealy, J., Stapleton, A. Wilkinson y M.G. 2012. Swab sample preparation and viable real-time PCR methodologies for the recovery of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* or *Listeria monocytogenes* from artificially contaminated food processing surfaces. *Food Control*, 24: 86-94.
- Marzocca, M.A., Marucci, P.L., Sica, M.G. y Álvarez, E.E.. 2006. Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en carne picada y hamburguesas congeladas. *Rev. Argentina de Microbiología*, 38: 38-40.
- Maukonen, J., Mätto, J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila-Shandholm, T., Salo, S. y Saarela, M. 2003. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30: 327-356.
- McDonnell, G. y Russell, A.D. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clinical Microbiology reviews*, 12: 147-179.
- McEldowney, S. y Fletcher, M. 1998. The effect of temperature and relative humidity on the survival of bacteria attached to dry solid surfaces. *Letters in Applied Microbiology*, 7: 83-86.
- McLaughlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W.J., Jewell, K., 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*, 92: 15-33.
- Mead, G. C., & Scott, M. J. 1994. Coagulase-negative staphylococci and coliform bacteria associated with mechanical defeathering of poultry carcasses. *Letters in Applied Microbiology*, 18: 62-64.
- Menéndez García, R.A. 2012. Principales riesgos microbiológicos de los productos cárnicos crudos curados envasados en atmósferas modificadas y/o vacío de interés económico en Castilla y León. Universidad de León, Facultad de Veterinaria, Dpto. de Higiene y Tecnología de los Alimentos.
- Metaxopoulos, J., Genigeorgis, C., Fanelli, M.J., Franti, C. y Cosma, E. 1981a. Production of Italian dry salami. I: Initiation of staphylococcal growth in slami under commercial manufacturing conditions. *Journal of Food Protection*, 44: 347352.

- Metaxopoulos, J., Genigeorgis, C., Fanelli, M.J., Franti, C. y Cosma, E. 1981b. Production of Italian dry salami. II: effect of starter culture and chemical acidulation on staphylococcal growth in slami under commercial manufacturing conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 42: 863-871.
- Mettler, e. y Carpentier, B. 1998. Variations over time of microbial load and physicochemical properties of fillor materials after cleaning in food industry premises. *Journal of Food Protection*, 61: 57-65.
- Midelet, G., & Carpentier, B. 2002. Transfer of microorganisms, including *Listeria monocytogenes*, from various materials to beef. *Applied Environmental Microbiology*, 68: 4015-4024.
- Mittelman, M.W. 1998. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. *Journal of Dairy Science*, 81: 2760-2764.
- Mullane, N., Healy, B., Meade, J., Whyte, P., Wall, P. G., & Fanning, S. 2008. Dissemination of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in a powdered milk protein manufacturing facility. *Applied Environmental Microbiology*, 74: 5913-5917.
- Montañez-Izquierdo, V.Y., Salas-Vázquez, D.I., Rodríguez-Jerez, J.J. 2013. Métodos convencionales, rápidos y alternativos para el control microbiológico de la higiene en las superficies. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Montañez-Izquierdo, V.Y., Salas-Vázquez, D.I., Rodríguez-Jerez, J.J. 2012. Use of epifluorescence microscopy to assess the effectiveness of phage P100 in controlling *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel surfaces. *Food Control*, 23: 470-477.
- Montville, R., Chen, Y. y schaffner, D.W. 2002. Risk assessment of hand washing efficacy using literature and experimental data. *International Journal of Food Microbiology*, 73: 305-313.
- Moore, G. y Griffith, C. 2002. A comparison of surface sampling methods for detecting coliforms on food contact surfaces. *Food Microbiology*, 19: 65-73.
- Moretrø, T y S. Langsrud, S. 2004. *Listeria monocytogenes*: Biofilm Formation and Persistence in Food Processing Environments. *Biofilms*, 1: 107-121.
- Morris, C.E., Monier, J.M. y Jacques, M.A. 1997. Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 1570-1576.
- Moss, M.O. 1999. Spoilage problems-Problems caused by fungi. Encyclopedia of Food Microbiology. Editor: Richard, K.R. Elsevier, Oxford. Reino Unido.
- 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.
- Mota de la Garza, Fernández, E. 2012. Intoxicación estafilocócica por alimentos. Disponible en: <http://www.alimentacion.enfasis.com/articulos/65372-intoxicacion-estafilococica-alimentos>
- Murphy, S.C., Kozlowski, S.M., Bandler, D.K. y Boor, K.J. 1998. Evaluation of Adenosine Triphosphate-Bioluminescence hygiene monitoring for trouble-shooting fluid milk shelf-life problems. *Journal of Dairy Science*, 81: 817-820.

Nakajima, A., Hashimoto, K., Watanabe, T. 2000. Transparent superhydrophobic thin films with self-cleaning properties. *Lamgmuir*, 16: 7044-7047.

Navia, D.P., Villada, H.S. y Mosquera, S.A. 2010. Las biopelículas en la industria de alimentos. *Rev.Bio.Agro*, vol.8 nº.2

Nelson, B.I., Steinmetz, V., Ford, S. y Ong, W.-K. 2010. Antimicrobial zinc pyrithiones composition and method. Disponible en: <http://www.google.es/patents/US20100317640>

Newell, D.G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., Langelaar, M., Threfall, J., Scheutz, F., van der Giessen, J. y Kruse, H. 2010. Food-borne disease – The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, 139: Sup. 1: S3-S15.

NIAID, National Institut Allergy and Infectious Diseases. 2007. Health Science Topics. Foodborne Diseases. Disponible en: <http://www.niaid.nih.gov/topics/foodborne/Pages/Default.aspx>

Nichols, D. 2005. Biocides in plastics. Rapra Review reports, Volumen 15. Editorial Smithers Rapara Publishing, Reino Unido.

Njobuenwu, D.O., Oboho, E.O., Gumus, R.H. 2007. Determination of Contact Angle from Contact Area of Liquid Droplet Spreading on Solid Substrate. *Leonardo Electronic Journal of Practices and Technologies*, 29-38.

Nordal, J. y Gudding, R. 1975. The inhibition of *Clostridium botulinum* type B and E in salami sausage. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 16: 537.

Norwood, D.E. y Gilmour, A. 2000. The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 512-520

Notzon, A., Helmuth, R. y Bauer, J. 2006. Evaluation of an immunomagnetic separation-real-time PCR assay for the rapid detection of *Salmonella* in meat. *Journal of Food Protection*, 69: 2896-2901.

Nugen, S.R. y Baeumner, A.J. 2008. Trends and opportunities in food pathogen detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391: 541-454.

Nyachuba, David, G. 2010. Foodborne illness: is it on the rise?. *Nutrition Reviews*. 68: 257-269.

O’Gorman, J. y Humphreys, H. 2012. Application of copper to prevent and control infection. Where are now?. *Journal of Hospital Infection*, 81: 217-223.

Olschewski, F. 2000. Software in confocal microscopy. *Scientific and Technical Information*. Special Issue “Confocal microscopy”, CDR 4: 28-44.

O’Leary, D., Mc Cabe, E.M., McCusker, M.P., Martins, M., Fanning, S. y Duffy, G. 2013. Microbiological study of biofilm formation in isolates of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104 and DT104b cultured from the modern pork chain. *International Journal of Food Microbiology*, 161: 36-43.

OMS (Organización Mundial de la Salud). 2000. Seventh report of WHO surveillance programme for the control of foodborne infections and intoxications in Europe (1993-1998). Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/dec2000/en

OMS. 2002. Global strategy for food safety: safer food for better health. Disponible en: <http://whqlibdoc.who.int/publications/9241545747.pdf>

OMS. 2006. Consultation to develop a strategy to estimate the global burden of foodborne disease. Taking stock and charting the way forward, 1. Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fbd_2006.pdf

OMS. 2007. Fact sheet N^o 237: Food safety and foodborne illness. Disponible en: http://foodhygiene2010.files.wordpress.com/2010/06/who-food_safety_fact-sheet.pdf

OMS. 2011. *Campylobacter*. Nota descriptiva n^o 255. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/es/>

OMS, 2015. Enfermedades de transmisión alimentaria. Disponible en: http://www.who.int/topics/foodborne_diseases/es/

Ordóñez, J.A. y De la Hoz, L. 2001. Embutidos crudos curados. Tipos. Fenómenos madurativos. A Iteraciones. Bejarano, M. (Ed.). Enciclopedia de la carne y los productos cárnicos. Ediciones Martín y Macías, Plasencia: 1063-1090

Ortiz, S., López, V., Villatoro, D., López, P., Dávila, J.C., Martínez-Suárez, J.V. 2010. A 3-year surveillance of the genetic diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig slaughterhouse and processing plant. *Foodborne Pathog.*, 7: 1177-1184

Ortiz, S. López, V. y Martínez-Suárez, J.V. 2014. Control of *Listeria monocytogenes* contamination in an Iberian pork processing plant and selection of benzalkonium chloride-resistant strains. *Food Microbiology*, 39: 81-88.

Otero Carballeira, 2007: Nuevas técnicas para la detección de microorganismos en los alimentos. Universidad de León, Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Encuentro de Seguridad Alimentaria y Nutrición (2007) Santandee. Disponible en: http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/otras_actividades/UIMP_seg_alimentaria_nutricion/Otero.pdf

Pal, S., Tak, Y.K. y Song, J.M. 2007. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle?. A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 1712-1720.

Palmas, F. y Meloni, V. 1997. Fungi as a occupational health hazard in seasoned-food-industry workwrs. *Environmental Monitoring and Assessment*, 48: 273-284.

Palmer, R.J. y Sternberg, C. 1999. Modern microscopy in biofilm research: confocal microscopy and other approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, 10: 263-284.

Pan, Y., Breidt, F., Jr & Kathariou, S. 2006. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Appl Environ Microbiol*, 72: 7711-7717.

- Panacek, A., Kvítek, L., Pucek, R., Kolar, M., Vecerova, R., Nadezda, P., Sharma, V.K., Nvecna, T. y Zboril, R. 2006. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110: 16248-16253.
- Panisello, P.J., Rooney, R., Quantick, P.C., y Stanwell-Smith, R. 2000. Application of foodborne disease outbreak data in the development and maintenance of HACCP systems. *International Journal of Food Microbiology*, 59: 221-234
- Parisi, A., Latorre, L., Fracalvieri, R., Miccolupo, A., Normanno, G., Caruso, M., Santagada, G., 2013. Occurrence of *Listeria* spp. in dairy plants in Southern Italy and molecular subtyping of isolates using AFLP. *Food Control*, 29: 91-97.
- Pascual, A., Llorca, I. y Canut, A. 2007. Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities. *Trends in Food Science and Technology*, 18: S29-S35.
- Paul, D.R. y Robeson, I.M. 2008. Polymer nanotechnology: Nanocomposites. *Polymer*, 49: 3817-3204.
- Paulo, C.S.O., Vidal, M. y Ferreira, L.S. 2010. Antifungal nanoparticles and surfaces. *Biomacromolecules*, 11: 2810-2817.
- PDA, Parenteral Drug Association (PDA). 1998. Points to consider for cleaning validation. DRAFT, PDA Technical Report nº 29:1. Disponible en: <http://www.pharmanet.oi.com.br/pdf/tr29-002.pdf>
- Perkas, N., Lipovsky, A., Amirian, G., Nitzan, Y. y Gedanken, A. 2013. Biocidal properties of TiO₂ powder modified with Ag nanoparticles. *J. Mater. Chem. B*, 1: 5309-5316
- Peleg, A.Y. y Hooper, D.C. 2010. Hospital-acquired infections due to Gram-negative bacteria. *The New England Journal of Medicine*, 362:1804-1813
- Petty, H.R. 2007. Fluorescence microscopy: Established and emerging methods, experimental strategies and applications in immunology. *Microscopy Research and Technique*, 70: 687-709.
- Peyrat, M.B., Soumet, C., Maris, P. y Sanders, P. 2008. Recovery of *Campylobacter jejuni* from surfaces of poultry slaughterhouses after cleaning and disinfection procedures: Analysis of a potential source of carcass contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 124: 188-194.
- Pickett, E.L. and Murano, E.A. 1996. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to sanitizers after exposure to a chemical shock. *Journal of Food Protection*, 59: 374-378.
- Piedrahita, D., Márquez, T., Máttar, S. 2001. Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en poblaciones porcinas, canal bovina y productos cárnicos en el Departamento de Córdoba. Universidad de Córdoba, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Dpto. de Medicina Animal, Inst. de Invest. Biológicas del Trópico.
- Pontefract, R.D. 1991. Bacterial adherence: its consequences in food processing. *Canadian Institute of Food Science and Technology*, 64: 113-117.

- Poulis, J.A., de Pijper, m., Mossel, D.A.A., Dekkers, P.P.A. 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 . *International Journal of Food Microbiology*, 20: 109-116.
- Prado Marrón, N., Fernández Ibáñez, V., González González, P. y Soldado, A. 2011. On-Site NIR Spectroscopy to Control the Shelf Life of Pork Meat. *Food Analytical Methods*, 4: 582-589.
- Prencipe, V.A., Rizzi, V., Acciari, V., Iannetti, L., Giovannini, A., Serraino, A., Calderone, D., Rossi, A., Morelli, D., Marino, L., Migliorati, G. y Caporale, V. 2012. *Listeria monocytogenes* prevalence, contamination levels and strains characterization throughout the Parma ham processing chain. *Food Control*, 25: 150–158
- Prechter, S., Betz, M., Cerny, G., Wegener, G., & Windeisen, E. 2002. Hygiene aspects of wooden resp. plastic cutting boards. *Holz als Roh-und Werkstoff*, 60, 239–248.
- Prieto, N., Andrés, S. y Lavín, P. 2006. Aplicación de la tecnología NIRS para estimar parámetros indicativos de la calidad de la carne de vacuno. Univ, de León. Disponible en: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/21982/1/Tesis.pdf>
- Rai, M.K., Yadav, A. y Gade A. 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advance*, 27: 76-83.
- Rai, M.K., Deshmukh, S.D., Ingle, A.P. y Gade A.K. 2012. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiolgy*. 112: 841-852.
- Ravishankar, S. y Juneja, V.K. 2003. Adaptation or Resistance responses of microorganisms to stresses in the food processing environment. *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*, ed. Yousef y Juneja. CRC Press LLC. London, p. 105-108.
- Reddy, K.R.N., Salleh, B. Saad, B., Abbas, H.K., Abel. C.A. y Shier, W.T. 2010. An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Review*, 29: 3-26.
- Reij, M. W., Den Aantrekker, E. D., & ILSI Europe Risk Analysis in Microbiology Task Force. 2004. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology*, 91: 1-11.
- Restrepo Molina, D.A., Arango, C.M., Amézquita Campuzano, A. y Restrepo Digiammarco, R.A. 2001. Industria de Carnes. Ed. Universidad de Colombia, Medellín.
- Reuben, A., Treminio, H., Arias, M.L. y Chaves, C. 2003. Presencia de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. en alimentos de origen animal en Costa Rica. *ALAN (Archivos Latinoamericanos de Nutrición)*, vol 53, nº 4.
- Rice, K.C., Mann, E.E., Endres, J.L., Weiss, E.C., Cassat, J.E., Smeltzer, M.S. y Bayles, K.W. 2007. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academi of Sciences of the U S A.*, 104: 8113-8118.
- Rinnan, R., Rinnan A. 2007. Application of near infrared reflectance (NIR) and fluorescence spectroscopy to analysis of microbiological and chemical properties of arctic soil. *Soil biology and Biochemistry*, 39: 1664-1673

- Robine, E., Derangere, D. y robin, D. 2000. Survival of a *Pseudomonas fluorescens* and *Enterococcus faecalis* aerosol in inert surfaces. *International Journal in Food Microbiology*, 55: 229-234.
- Rodrigues, L.C., Cowden, J.M., Wheeler, J.G., Sethi, D., Wall, P.G., Cumberland, P., Tompkins, D.S., Hudson, M.J., Roberts, J.A. y Roderick, P.J. 2001. The study of infectious intestinal disease in England: risk factor for cases of infectious intestinal disease with *Campylobacter jejuni* infection. *Epidemiology and Infection*, 127: 185-193.
- Rodríguez Lázaro, D., Hernández, M., Esteve, T., Hoorfar, J. y Pla, M. 2003. A rapid and direct real time PCR-based method for identification of *Salmonella* spp. *Journal of Microbiological Methods*, 54: 381-390.
- Rodríguez Martínez, R. 2011. Empleo de la técnica hibridación in situ fluorescente para visualizar microorganismos. *Revista Salud UIS*, 4: 307-316.
- Rodriguez, A. y McLandsborough, L. A. 2007. Evaluation of the transfer of *Listeria monocytogenes* from stainless steel and high-density polyethylene to Bologna and American cheese. *Journal of Food Protection*, 70, 600-606.
- Rosenquist, H., H.M. Sommer, N.L. Nielsen y B.B. Christensen. 2006. The effect of slaughter operations in the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. *International Journal of Food Microbiology*, 108: 226-232.
- Rubio Lozano, M.S., Martínez Bruno, J. F., Hernández Castro, R., Bonilla Contreras, C., Méndez Medina, R.D., Núñez Espinosa, J.F., Echeverry, A. y Brashears, M.M. 2013. Detección de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Yersinia enterocolitica* en carne de res en puntos de venta en México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 4:107-115.
- Rückerl, I., Muhterem-Uyar, M., Muri-Klinger, S., Wagner, K.-H., Wagner, M. y Stessl, B. 2014. *L. monocytogenes* in a cheese processing facility: Learning from contamination scenarios over three years of sampling. *International Journal of Food Microbiology*, 189: 98-105
- Ruparelia, J.P., Chartterjee, A.K., Duttagupta, S.P. y Murkherji, S. 2008. Strain specific in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 4: 707-716.
- Russell, A.D. 2000. Comparison of the traditional three-tube Most Probable Number method with Petrifilm, SimPlate, BioSys Optical and Bactometer Conductance methods for enumerating *Escherichia coli* from chicken carcasses and ground beef. *Journal of Food Protection*, 63: 1179-1183.
- Russell, A.D. 2002. Antibiotic and biocide resistance in bacteria: Introduccion. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 171S-173S.
- Russell, A.D. 2002. Antibiotic and biocide resistance in bacteria: Comments and conclusions. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 171S-173S.
- Russell, A.D. 2002. Mechanisms of antimicrobial action on antiseptics and disinfectants: an increasingly important area of investigation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49: 597-599.

- Ryan, M. J., Wall, P. G., & Gilbert, R. J. 1996. Risk factors for outbreaks of infectious intestinal disease linked to domestic catering. *Communicable Disease Report*, 6, 179–183.
- Ryu, J.H., Beuchat, L.R. 2005. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and Curli production on its resistance to chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 247-254
- Salim Ammor, S., Cinta Rachman, C., Chaillou, S., Prévost, H., Dousset, X., Zagorec, M., Dufour, E. y Chevallier, I. 2004. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiology*, 22: 373-382.
- Sanderson, S.S., and Stewart, P.S. 1997. Evidence of bacterial adaptation to monochloramine in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and evaluation of biocide action model. *Biotechnol Bioeng*, 56: 201–209
- 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. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 962-970.
- Sauer, K. 2003. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biology*, 4: 219.1-219.5.
- Sawai, J., Kawada, E., Kanou, F., Igarashi, H. Hashimoto, A., Kokugan, T. y Shimizu, M. 1996. Detection of active oxygen generated from ceramic powders having antibacterial activity. *Journal of Chemical*, 29: 627-633.
- Sawai, J., Shoji, S., Igarashi, H., Hashimoto, A., Kokugan, T., Shimizu, M. y Koljima, H. 1998. Hydrogen peroxide as an antibacterial factor in zinc oxide powder slurry. *Journal of Fermentation Bioengineering*, 86: 521-522.
- Sewell, A.M., Warburton, D.W., Boville, a., Daley, E.F. y Mullen, K. 2003. The development of an efficient and rapid enzyme linked fluorescent assay method for the detection of *Listeria* spp. from foods. *International Journal of Food Microbiology*, 81: 123-129.
- Seyfriedsberger, G., Rametsteiner, K. y Kern, W. 2006. Polyethylene compounds with antimicrobial surface properties. *European Polymer Journal*, 42: 3383-3389.
- Sharma, D., Rajput, J., Kainth, B.S., Kaur, M. y Sharma S. 2010. Synthesis of ZnO nanoparticles and study of their antibacterial and antifungal properties. *Biomolecular Electronics and Organic Nanotechnology for Environmental Preservation: Thin Solid Films*, 519: 1224-1229.
- Sharma, M. y Anand, S.K. 2002. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/ dairy processing industry - a case. *Food Control*, 136: 469-477.
- Shi, X. y Zhu, X. 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science and Technology*, 20: 407-413.
- Shi, Z., Neoh, K.G., Kang, E.T. 2004. Antibacterial activity of polymeric substrate with surface grafted viologen moieties. *Biomaterials*, 26: 501-508.
- Sidhu, M., Langsrud, S. y Holck, A. 2001. Disinfectant and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from food industry. *Microbial Drug Resistance*, 7: 73-83

- Silbernagel, K. y Lindberg, K. 2002. Evaluation of the 3M Petrifilm Enterobacteriaceae Count Plate method for the enumeration of Enterobacteriaceae in foods. *Journal of Food Protection*, 65: 1452-1456.
- Simard, R. E., Auclair, G. 1981. Niveau de contamination microbiologique de quelques établissements d'abattage et de charcuterie "Approuvé Canada". *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 14, 128-134.
- Simões M, Simões L C, Vieira M J. 2009. Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. *Water Research*, 43, 229-237.
- Simões, M., Simões, L. y Vieira, J. 2010. A review of current and emergent biofilm strategies. *Food Science and Technology*, 43: 573-575.
- Singh, J. 2005. Toxic moulds and indoor air quality. *Indoor and Built Environment*, 14: 229-234.
- 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. *Carbohydrate Polymers*, 79: 717-723.
- Skaar, I., Kure, C.F. y Brendehaug, J. 2004. Mould contamination in production of semi-hard cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 93: 41-49.
- Socias, A. 1992. La higiene en la industria cárnica. *Eurocarne*, 15-16.
- Solís, M., De Pedro, E., Garrido, A., García, J., Silió, L., Rodríguez, C. y Rodríguez, J. 2001. Evaluación de la composición del lomo de cerdo ibérico mediante la tecnología NIRS. Universidad de Córdoba, Dpto. de Producción Animal.
- Somers, E. B., & Wong, A. C. L. 2004. Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. *Journal of Food Protection*, 67: 2218-2229.
- Sondi, I. y Salopek-Sondi, B. 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275: 177-182.
- Stanfield, P. 2003. Cleaning and sanitizing a food plant. *Food Plant Sanitation*, ed. Hui, Bruinsma, Gorham, Nio, Tong y Ventresca. Marcel Dekker, Inc. New York. 101-114.
- Stevens KN, Croes S, Boersma RS, Stobberingh EE, van der Marel C, van der Veen FH, Knetsch ML, Koole LH. 2011. Hydrophilic surface coatings with embedded biocidal silver nanoparticles and sodium heparin for central venous catheters. *Biomaterials*, 32:1264-1269.
- Stoimenov, P., Klinger, R., Marchine, G.L. y Klabunde, K.J. 2002. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir*, 18: 6679-6686.
- Sutherland, I.W. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147: 3-9.

- Swanenburg, M., Urlingsa, H.A.P., Snijdersb, J.M.A., Keuzenkampb, D.A. y van Knapenb, F. 2001. *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. *International Journal of Food Microbiology*, 70:243-54.
- Swartz, M. N. 2002. Human diseases caused by foodborne pathogens of animal origin. *Clinical Infectious Disease*, 34, 111–122
- Szomolay, B., Klapper, I. Dockery, J. Stewart, P.S. 2005. Adaptive responses to antimicrobials in biofilms. *Environmental Microbiology*, 7: 1186-1191.
- Takeuchi, K. y Frank, J.F. 2001. Confocal microscopy and microbial viability detection for food research. *Journal of Food Protection*, 64: 2088-2102.
- Talon, R., Lebert, I., Lebert, A., Leroy, S., Garriga, M., Aymerich, T., Drosinos, E.H., Zanardi, E., Ianieri, A., Fraqueza, M.J., Patarata, L. y Lauková, A. 2007. Traditional dry fermented sausages produced in small-scale processing units in Mediterranean countries and Slovakia. 1: Microbial ecosystems of processing environments. *Meat Science*, 77: 570–579
- Tauxe, R. V. 1991. *Salmonella*: A postmodern pathogen. *Journal of Food Protection*, 54: 563-568.
- Taylor, J.H., Rogers, S.J. y Holah, J.T. 1999. A comparison of the bactericidal efficacy of 18 disinfectants used in the food industry against *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas aeruginosa* at 10 and 20 C. *Journal of Applied Microbiology*, 87: 718-725.
- Taylor, R., Maryan, C. y Verran, J., 1998. Retention of oral microorganisms on cobalt-chromium alloy and dental acrylic resin with different surfaces finishes. *Journal Prosthetic Dentistry*, 80: 592-597.
- Teh, K. H., Flint, S., & French, N. 2010. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* in controlled mixed-microbial populations. *International Journal of Food Microbiology*, 143: 118-124.
- Teixeira, P., Lopes, Z., Azeredo, J., Oliveira, R. y Vieira, M. 2005. Physico-chemical Surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. *Food Microbiology*, 22: 247-251.
- Teixeira, P., Lima, J., Azeredo, J. y Oliveira, R., 2008. Adhesion of *Listeria monocytogenes* to materials commonly found in domestic kitchens. *International Journal of Food Science and Technology*, 43: 1239-1244.
- Teufel, L. y Redl, B. 2006. Improved methods for the investigation of the interaction between textiles and microorganisms. *Lenzinger Berichte*, 85: 54-60.
- Thevenot, D., Delignette-Muller, M., Christieans, S., Vernozy-Rozand, C. 2005. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products. *International Journal of Food Microbiology*, 102: 85-94
- Thomas, J. G. y Nakaishi, L.A. 2006. Managing the complexity of a dynamic biofilm. *The Journal of the American Dental Association*, 137: 10s-20s.
- Tiller, J.C., Bonner, G., Pan, L.-C. y Klibanov, A.M. 2001. Improving biomaterial properties of collagen films by chemical modification. *Biotechnology and Bioengineering*, 73: 246-252.

- Tiller, J.C. 2010. Antimicrobial surfaces. *Advanced Polymeric Science*, 240: 193-217.
- Tirado, C. y Schmidt, K. 2001. WHO Surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications: preliminary results and trends across greater Europe. *Journal of Infection*, 43: 80-84.
- Tompkin, R.B. 2002. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *Journal of Food Protection*, 65: 709-725.
- Todd, E. C. 1997. Epidemiology of foodborne diseases: A worldwide review. *World Health Statistics Quarterly*, 50: 30-50.
- Tood, E.C., Michaels, B.S., Greig, J.D., Smith, D., Holah, J. y Bartleson, C.A.. 2010. Review: Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 7. Barriers to reduce contamination on food by workers. *Journal of Food Protection*, 73: 1552-1565.
- Trachoo, N. 2003. Biofilms and the food industry. *Journal Science Technology*, 25: 807-815.
- 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. *Journal Applied Microbiology*, 92: 549-555.
- Troller, J.A. 1993. Sanitation in food processing. Academic Press, Inc., San Diego.
- Uhl, J.R., Bell, C.A., Sloan, L.M., Espy, M.J., Smith, T.F., Rosenblatt, J.E. y Cockerill, F.R. 2002. Application of rapid-cycle real-time PCR for the detection of microbial pathogens: the Mayo-Roche rapid anthrax test. *Mayo Clinic Proceedings*, 77: 673-680.
- USDA (Servicio de inocuidad e Inspección de los Alimentos. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos). 2010. Hongos en los Alimentos: ¿Son peligrosos?. Disponible en http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/03e22c03-8062-4ca1-a8c2-fe94bafc0222/Molds_Are_They_Dangerous_SP.pdf?MOD=AJPERES
- Uyttendaele, M., Vanwildemeersch, K. y Debevere, J. 2003. Evaluation of real-time PCR vs. automated ELISA and conventional culture method using a semi-solid medium for detection of *Salmonella*. *Letters in Applied Microbiology*, 37: 386-391.
- Valcárcel, S., Escudero, J.M. y Marco, J.M. 2002. Estudio comparativo de varios métodos de valoración de contaminación de superficies, respecto a las técnicas microbiológicas de referencia. Ed. Eypasa, Madrid, España. *Alimentaria*, 338: 17-23.
- Van Acker, J., de Smet, F., Muyldermans, G., Bougateg, A., Naessens, A., & Lauwers, S. 2001. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 293-297.
- Van Asselt, E., Fischer, A., De Jong, A.E.I., Nauta, M.J. y de Jonge, R. 2009. Cooking practice in the kitchen-observed versus predicted behavior. *Risk Analysis an International journal*, 29: 533-540.
- Van der Veen, S., & Abee, T. 2011. Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. *International Journal of Food Microbiology*, 144: 421-431.

- Van Egmond, H.P., Schothorst, R.C. y Jonker, M.A. 2007. Regulations relating to micotoxins in food: perspectives in a global and European context. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389: 147-157.
- Van Houdt, R. y Michiels, C.W. 2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal Applied Microbiology*, 109: 1117-1131.
- Vanne, L., Karkowski, M., Karppinen, S. y Sjoberg, A.M. 1996. HACCP-based food quality control and rapid detection methods for microorganisms. *Food Control*, 7: 263-276.
- Velázquez, M. y Feirtag, J. 1997. Quenching and enhancement effects of ATP extractants, cleaners and sanitizers on the detection of the ATP. *Journal of Food Protection*, 60: 799-803.
- Ventanas, J. (coord.). 2001. Tecnología del Jamón ibérico. De los sistemas tradicionales a la explotación racional del sabor y el aroma. 515-513. Ed. Mundi Prensa, Madrid.
- Verran, J. y Boyd, R.D. 2001. The relationship between substratum surface roughness and microbiological and inorganic soiling: a review. *Biofouling*, 7: 59-71.
- Verran, J. 2002. Biofouling in food processing: Biofilm or biotransfer potential?. *Food and Bioproducts processing*, 80: 292-298.
- Verran, J, Airey, P., Packer, A. y Whitehead, K.A. 2008. Microbial retention on open contact surfaces and implications for food contamination. *Advances in Applied Microbiology*, 64: 223-246.
- Verran, J., Packer, A., Kelly, P. y Whitehead, A. 2010a. The retention of bacteria on hygienic surfaces presenting scratches of microbial dimensions. *Letters in Applied Microbiology*, 50: 258-263.
- Verran, J., Packer, A., Kelly, P. y Whitehead, A. 2010b. Titanium-coating of stainless steel as an aid to improved cleanability. *International Journal of Food Microbiology*, 141: 134-139.
- Vieira, M.J., Melo, L.F. y Pinheiro, M.M. 1993. Biofilm formation: hydrodynamic effect on internal diffusion and structure. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 7: 67-80.
- Wang, S. y Jiang, L. 2007. Definition of superhydrophobic states. *Advanced Materials*, 19: 3423-3424.
- Warren, B., Yuk, H.G. y Schneider, K.R. 2007. Detection of Salmonella by flow-through immunocapture real-time PCR in selected foods within 8 hours. *Journal of Food Protection*, 70: 1002-1006.
- Weighardt, F. 2003. Quantitative PCR for detection of GMO (Session 10) in the analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms. European Commission, DG-JRC and World Health Organization. 1.03.114. Italy, Roma.
- Wells Moncada, G.V.H. 2006. Espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) en el análisis cuantitativo y cualitativo de carne de cordero. Universidad Austral de Chile.
- Wildbrett, G. 2000. La Limpieza y desinfección en la industria alimentaria. Ed. Acribia, Zaragoza.

- Williams, S.K., Roof, S., Boyle, E.A., Burson, D., Thippareddi, H., Geornaras, I., Sofos, J.N., Wiedmann, M. y Nightingale, K. 2011. Molecular ecology of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in small and very small ready-to-eat meat processing plants. *Journal of Food Protection*, 74: 63-77.
- Wirtanen G. y Mattila-Sandholm, T. 1993. Epifluorescence image analysis and cultivation of foodborne biofilm bacteria grown on stainless Steel surfaces. *Journal of Food Protection*, 56: 678-683.
- Wirtanen, G., Hüsmark, U., Mattila-Sandholm, T. 1996. Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. *Journal of Food protection*, 59: 727-733
- Wirtanen G., Salo, S., Helander, I.M. y Mattila-Sandholm, T. 2001. Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm. *Coloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 20: 37-50.
- Wirtanen G., y Salo, S. 2003. Disinfection in food processing - efficacy testing of disinfectants. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2: 293-306.
- Whitehead, K.A., Rogers, D., Colligon, J., Wright, C. y Verran, J. 2006. Use of the atomic force microscope to determinate the effect of substratum surface topography on the ease of bacterial removal. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 51: 44-53.
- Whitehead, K.A. y Verran, J. 2006. The effect of surface topography on the retention of microorganisms. *Food and Bioproducts Processing*, 84: 253-259.
- WHO. 2007. The world health report 2007 Global Public Health Security in the 21st Century A safer future. Disponible en: http://www.who.int/whr/2007/whr07_en.pdf
- Yuk, H.G., Warren, B. y Schneider, K.R. 2006. Preliminary evaluation of flow-through immunocapture followed by real-time PCR for the detection of *Salmonella* serovars on tomato surfaces within 8 hours. *Journal of Food Protection*, 69: 2253-2257.
- Yuste, R. 2005. Fluorescence microscopy today. *Nature Methods*, 2: 902-904.
- Zalar, P., Novak, M., De Hoog, G.S. y Gunde-Cimerman, N. 2011. Dishwashers – A man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. *Fungal Biology*, 115: 997-1007.
- Zhang, L., Jiang, Y., Ding, Y., Povey, M. y York, D. 2007. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). *Journal of nanoparticles research*, 9: 479-489.
- Zobell, C. E., 1943, The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J. Bacteriol.* 46:39–56.
- Zottola, E.A. y Sasahara, K.C. 1994. Microbial biofilms in the food processing industry: should they be a concern?. *International Journal of Microbiology*, 23: 125-148.