



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE HIGIENE POR
BIOLUMINISCENCIA: COMPARACIÓN DE LA
SENSIBILIDAD ENTRE DOS SISTEMAS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

KAREN ANDREA RIVERA CORREA



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: VELÁZQUEZ MADRAZO OLGA DEL CARMEN

VOCAL: Profesor: REYO HERRERA AGUSTÍN

SECRETARIO: Profesor: MINA CETINA ALEIDA

1er. SUPLENTE: Profesor: FONSECA LARIOS RODOLFO

2° SUPLENTE: Profesor: CAMACHO CRUZ ALEJANDRO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**FACULTAD DE QUÍMICA, EDIFICIO "A".
LABORATORIOS DEL DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA.
LICENCIATURA**

ASESOR DEL TEMA:

M. en E. OLGA DEL CARMEN VELÁZQUEZ MADRAZO

SUPERVISOR TÉCNICO:

QFB. ALEJANDRO CAMACHO CRUZ

SUSTENTANTE:

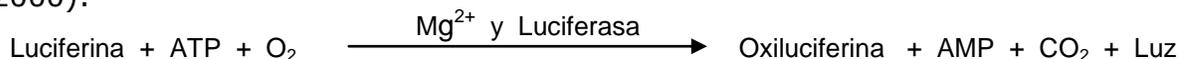
KAREN ANDREA RIVERA CORREA

RESUMEN

La higiene en la fabricación de alimentos es uno de los factores principales para asegurar su inocuidad y sanidad; consiste en prevenir la contaminación y el crecimiento de las bacterias en los alimentos, para prevenir enfermedades y deterioro de los productos.

Los procesos de limpieza y sanitización del equipo y superficies son básicos para la higiene de los alimentos pero no basta con llevarlos a cabo siguiendo los procedimientos estandarizados de higiene operacional, conocidos también como procedimientos operativos estándares de sanitización (POES ó SSOP por sus siglas en inglés). Se deben monitorear los equipos y superficies higienizados para garantizar que los SSOP están cumpliendo sus propósitos. La percepción directa, sea visual, olfativa o táctil, de la limpieza no es suficiente para garantizar su eficiencia, ya que pueden pasar inadvertidos residuos de alimentos y de bacterias; para verificar la higiene de equipos y superficies se requiere un control más objetivo de la eficiencia de la limpieza y la sanitización.

Por ello se han desarrollado, especialmente para la industria de alimentos, métodos rápidos de verificación de higiene; como el de evaluación de higiene por bioluminiscencia que se basa en medir la cantidad de ATP presente en la superficie higienizada, como una medida de la presencia de microorganismos y de residuos de alimentos. Para medir el ATP presente, se utiliza la reacción que se lleva a cabo entre la luciferina y la luciferasa (de las luciérnagas) con el ATP de los residuos mencionados y registrando en un luminómetro la cantidad de fotones emitidos por la reacción, la cual es proporcional a la cantidad de ATP de la muestra, puesto que los demás reactivos están estandarizados en el sistema. La reacción de bioluminiscencia es la siguiente (Feldman, et. al 2000):



El límite de detección o sensibilidad es aproximadamente de 1-2 femtomoles, es decir de 1 a 2×10^{-15} moles ATP, ó de 10^4 UFC de bacterias (3M, 2005).

El objetivo del estudio fue comparar la sensibilidad de dos sistemas de monitoreo de higiene basados en bioluminiscencia: el *3M™ Clean Trace™* y el *BioControl™ Lightning MVP*, retando a los sistemas mediante la aplicación de soluciones de 4 alimentos diferentes y de 4 tipos de microorganismos, a superficies de acero y plástico. Los sistemas se comportan de diferente manera, según la superficie; y hay diferencias en el número de muestras rechazadas, lo que sugiere una diferencia de sensibilidad entre los métodos.



Una gran inteligencia puede ser convertida en ignorancia cuando la necesidad de ilusión es profunda. Saul Bellow, escritor, ganador de premio Nobel (1915-2005)

Dedicatoria

A mis padres.

A los científicos, memorables constructores de peldaños en el templo del saber.

Agradecimientos

A la UNAM por haberme dado la oportunidad de formar parte de sus aulas y por abrirme el portal de la sabiduría

A mi asesora, Olga Velázquez, por su aceptación y apoyo para la realización de este proyecto.

Al Cepario y a la sección de medios de cultivo de la Facultad de Química por el gran apoyo proporcionado

En general, a todas las personas que contribuyeron a la culminación de este trabajo.



Año internacional de la
QUÍMICA 2011

Contenido

RESUMEN.....	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos.....	ii
INDICE DE TABLAS.....	vi
INDICE DE FIGURAS.....	viii
I. M A R C O T E Ó R I C O.....	1
1.1 HIGIENE DE LOS ALIMENTOS	1
1.1.1 Leyes y reglamentos sanitarios.....	2
1.1.2 Programas de higiene	3
1.2 RELACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS CON LA HIGIENE.....	11
1.2.1 Microorganismos comunes en los alimentos.....	11
1.2.2 Crecimiento microbiano.....	14
1.2.3 Factores que influyen en el crecimiento de los microorganismos.....	15
1.2.4 Biocapas (biofilms).....	15
1.2.5 Efectos de los microorganismos en el deterioro de alimentos.	17
1.2.6 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's).....	21
1.3 LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN	38
1.3.1 Tipo de suciedad.....	38
1.3.2 El proceso de limpieza y desinfección	39
1.3.3 Clasificación de detergentes	40
1.3.4 Técnicas de desinfección	41
1.4 EVALUACIÓN DE LA HIGIENE.....	43
1.4.1 Determinación de residuos persistentes.....	45
1.4.2 Análisis microbiológico.....	46
1.4.3 Métodos rápidos de evaluación de higiene.....	48
1.4.4 Bioluminiscencia	50
1.4.5 Evaluación de higiene por bioluminiscencia.....	56
II. O B J E T I V O	62
III. M A T E R I A L E S Y M É T O D O S.....	63
Descripción del proyecto	64

3.1 CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	65
3.2 VERIFICACIÓN DE LOS SISTEMAS DE EVALUACIÓN DE HIGIENE	65
3.3 PROCESO DE LIMPIEZA-DESINFECCIÓN.....	67
3.4 MÉTODO PARA LA APLICACIÓN DE CONTAMINANTES Y ESTABILIDAD DE LECTURAS	68
3.5 PRUEBAS PRELIMINARES CON ALIMENTOS.....	69
3.6 PRUEBAS PRELIMINARES CON MICROORGANISMOS	69
3.7 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD CON LOS DOS SISTEMAS DE EVALUACIÓN DE HIGIENE	70
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	71
4.1 PRUEBAS PRELIMINARES CON ALIMENTOS.....	71
4.1.1 Leche pasteurizada.....	72
4.2.2 Jugo de naranja	74
4.2.3 Salchicha tipo Viena	75
4.3 PRUEBAS PRELIMINARES CON MICROORGANISMOS	76
4.3.1 <i>E. coli</i>	76
4.3.2 <i>Salmonella typhi</i>	77
4.3.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	78
4.3.4 <i>Candida albicans</i>	79
4.4 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS CON AMBOS SISTEMAS DE EVALUACIÓN DE HIGIENE	81
4.4.1 Leche pasteurizada.....	82
4.4.2 Jugo de naranja	83
4.4.3 Salchicha	84
4.4.4 Alimento lácteo fermentado. (<i>Sofúl</i>).....	85
4.4.5 <i>Salmonella typhi</i>	85
4.4.6 <i>E. coli</i>	86
4.4.7 <i>Listeria monocytogenes</i>	87
4.4.8 <i>Candida albicans</i>	87
4.5 ANÁLISIS DE RESULTADOS PARA AMBOS SISTEMAS DE EVALUACIÓN DE HIGIENE	90
4.6 ESTABILIDAD DE LAS LECTURAS	113

V. CONCLUSIONES.....	118
VI. APÉNDICES.....	122
A. CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	122
Cuantificación de <i>E. coli</i>	123
Cuantificación de <i>Salmonella typhi</i>	124
Cuantificación de <i>Listeria monocytogenes</i>	125
Cuantificación de <i>Candida albicans</i>	128
B. PROCEDIMIENTOS PARA PREPARAR SOLUCIONES DE MICROORGANISMOS DE CONCENTRACIÓN CONOCIDA.....	130
C. PROCEDIMIENTO DEL HISOPADO, ILUSTRADO CON EL SISTEMA 3M™ <i>Clean Trace</i> ™.....	134
BIBLIOGRAFÍA.....	136

INDICE DE TABLAS

I. MARCO TEÓRICO

Tabla 1-1 Gérmenes típicos de la alteración de los alimentos.....	19
Tabla 1-2 Tipos de alteración asociada típicamente a los alimentos	20
Tabla 1-3 Ejemplos de podredumbres fúngicas en hortalizas	21
Tabla 1-4 Ejemplos de podredumbres fúngicas en frutas.....	21
Tabla 1-5 Dosis infectivas de causantes de ETA's.....	25
Tabla 1-6 Características de algunas enfermedades alimentarias causadas por bacterias	26
Tabla 1-7 Micotoxinas más importantes para la industria alimentaria	30
Tabla 1-8 Efectos patológicos de algunas micotoxinas	31
Tabla 1-9 Virus transmitidos por alimentos y enfermedades asociadas	33
Tabla 1-10 Mínima temperatura interna y tiempo de cocción que asegura la inactivación de los virus.....	34
Tabla 1-11 Principales enfermedades parasitarias humanas	36
Tabla 1-12 Tipos de suciedad	39
Tabla 1-13 Combinaciones de detergentes/desinfectantes más utilizados en la industria alimentaria.....	42
Tabla 1-14 Especificaciones de número aceptable de microorganismos alterantes en las superficies de contacto con los alimentos.....	43
Tabla 1-15 Técnicas de detección de la suciedad en sistemas CIP	44
Tabla 1-16 Hisopos monitores de proteína de 3M para verificación de limpieza y determinación de proteínas alergénicas	49
Tabla 1-17 Análisis comparativo de sistemas de monitoreo de higiene por ATP	57
Tabla 1-18 Parámetros de los sistemas utilizados	58
Tabla 1-19 Detección rápida y tradicional de microorganismos ATCC y poblaciones mezcladas en agua estéril	61

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 3-1 Control negativo efectuado <i>Biocontrol</i> TM	66
Tabla 3-2 Control positivo efectuado <i>Biocontrol</i> TM	66
Tabla 3-3 Control positivo con sistema <i>3M</i> TM . Valores RLU de acuerdo a la cantidad de ATP.	67
Tabla 3-4 Control positivo con estándar de ATP purificado, efectuado <i>3M</i> TM	67

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4-1 Interpretación de RLU para evaluación de higiene de <i>3M™ Clean Trace™</i>	71
Tabla 4-2 Resultados preliminares de leche pasteurizada	72
Tabla 4-3 Resultados preliminares de jugo	74
Tabla 4-4 Resultados preliminares de salchicha	75
Tabla 4-5 Resultados Preliminares con <i>E. coli</i>	76
Tabla 4-6 Resultados preliminares <i>S. typhi</i>	77
Tabla 4-7 Resultados preliminares <i>L. monocytogenes</i>	79
Tabla 4-8 Resultados Preliminares <i>C. albicans</i>	80
Tabla 4-9 Interpretación de RLU para la evaluación de higiene	81
Tabla 4-10 Resultados con suspensión de pasteurizada 10^{-1}	82
Tabla 4-11 Resultados con suspensión de leche pasteurizada 10^{-2}	82
Tabla 4-12 Resultados con suspensión de jugo de naranja 10^{-3}	83
Tabla 4-13 Resultados con suspensión de jugo de naranja 10^{-4}	83
Tabla 4-14 Resultados con suspensión de salchicha 10^{-3}	84
Tabla 4-15 Resultados con suspensión de salchicha 10^{-4}	84
Tabla 4-16 Resultados con suspensión de <i>Sofúl</i> 10^{-3}	85
Tabla 4-17 Resultados con suspensión de <i>S. typhi</i> 56×10^3 UFC	85
Tabla 4-18 Resultados con suspensión de <i>S. typhi</i> 56×10^2 UFC	86
Tabla 4-19 Resultados con suspensión de <i>E. coli</i> 42×10^3 UFC	86
Tabla 4-20 Resultados con suspensión de <i>L. monocytogenes</i> 41×10^3 UFC	87
Tabla 4-21 Resultados con suspensión de <i>C. albicans</i> 46×10^3 UFC	87
Tabla 4-22 Resultados con suspensión de de <i>C. albicans</i> 46×10^2 UFC	88
Tabla 4-23 Resultados con suspensiones de alimentos en hisopos para líquidos (500 μ L)	88
Tabla 4-24 Resultados con suspensiones de microorganismos en hisopos para líquidos (500 μ L)	89
Tabla 4-25 Número de superficies: Aceptadas(A), en Precaución (P) y Rechazadas (R), para cada contaminante aplicado y sistema con mayor sensibilidad para el caso. Los sistemas se identificaron como: <i>3M™ Clean Trace™</i> = 3M y <i>BioControl™ Lightning MVP</i> =BC. Cuando la sensibilidad es prácticamente igual, se registró como similar = S.	92
Tabla 4-26 CV % del nivel de higiene de los contaminantes aplicados.....	101
Tabla 4-27 Resultados obtenidos con las pruebas estadísticas aplicadas.....	111
Tabla 4-28 Valores de CV % de la estabilidad de la lectura.....	113
Tabla 4-29 Interpretación de los valores del coeficiente de variación (CV%)	114

V. CONCLUSIONES

Tabla 5-1 % Resultados obtenidos por residuo y superficie para 3M/BC	118
Tabla 5-2 Numero de muestras aceptadas-rechazadas para cada sistema en general.....	119

VI. APÉNDICE

Tabla A-1 Escala de Mc Farland.....	122
Tabla A-2 Cuantificación de <i>E. coli</i>	123
Tabla A-3 Cuantificación de <i>S. typhi</i>	124
Tabla A-4 Cuantificación de <i>L. monocytogenes</i>	125
Tabla A-5 Comparación de cuantificación de bacterias	127
Tabla A-6 Cuantificación de <i>C. albicans</i> en ágar	128
Tabla A-7 Cuantificación de <i>C. albicans</i> en <i>Petrifilm YM</i>	129

INDICE DE FIGURAS

I. MARCO TEÓRICO

Figura 1-1 Curva de crecimiento microbiano (Fuente: Ciesliar, 2003).....	15
Figura 1-2 Estructura de una biocapa (Fuente: Univ. de Sevilla, 2011).....	16
Figura 1-3 Parásitos internos comunes. Fuente: UGRJ, 2011.....	35
Figura 1-4 Hisopo Flash de Biocontrol. Detectores instantáneos tipo lápiz para detección de restos de proteínas en superficies.....	49
Figura 1-5 Hisopo Pro-Tect.....	49
Figura 1-6 Ciclo de la bioluminiscencia (Lenhinger, 1993).....	51
Figura 1-7 Esquema del mecanismo de la reacción de bioluminiscencia Fuente: Shimomura, 2006.	52

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 3-1 Diagrama de la cuantificación de microorganismos	65
Figura 3-2 Diagrama de las pruebas preliminares con alimentos	69

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 4-1 Porcentaje de muestras aceptadas-rechazadas para cada sistema en plástico.....	94
Figura 4-2 Frecuencia de resultados en plástico con 3M	95
Figura 4-3 Frecuencia de resultados en plástico con BC.....	95
Figura 4-4 Porcentaje de muestras aceptadas-rechazadas para cada sistema en acero.	97
Figura 4-5 Frecuencia de resultados en acero con 3M	98
Figura 4-6 Frecuencia de resultados en acero con BC.....	98
Figura 4-7 Porcentaje de resultados generales para cada sistema.....	100
Figura 4-8 Estabilidad de lecturas a bajos RLU, 3M en plástico	115
Figura 4-9 Estabilidad de lecturas 3M en plástico	116
Figura 4-10 Estabilidad de lecturas 3M en acero	116
Figura 4-11 Estabilidad de lecturas BC en plástico	117
Figura 4-12 Estabilidad de lecturas BC en acero	117

V. CONCLUSIONES

Figura 5-1 Porcentaje de muestras aceptadas-rechazadas para cada sistema en plástico y acero. %Aceptación=Verde, %Precaución=Amarillo, %Rechazo=Rojo.....	119
Figura 5-2 Porcentaje de muestras aceptadas-rechazadas para cada sistema en general. %Aceptación=Verde, %Precaución=Amarillo, %Rechazo=Rojo.	119

VI. APÉNDICE

Figura A-1 Curva de la escala de Mc Farland.....	122
Figura A-2 Curva de cuantificación de <i>E. coli</i>	123
Figura A-3 Curva de cuantificación de <i>S. typhi</i>	124
Figura A-4 Curva de cuantificación de <i>L. monocytogenes</i> en <i>Petrifilm</i>	126
Figura A-5 Curva de cuantificación de <i>L. monocytogenes</i> en agar	126
Figura A-6 Curva de cuantificación de <i>C. albicans</i> en agar	128
Figura A-7 Curva de cuantificación de <i>C. albicans</i> en <i>Petrifilm</i>	129

I. M A R C O T E Ó R I C O

1.1 HIGIENE DE LOS ALIMENTOS

La palabra *sanidad* deriva del latín *sanitas* y significa salud. Aplicada a la industria alimentaria, *sanidad* es la “creación y el mantenimiento de condiciones higiénicas y saludables”. La higiene alimentaria es una ciencia sanitaria aplicada; encargada de facilitar comida sana manipulada en un entorno limpio, mediante operadores sanos y entrenados en buenas prácticas de higiene y sanidad, para prevenir la contaminación por microorganismos que causen enfermedades de origen alimentario, y para minimizar la proliferación de microorganismos que descompongan alimentos, controlando los microorganismos, para que sean beneficiosos en lugar de perjudiciales (Marriot, 2003).

Las prácticas carentes de higiene pueden contribuir al brote de enfermedades transmitidas por alimentos o ETA’s, que causan daños y gastos al consumidor, lo cual lleva a desprestigiar a la marca o a la empresa y en casos extremos pueden producir la muerte de los consumidores.

Por ejemplo, Starlac era una marca líder de leche en polvo en los años 1950’s en EUA, producida por una gran compañía de fabricación de alimentos. Sin embargo, se detectó un brote de ETA causada por *Salmonella*, cuyo origen se atribuyó a ese producto y la publicidad adversa ocasionó que el producto fuera retirado del mercado y la marca desapareció (Marriot, 2003).

Un programa higiénico eficaz, incluye la limpieza y desinfección regulares de los sistemas de calefacción, aire acondicionado, equipos de refrigeración, etc. además de las superficies en contacto con los

alimentos, algunos de sus beneficios son: a) la mejora de la aceptabilidad del producto; b) aumento en la conservación del alimento; c) la mejora de las relaciones con los clientes; d) la reducción de los riesgos para la salud pública; e) el aumento de confianza de los organismos y los inspectores; f) reducción de desperdicios y g) mejora de la moral de los empleados (Marriot, 2003), estos programas pueden reducir el número de enfermedades, algo necesario, ya que la Organización Mundial de Salud calcula 2.2 millones de muertes al año causadas por enfermedades gastrointestinales (Logan, 2010).

1.1.1 Leyes y reglamentos sanitarios

Dada la importancia que tiene la higiene en la preparación de los alimentos para la salud del consumidor, existen leyes y reglamentos para controlar la inocuidad de los alimentos y las prácticas higiénicas en la industria relacionada con la fabricación y preparación de éstos. Las leyes son aprobadas por los legisladores y deben ser firmadas por el poder ejecutivo. Después de que una ley haya sido aprobada, el organismo responsable de su cumplimiento prepara las regulaciones concebidas para aplicar la ley y desarrolla los reglamentos. La legislación aplicada a la alimentación proporciona normas para diseñar edificios, equipos, mercancía, tolerancia hacia sustancias químicas y otro tipo de materiales usados en alimentación, prácticas y requisitos higiénicos, etiquetado, necesidades y formación para los puestos, entre otros (Marriot, 2003).

La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés), en EUA, es la responsable de hacer cumplir la Ley sobre Alimentación, Medicamentos y Cosméticos, así como otros estatutos ambientales y está bajo la jurisdicción del Departamento de Salud y Servicios Humanos.

En México, conforme a la Ley General de Salud, la Secretaría de Salud ejerce atribuciones de regulación, control y fomento sanitario, a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios COFEPRIS, que es la responsable de regular, supervisar y auditar a los establecimientos e industrias productores de alimentos; por ello, entre otras publicaciones y disposiciones que contribuyen a estas tareas, se ha publicado el "*Manual de Buenas Prácticas de Higiene y Sanidad*", así como diversos manuales de Análisis de Riesgos, identificación y Control de Puntos Críticos, aplicados a distintos tipos de industrias, disponibles en Internet para hacerlos accesibles a todos los productores y operadores del sector alimentario.

1.1.2 Programas de higiene

Para asegurar la inocuidad de los alimentos es necesario mantener condiciones higiénicas en todas las etapas del proceso; esto puede resultar más o menos sencillo a nivel doméstico pero se complica en escala industrial, por lo que se requieren programas de higiene cuidadosamente integrados para garantizar que los alimentos producidos en una empresa serán seguros para los consumidores (Forsythe, 2002).

En primer lugar se necesitan Buenas Prácticas Agrícolas (BPA ó GAP por sus siglas en inglés) para controlar contaminantes, plagas y enfermedades, un ambiente adecuado y la adopción de prácticas y medidas higiénicas (Catalán, 2006).

El método de las 4 Pes (*Premises* ó Instalaciones, Planta/equipo, Personal y Proceso) es una base comúnmente utilizada para organizar los programas sobre higiene de los alimentos (Johns, 1995).

Las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM o GMP por sus siglas en inglés *Good Manufacturing Practice*) son esenciales para asegurar la calidad de los alimentos; son requeridas por las leyes y regulaciones nacionales e internacionales para la higiene de los alimentos y se consideran frecuentemente como pre-requisitos para sistemas basados en el análisis de riesgos como el HACCP (Easter, 2003).

Los contenidos de un programa GMP incluyen (Catalán, 2006):

- Instalaciones adecuadas: edificios y áreas de trabajo, equipos, servicios.
- Condiciones de equipos de producción: materiales resistentes, superficies lisas e impermeables, facilidades para limpieza y sanitización, seguridad para personal, mantenimiento y calibración.
- Programa de control de materias primas: evaluación periódica de las materias primas, inspección del 100% de las partidas, certificación del proveedor y requisitos relativos a las especificaciones.
- Procedimientos y planes de limpieza y sanitización: superficies, utensilios y equipos de trabajo a higienizar, responsabilidades de tareas particulares, método y frecuencia de la limpieza y sanitización, tipo de principio activo y concentración, requisito de temperatura, medidas de control de calidad sanitaria y medidas de seguridad personal.
- Control para el almacenamiento y uso de productos químicos para limpieza y desinfección: hojas de seguridad, rotulación, programa de control de productos químicos, especificaciones de

almacenamiento, precauciones y acciones en caso de derrames y listado de teléfonos y sitios de emergencia.

- Higiene personal: aseo personal, estado de salud y comportamiento y conductas personales apropiadas.
- Control de plagas: medidas para impedir el acceso, infestación y anidamiento y programas para luchar contra las plagas.
- Especificaciones en el control de producción y controles de calidad: sistema de control y registro de procesos productivos; auditorías de calidad; planillas de control de los parámetros y/o variables de producción y aseguramiento de la calidad (tolerancias permitidas y acciones correctivas).
- Programa de control de envases: evaluación periódica de los envases, inspección del 100% de las partidas y certificación del proveedor.
- Condiciones de recepción, almacenamiento y distribución de alimentos: recepción de alimentos, almacenamiento y distribución.
- Sistema de trazabilidad a materias primas y productos terminados: programa de trazabilidad y recuperación de productos, planillas de control y registros de producción y distribución, información de materias primas (ingredientes, rotulación, vida útil) e identificación de lotes de producción.
- Sistema de investigación y retroalimentación de reclamos y denuncias de consumidores: recepción del reclamo, investigación interna e implementación de la acción correctiva y respuesta al consumidor que realiza el reclamo.

- Especificaciones del etiquetado: debe cumplir con las exigencias establecidas en la normatividad correspondiente.
- Sistemas de capacitación a los empleados: programas de capacitación.

Los procedimientos estandarizados de higiene operacional, conocidos también como procedimientos operativos estándares de sanitización POES (SSOP por sus siglas en inglés *Sanitation Standard Operating Procedures*), están considerados dentro de las GMP, pero por su importancia, deben ser objeto de un programa específico adecuadamente documentado (Catalán, 2006).

Se basan en que todo establecimiento de alimentos debe desarrollar, mantener y adoptar procedimientos escritos de limpieza y desinfección de instalaciones y equipos, así como comprobar su cumplimiento diario (FSIS, 2010); en éstos se integran los procedimientos de limpieza y desinfección a seguir antes, durante y después de las operaciones, frecuencia para la ejecución de cada procedimiento e identificación del responsable de dirigirlo; supervisión diaria de la ejecución de los procedimientos de prevención de la contaminación y de acciones correctivas cuando se determina que los procedimientos no logran prevenir la contaminación. Este programa consta de dos etapas (Dupont, 2009):

1) Pre-operacional: que establece procedimientos de sanitización antes de comenzar con el proceso, los cuales buscan garantizar que la instalación, equipo, maquinaria y utensilios se encuentren libres de agentes contaminantes

2) Operacional: describe las acciones que se realizan simultáneamente con las labores de producción, que igualmente permiten no sólo evitar

situaciones de riesgo asociadas a los inadecuados estados sanitarios, sino que mantienen las condiciones apropiadas.

Los procedimientos relacionados con la higiene que un establecimiento debería tener estandarizados y descritos son (INA, 2007; Catalán, 2006):

- Seguridad del agua
- Limpieza de las superficies de contacto con los alimentos
- Prevención de contaminación cruzada
- Higiene de los empleados
- Disposición de residuos y manejo de los desechos
- Control de compuestos o agentes tóxicos
- Salud de los empleados
- Control de plagas
- Manejo de agentes de limpieza y desinfección en áreas de elaboración de alimentos

El programa APPCC

El programa de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control, APPCC (HACCP por sus siglas en inglés *Hazard Analysis and Critical Control Points*), ha sido reconocido como un programa voluntario para asegurar la inocuidad de los alimentos y en función de sus resultados, es cada vez más utilizado (Marriot, 2003).

Por ello, instancias internacionales como FAO (2002) lo recomiendan como herramienta para asegurar la inocuidad de los alimentos; a continuación se presenta un resumen del programa:

Es un procedimiento sistemático y preventivo, reconocido internacionalmente para abordar los peligros biológicos, químicos y

físicos mediante la previsión y la prevención, en vez de mediante la inspección y comprobación de los productos finales, para garantizar la inocuidad de los alimentos y para favorecer el comercio internacional.

Requiere de técnicas de comprobación o vigilancia rápidas, sencillas, exactas, reproducibles, de fácil utilización y rentables, por ejemplo la vigilancia de la higiene por bioluminiscencia.

Los pioneros en este campo fueron, durante los años 60's, la compañía *Pillsbury*, el Ejército de los Estados Unidos y la Administración Nacional de Aeronáutica y del Espacio (NASA) quienes querían contar con un programa de «cero defectos» para garantizar la inocuidad de los alimentos que los astronautas consumirían en el espacio.

El sistema de APPCC, que se aplica a la gestión de la inocuidad de los alimentos, utiliza la metodología de controlar los puntos críticos en la manipulación de alimentos, para impedir que se produzcan problemas relativos a la inocuidad. La utilización de este sistema es compatible con la aplicación de los sistemas de gestión de la calidad total (GCT), como los de la serie ISO 9000. Sin embargo, el APPCC es el sistema preferido entre las herramientas de gestión de la inocuidad de los alimentos (FAO, 2002).

El sistema de APPCC se aplica a productos específicos y antes de aplicarlo a uno de ellos, su línea de producción debe estar funcionando de acuerdo con los Principios Generales del *Codex* de Higiene de los Alimentos, los Códigos de Prácticas del *Codex* pertinentes y la legislación correspondiente en materia de inocuidad de los alimentos. A partir de éstos, se ha integrado una lista de "prerrequisitos del programa"; se considera indispensable que estos prerrequisitos se apliquen adecuadamente, antes de pensar siquiera en la implementación

de APPCC (González, 2007). Aunque diversos autores pueden organizar de diferentes maneras los prerrequisitos, desglosar o integrar algunos, estos son generalmente de 10 a 12 e incluyen:

- 1) Mantenimiento de locales, instalaciones y equipos incluyendo programa de mantenimiento preventivo.
- 2) Abastecimiento de agua potable
- 3) Capacitación de trabajadores incluyendo BPM e higiene personal
- 4) Procedimientos estandarizados de limpieza y desinfección
- 6) Procedimientos de operación estandarizados y control de los mismos
- 7) Trazabilidad
- 8) Manejo adecuado de productos y materiales de limpieza
- 9) Programa de manejo adecuado de residuos
- 10) Programas de control de plagas
- 11) Controles de almacén y seguimiento de proveedores

Como puede apreciarse, los procedimientos estandarizados de higiene y sanitización que por supuesto, incluyen los controles de dichas operaciones, son un prerrequisito importante. La bioluminiscencia es una buena forma de controlar dichos procesos. De ahí el interés en este trabajo.

No entraremos en detalles en la aplicación de APPCC, pues no es el objetivo de este trabajo, pero cabe mencionar que:

- 1- La presencia de residuos de alimentos y/o de microorganismos en las superficies del equipo que tienen contacto con los alimentos a lo largo del proceso, es uno de los factores que favorecen la contaminación e implican riesgos en el producto final.

- 2- Por su composición química, los alimentos favorecen la adherencia de residuos y el crecimiento de microorganismos en la superficie del equipo, incluyendo el riesgo de formación de biopelículas.
- 3- La inspección visual después de la limpieza es importante pues permite detectar un proceso claramente inadecuado o insuficiente, pero no alcanza para detectar contaminaciones pequeñas, del orden de 10^4 UFC de bacterias o microgramos de alimentos, cantidades que sin embargo, son suficientes para introducir una contaminación en el alimento y para favorecer desarrollo microbiano.
- 4- El sistema APPCC requiere que los procesos sean monitoreados y revisados durante la operación; la limpieza y desinfección, desde luego deben ser monitoreadas.
- 5- Este monitoreo puede llevarse a cabo mediante métodos tradicionales de recuento microbiano en superficies, pero tiene los inconvenientes de que la obtención de resultados requiere al menos 18 horas y de que sólo detecta algunos microorganismos (según el método de análisis aplicado) pero no todos, y además no detecta residuos de alimentos, que pueden ser nutrientes para microorganismos presentes o advenedizos.

Todas estas consideraciones son buenas razones para utilizar un sistema basado en bioluminiscencia para la evaluación de procesos de higienización del equipo en la industria alimentaria.

1.2 RELACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS CON LA HIGIENE

El conocimiento de los microorganismos es importante para el productor de alimentos y en particular para el especialista sanitario porque su control es parte de los programas de higiene y de garantía de inocuidad (Marriot, 2003).

1.2.1 Microorganismos comunes en los alimentos

Debido a las condiciones de la producción primaria de alimentos, la presencia de microbiota autóctona de plantas y animales es prácticamente inevitable en las materias primas utilizadas en la industria alimentaria; muchos de esos microorganismos pueden eliminarse en los procesos industriales pero algunos permanecen, y otros llegan al producto a lo largo de la cadena de producción. En muchos casos dicha presencia se mantiene controlada con un manejo adecuado, por ello es tan importante controlar a la microbiota presente y evitar su multiplicación, con lo que se previene el deterioro del alimento y, sobre todo, se evita la presencia de microorganismos patógenos o sus toxinas. A continuación se describen los grupos que con mayor frecuencia se encuentran en los alimentos y cuál es su importancia (Doyle, 2000).

Los mohos: son microorganismos eucariontes que crecen formando un micelio filamentoso integrado por una serie de células tubulares que van de los 30 a 100 μm de diámetro, llamadas hifas; el conjunto de hifas que crecen juntas forma el micelio. Los hongos que pueden estar en los alimentos son variados y pueden crecer en pH desde 2 hasta 8, a_w (cantidad de agua disponible) desde 0.6 y a temperaturas desde 0° C (Marriot, 2003). Es muy frecuente su presencia en alimentos porque son abundantes en el campo, frutos, tierra fértil, se dispersan por el aire

y porque son heterótrofos y pueden alimentarse de los componentes de los alimentos produciendo toxinas (Adams, 1997).

Las levaduras son microorganismos eucariontes que a diferencia de los mohos, no forman agregados; tienen un tiempo de generación de 2 a 3 horas, por lo que sólo una levadura/g de alimento, puede provocar el deterioro en 40-60 horas. Las levaduras pueden crecer en a_w desde 0.6 y su pH óptimo es de 4.0-4.5, pero también pueden crecer en un rango más amplio, desde 3 hasta 7 ó más (Marriot, 2003). Las levaduras son abundantes en todos los productos de origen vegetal, especialmente en frutas y verduras ya que son muy eficientes utilizando azúcares los cuales transforman en etanol y ácidos orgánicos; es relativamente fácil que los alimentos azucarados y con a_w intermedia o alta, se deterioren por levaduras. Afortunadamente no causan ETA's (Doyle, 2000).

Las bacterias son microorganismos procariontes de diámetro aproximado de 1 μm , con morfología de bacilos o cocos; pueden ser aerobios o anaerobios, se desarrollan a valores de a_w 0.92 a 0.99 y pueden producir colores anómalos en alimentos con pigmentos inestables o causar decoloración mediante la formación de mucus. Algunas producen esporas resistentes a condiciones ambientales adversas, por ejemplo a temperaturas superiores a 80°C o desecación extrema (Marriot, 2003). Las bacterias heterótrofas son muy abundantes en los alimentos ya que colonizan ampliamente a los seres vivos de los cuales proceden, sean vegetales o animales. Su tiempo de reproducción puede ser tan breve como 20 minutos lo que hace que fácilmente deterioren el alimento o, en el caso de bacterias patógenas, hace que fácilmente lleguen a alcanzar poblaciones peligrosas para el consumidor (Adams, 1997).

Los virus están formados por moléculas de DNA o RNA rodeadas por una cápside de proteína; son parásitos intracelulares obligados y son muy específicos en cuanto a las células que pueden infectar, por lo cual no se pueden reproducir en los alimentos pero si pueden transmitirse a través de ellos. Un virus que ha causado brotes importantes en restaurantes en los últimos 10 años, es el virus de la hepatitis A, transmitido a través de mariscos crudos (Marriot, 2003). También se transmiten fácilmente por alimentos algunos enterovirus y rotavirus (Caballero, 2008). Igualmente tienen importancia en la industria de alimentos los virus que afectan a las bacterias; se denominan bacteriófagos y pueden afectar, por ejemplo a bacterias ácido-lácticas y otros organismos fermentadores, e interferir seriamente en la elaboración de embutidos, encurtidos, queso, mantequilla, vino, cerveza y otros alimentos fermentados (Katsuyama, 2005).

Los parásitos son organismos eucariontes que viven de los nutrientes y de la protección de los hospederos. Los parásitos de origen alimentario pueden ser de diferentes tipos y varían en tamaño, desde organismos unicelulares (protozoarios como *Entamoeba histolytica*) a gusanos multicelulares grandes (helminths) que pueden ser vistos sin microscopio, como la solitaria, *Taenia solium*. El tamaño fluctúa de 1 a 2 μm (micrómetros) a 2 metros de largo (UGRJ, 2011; Mossel, 2003).

Se puede reducir el riesgo de presencia de microorganismos patógenos por diversos medios, desde las buenas prácticas agrícolas, hasta la remoción o destrucción por lavado, calentamiento, adición de sustancias o mediante el fomento de la competencia de otros organismos; son muy importantes las prácticas como minimizar la contaminación del equipo, de las personas y el ambiente, así como evitar la contaminación cruzada entre los alimentos no procesados y procesados (Katsuyama, 2005).

1.2.2 Crecimiento microbiano

La mayoría de alimentos sirven de sustrato para el desarrollo microbiano de bacterias, levaduras, y hongos. Se multiplican por fisión binaria y la velocidad de división o tiempo de generación depende de varios factores. Bajo condiciones favorables sucede cada 20 minutos para las bacterias, así una sola bacteria produce más de 8 millones en unas 8 horas y más de 34 millones en 12 horas, las levaduras tienen un tiempo de generación de 2-3 horas, por lo que una levadura por gramo de alimento pueden provocar el deterioro en 40-60 horas; este crecimiento exponencial no se establece inmediatamente, al inicio hay una fase de latencia que representa el tiempo en que los microorganismos se adaptan a su nuevo ambiente y durante esta fase no hay división activa, las células aumentan de tamaño y producen nuevos materiales, la siguiente fase de crecimiento es llamada logarítmica o exponencial, ya que así es como crecen en esa etapa; cada célula se duplica en el mismo tiempo y las células originadas son todas viables y de tamaño constante.

Al aumentar el número de microorganismos, con el tiempo el medio acumulará productos de desecho y estará empobrecido de nutrientes, lo que origina una disminución de la velocidad de crecimiento y da lugar a la fase estacionaria en la que el número de células viables de la población permanece constante por el cese total de crecimiento o porque el crecimiento iguala a la muerte bacteriana.

La fase final de crecimiento se conoce como declive o muerte, la mayoría de microorganismos mueren y al observar al microscopio los cultivos viejos muestran una gran cantidad de restos celulares y muy pocas células intactas (Forsythe, 2002; Marriot, 2003). A continuación se presenta la curva de crecimiento microbiano.

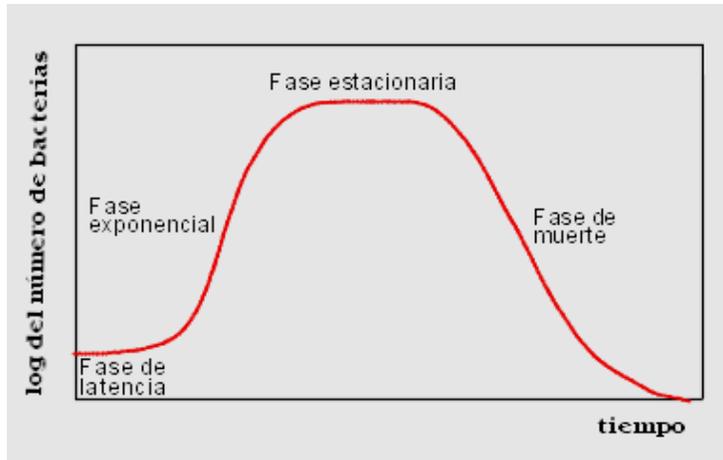


Figura 1-1 Curva de crecimiento microbiano (Fuente: Ciesliar, 2003).

1.2.3 Factores que influyen en el crecimiento de los microorganismos

Los principales factores extrínsecos que influyen en el crecimiento de microorganismos son temperatura, disponibilidad de oxígeno y humedad; y los factores intrínsecos son nutrientes, cantidad de agua disponible (a_w), potencial de oxido-reducción, pH (concentración de hidrogeniones), sustancias inhibidoras, interacciones microbianas (sinergismo y antagonismo) y desde luego también influye el número inicial de microorganismos y las condiciones vitales (activos, estresados, inhibidos, jóvenes, viejos, esporulados) en que se encuentren, y son sus efectos combinados los que determinan si tendrá lugar el crecimiento y con qué rapidez (Forsythe, 2002). Cuando alguno de los factores es limitante, se frena la multiplicación microbiana (Marriot, 2003).

1.2.4 Biocapas (biofilms)

Se denomina biocapas, *biofilms* o biopelículas a las microcolonias de bacterias estrechamente asociadas a una superficie inerte (o a un tejido vivo), sujetas mediante una matriz de material extracelular parecido a un polisacárido en el que otros restos o desperdicios, incluidos

nutrientes y microorganismos pueden quedar atrapados en un ambiente resistente a antibióticos, desinfectantes y defensas (Donlan, 2002).

Una biocapa se construye sobre sí misma superponiendo varios estratos de material polisacárido poblado de microorganismos como *Salmonella*, *Listeria*, *Pseudomonas* y otros. En la industria alimentaria, las biopelículas son muy peligrosas porque pueden desprender fragmentos del material y células microbianas, al paso de sustancias alimentarias, contaminándolas (Marriot, 2003).

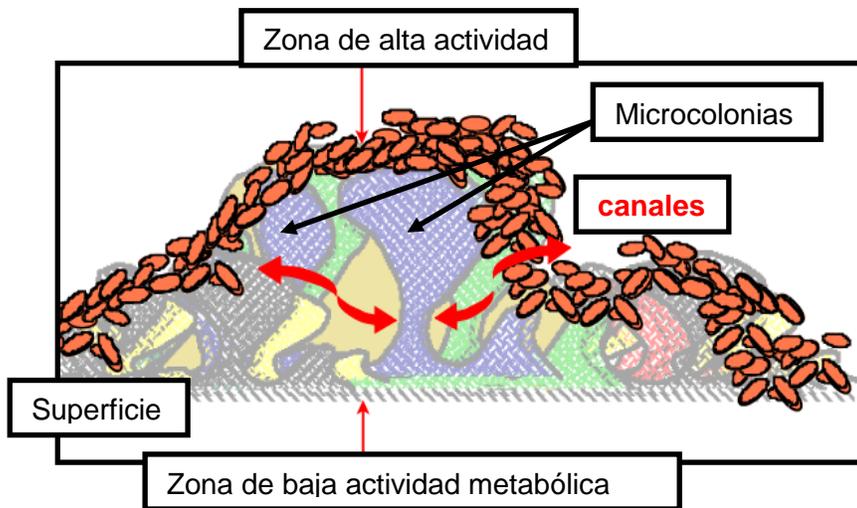


Figura 1-2 Estructura de una biocapa (Fuente: Univ. de Sevilla, 2011).

Se ha demostrado que *L. monocytogenes* se adhiere al acero inoxidable y forma una biocapa; el mecanismo consiste en dos pasos: primero se produce una atracción electrostática entre el microorganismo y la superficie y después el microorganismo produce un polisacárido extracelular que lo fija firmemente a la superficie inerte. Después se forman microcolonias y se estructura la biocapa en la cual se mantienen pequeños canales para acceso de agua y nutrientes. La biocapa constituye una especie de "cultivo continuo", que puede mantenerse en fase logarítmica puesto que está recibiendo nutrientes y agua, pero también es un foco de contaminación porque se desprenden

microorganismos de la superficie, especialmente al paso de alimentos (Marriot, 2003; U. de Sevilla, 2011).

El acero inoxidable se utiliza ampliamente en la industria de alimentos porque tiene buena resistencia a la corrosión, no existe la migración de cationes a los alimentos y en general no favorece el desarrollo de colonias de bacterias, es una aleación de hierro y carbono que contiene al menos 10,5% de cromo y existen diversas aleaciones con distintos grados de calidad, dependiendo al uso al que vayan dirigidos; el jugo de limón puede atacar el inoxidable 304 pero no ataca el 316 (Elinox, 2011). Sin embargo el teflón es más fácil de limpiar que el acero; las biocapas pueden ser retiradas raspando o con agua caliente y soluciones al 3 y 6% de H₂O₂ pero la mejor manera de controlarlas, es evitar que se formen, mediante la aplicación rigurosa de procedimientos de higiene y de la evaluación de los mismos (Félix, 1991 en Marriot, 2003).

1.2.5 Efectos de los microorganismos en el deterioro de alimentos.

El alimento se considera deteriorado o estropeado cuando se convierte en no apto para consumo humano; el deterioro puede ser causado por microorganismos y también por las enzimas propias de los alimentos; factores como la disponibilidad de agua, la temperatura y el daño físico generalmente aceleran los procesos de deterioro tanto enzimático como microbiano (Marriot, 2003).

Los metabolitos producidos por los microorganismos en los alimentos proteicos como la carne, incluyen amoníaco, etanol, lactato, acetato, índol y acetoína, con cantidades menores de ácidos grasos de cadena larga, aminas y etil-ésteres de los ácidos grasos de cadena corta, sulfuros, sulfuro de hidrógeno y mercaptanos. En el pescado se forman

compuestos parecidos, así como trimetilamina y niveles más elevados de las denominadas aminas vasoactivas o “vasopresoras”, como la histamina. La mayor parte de los ésteres, aminas, amoniaco y compuestos sulfurados se producen a partir de los aminoácidos. La degradación importante de la proteína se da hasta fases avanzadas de la alteración (Mossel, 2003).

Los alimentos ricos en hidratos de carbono son colonizados preferentemente por microorganismos glucolíticos y predomina la fermentación, en la que se producen ácidos (principalmente láctico y acético) y disminuye el pH; o se produce etanol generalmente acompañado de desprendimiento de CO₂. Otros productos que se forman son el 2,3-butenodiol, el acetilmetilcarbinol, el diacetilo, etanol, e H₂ (Mossel, 2003).

La actividad microbiana en los alimentos grasos genera la liberación de ácidos grasos por hidrólisis; éstos no son perceptibles sensorialmente cuando tienen más de 12 átomos de C, pero cuando son liberados los ácidos butírico, cáprico y caproico, producen olores desagradables. La lipólisis seguida de la β-oxidación origina cetonas con olores y sabores desagradables. Los ácidos grasos insaturados liberados por la lipólisis microbiana, pueden en segundo momento, oxidarse rápidamente en presencia de aire (Mossel, 2003). Los niveles de metabolitos microbiano son un indicador útil de la frescura de los alimentos.

Los alimentos y factores como actividad acuosa, pH, potencial redox y condiciones de proceso y de almacenamiento proporcionan hábitats específicos a los microorganismos; por ejemplo en mermeladas, que tienen valores de Aw bajos, se desarrollan mohos, a continuación se muestran los grupos de microorganismos más frecuentemente involucrados en el deterioro de diversos alimentos.

Tabla 1-1 Gérmenes típicos de la alteración de los alimentos.

Especie	Alimentos afectados	Síntomas de la alteración
Bacterias		
<i>Clostridium</i>	Carnes y pescados crudos y procesados	Putrefacción, malos olores y sabores. Podredumbre blanda.
<i>Pseudomonas</i>	Carnes y pescados crudos y procesados	Puntos (colonias en la superficie), malos olores y sabores.
<i>Acetobacter</i>	Vino y cerveza	Acidez y enturbiamiento.
<i>Lactobacillus</i>	Carnes envasadas al vacío y procesadas, tocino	Viscosidad, malos olores, producción de gas.
	Leche	Acidificación.
	Vino	Ahilado y verdoso.
<i>Streptococcus/ Micrococcus</i>	Carnes y leches frescas y procesadas	Coloración, malos olores y sabores.
<i>Bacillus</i>	Productos cocinados, leche y pan	Malos olores y sabores, ahilado en pan.
Mohos		
<i>Botrytis</i>	Fruta y verduras	Reblandecimiento "pelusa".
<i>Penicillium/ Rhizopus</i>	Queso, pan	Malos sabores, manchas negras o verdes.
<i>Rhizopus</i>	Alimentos cocinados	
Levaduras	Mermeladas y conservas	Sabor vinoso, textura blanda.
	Queso	Viscoso, coloración grisácea, manchas "húmedas"

Fuente: Johns, 1995

Como se sabe, los efectos combinados de los factores que influyen el crecimiento de los microorganismos son los que determinan la supervivencia y desarrollo. Por ejemplo, a pH ácido aumenta la susceptibilidad de los microorganismos al calentamiento por lo que se requieren tratamientos térmicos más suaves. La siguiente tabla muestra microorganismos típicamente alterantes de alimentos de acuerdo a su pH.

Tabla 1-2 Tipos de alteración asociada típicamente a los alimentos

Rango de pH	Alimento	Rango de pH	Factores adicionales	Microorganismos alterantes	
Acidez baja 7.0-5.5	Leche	7.0-6.8	Antimicrobianos naturales	<i>Lactobacillus spp.</i> <i>Bacillus spp.</i> <i>Micrococcus</i> , Coliformes	
	Tocino	6.6-5.6	Cloruro sódico Nitrito sódico	<i>Micrococcus</i> , <i>Vibrio</i>	
	Carne en canal	7.0-5.4	Almacenada en refrigeración	<i>Acinetobacter</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Pseudomonas</i>	
	Carne roja		6.2-5.4	Refrigerada, envasada a vacío	<i>Lactobacillus</i> , <i>Brochothrix</i> , <i>Termosphacta</i> , Enterobacteriaceae
			6.6	Carne oscura al corte (DFD)	<i>Micrococcus</i> , <i>Bacillus</i> , Lactobacillaceae, Enterobacteriaceae
	Verduras enlatadas	6.4-5.4	Calor	Microorganismos del agriado plano <i>B. stearothermophilus</i>	
Acidez media 5.3-4.5	Mezclas de verduras enlatadas, sopas, salsas		Calor	Anaerobios termófilos, <i>Cl. Saccharolyticum</i> Anaerobios de la putrefacción.	
	Pepinillos en vinagre	7.0-4.5	Ácido acético	Levaduras, coliformes, bacterias ácido lácticas	
	Queso cotagge	4.5		Bacterias Gram negativas, levaduras	
Acido 4.5-3.7	Mahonesa, tomates, fruta	4.1-3.0 4.0		Levaduras, <i>Lactobacillus</i> , <i>Cl. pasteurianum</i> , <i>B. coagulans</i>	
	Frutas secas	4.5	Aw baja, sulfito	Mohos, levaduras	
Ácidez alta <3.7	Zumo de frutas	3.9-3.5	Calor	Mohos, levaduras, bacterias acidolácticas	
	Frutas cítricas	3.5-3.0		<i>Penicillium spp.</i>	

Fuente: ICMSF, 1991 (condensada)

Algunos de los hongos que afectan a los alimentos, produciendo diferentes alteraciones, se encuentran en las siguientes tablas:

Tabla 1-3 Ejemplos de podredumbres fúngicas en hortalizas

Nombre vulgar	Moho responsable
Podredumbre amarga	<i>Colletotrichum</i>
Podredumbre negra	<i>Rhizopus, Ceratocystis</i>
Podredumbre en pliegues	<i>Phytophthora</i>
Podredumbre de carbón	<i>Aspergillus alliaceus</i> (cebollas, ajos) <i>Penicillium hirsutum</i> (rábano picante)
Manchas oscuras	<i>Cladosporium</i>
Podredumbre blanda	<i>Trichothecium</i>

Fuente: Mossel, 2003

Tabla 1-4 Ejemplos de podredumbres fúngicas en frutas

Nombre vulgar	Moho responsable
Podredumbre negra	<i>Aspergillus</i>
Podredumbre parda	<i>Fusarium</i> (cítricos, piña) <i>Monilinia</i> (cerezas, melocotones) <i>Phytophthora</i> (manzanas, fresas)
Podredumbre del corazón	<i>Alternaria</i>
Podredumbre verde	<i>Trichoderma</i>

Fuente: Mossel, 2003.

1.2.6 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's)

Como se ha mencionado, por su origen, manejo, deficiencias en el proceso o contaminación posterior, los alimentos pueden transmitir enfermedades gastrointestinales como infecciones o intoxicaciones; las infecciones y las intoxicaciones microbianas son las más importantes porque en los alimentos, por su composición nutritiva y por los factores ambientales, una pequeña cantidad de microorganismos puede reproducirse y alcanzar niveles realmente peligrosos (Adams, 1997).

Las enfermedades asociadas al consumo de alimentos pueden deberse a factores de la formulación, como compuestos inhibidores inadecuados en el alimento; o del proceso como tratamientos térmicos insuficientes, contaminación cruzada a partir de materias primas, equipo sucio o malas prácticas, así como a transporte o almacenamiento inapropiados.

Los portadores asintomáticos pueden contaminar involuntariamente alimentos o infectar a otras personas. También se ha encontrado que algunas enfermedades diarreicas originan secuelas aparentemente no relacionadas, como artritis, problemas cardiacos o alergias, además iniciar o intensificar un estado de desnutrición (ICMSF, 1991).

Las enfermedades microbianas que se pueden transmitir por el consumo de alimentos se dividen en (Mossel, 2003):

- Infecciones alimentarias: por la ingestión de microorganismos patógenos que pueden invadir al hospedero o liberar toxinas resultantes del crecimiento dentro del tracto intestinal o en algún otro órgano. El número de células viables que pueden causar una infección es variable y puede ser reducido; se toman como parámetros:
 - a) la dosis infectiva mínima (DIM), que se define como el número de células más pequeño que iniciará la infección y causará los síntomas de la enfermedad en individuos anteriormente sanos y
 - b) la dosis infectiva media (DI_{50}), que es el número de células que provoca los síntomas de la enfermedad, en el 50% de la población expuesta.

- Intoxicaciones alimentarias: provocadas por la absorción intestinal de toxinas que ya estaban presentes en los alimentos antes de su ingestión, como consecuencia del crecimiento y metabolismo de los microorganismos en los sustratos alimentarios; destacan entre ellas, las toxinas de *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* y *Bacillus cereus*. También hay toxinas producidas por hongos filamentosos como *Aspergillus flavus* (aflatoxinas) o *Fusarium* (fumonisinas) (Forsythe, 2002).

La dosis infectiva

Es variable y está influida por varios factores (Mossel, 2003):

- Propiedades intrínsecas del microorganismo: Factores de virulencia como adherencia, producción de toxinas, penetración capilar y competitividad en el lugar de acción; supervivencia a las condiciones del tracto digestivo, al antagonismo ejercido por otros microorganismos y a los factores de defensa de la mucosa, así como las condiciones a las que ha estado expuesto el microorganismo anteriormente.
- El fenómeno de coinfección: Un segundo microorganismo patógeno puede cambiar el estado de "portador asintomático" de un hospedero hacia un primer microorganismo, por la modificación de la flora entérica normal, daño o lesión a la mucosa intestinal o por alteración de la motilidad del tracto entérico. Así, una dosis muy baja de un enteropatógeno puede desencadenar la enfermedad si se ingiere junto con otro agente patógeno.
- Tipo de alimento con el que es ingerido el patógeno: Para causar una enteritis bacteriana son necesarias cifras superiores a 10^4 células, pero si estos microorganismos son ingeridos con agua,

pasan casi inmediatamente desde el estómago hacia el duodeno y producen la infección con un número considerablemente menor de UFC's. Así mismo cuando los microorganismos están envueltos en los lípidos de los alimentos, se ven protegidos contra el efecto bactericida del jugo gástrico. Debido a estos fenómenos la dosis infectiva mínima por vía oral puede ser tan baja como de 1 a 10 células.

- Resistencia del hospedero: Las personas clínicamente enfermas son más susceptibles, sin embargo la respuesta de los consumidores aparentemente sanos frente a una dosis definida de un agente infeccioso, es muy variable y está influenciada por:
 - la acidez del jugo gástrico,
 - la defensa inmunológica humoral y celular,
 - la edad, el estado nutricional, el modo de vida y la incompetencia inmune resultante de una enfermedad como el SIDA,
 - la capacidad de la flora intestinal para impedir el asentamiento y la colonización de enteropatógenos en las diversas áreas críticas de revestimiento intestinal, es decir la "exclusión competitiva", y
 - la exposición anterior a un patógeno que originó una inmunidad protectora.

A continuación se presentan valores de la dosis infectiva mínima (DIM) estimada para algunos microorganismos causantes de ETA's.

Tabla 1-5 Dosis infectivas de causantes de ETA's

Agente patógeno	Mínima dosis infectiva estimada
<u>Formas vegetativas</u>	
<i>E. coli enteropatógena</i>	10 ⁶ a > 10 ⁷
<i>E. coli O157:H7</i>	10-100
<i>C. jejuni</i>	1000
<i>L. monocytogenes 4b</i>	1000
<i>Salmonella</i>	10 ⁴ a 10 ¹⁰
<i>Sh. flexneri</i>	10 ² a > 10 ⁹
<i>Sh. dysenteriae</i>	10 a 10 ⁴
<i>S. aureus</i> enterotoxigénico	10 ⁵ a 10 ⁶ /g*
<i>V. cholerae</i>	1000
<i>V. parahaemolyticus</i>	10 ⁶ a 10 ⁹
<i>Y. enterocolitica</i>	10 ⁷
<u>Bacterias esporuladas</u>	
<i>B. cereus</i>	10 ⁴ a 10 ⁸
<i>Clostridium botulinum</i>	10 ³ *
<i>Clostridium perfringens</i>	10 ⁶ a 10 ⁷
<u>Virus</u>	
Hepatitis A	< 10 organismos
SRSV	< 10 organismos

* Número de microorganismos viables capaces de producir toxina suficiente para provocar una respuesta fisiológica.

Fuente: Adaptado de Snyder, 1995 en Forsythe, 2002

Enfermedades alimentarias producidas por bacterias

Las enfermedades producidas por bacterias tienen un considerable impacto socio-económico, pueden incapacitar para el trabajo, o la actividad laboral puede verse reducida durante el padecimiento y la recuperación (ICMSF, 1991). A continuación se presentan las características de las principales ETA's de origen bacteriano.

Tabla 1-6 Características de algunas enfermedades alimentarias causadas por bacterias

Enfermedad o agente etiológico	Agente causante	Síntomas	Tiempo de incubación	Fuentes/Alimentos generalmente implicados	Medidas preventivas
Bacilosis	Toxinas producidas por <i>Bacillus cereus</i>	Náuseas, vómitos, dolor abdominal, con recuperación en menos de 24 h.	1-16 horas	Productos cocinados, pastas, arroz frito y leche en polvo	Manipulación higiénica y tratamientos térmicos: 30 min a 56° C para inactivar la toxina del síndrome diarreico y 90 min a 126° C para inactivar la toxina del síndrome vomitivo.
Botulismo	Toxinas producidas por <i>Clostridium botulinum</i> tipos A, B y E.	Náuseas, vómito y posible diarrea con fatiga, cefalea y mareos, posterior estreñimiento; visión borrosa, dificultad para tragar y hablar, debilidad muscular y temperatura corporal por debajo de la normal. Mortalidad del 65% por fallo respiratorio o cardíaco de 3 a 6 días.	18-48 horas	Conservas alimenticias de baja acidez, carne y pescado enlatados, pescado ahumado y preparado	En productos enlatados o ahumados, control de los procesos y puntos críticos: t, t, pH. Cocinar o recalentar para eliminar toxinas; los tipos A y B se inactivan a 80° C por 10 minutos y las del tipo E a 60° C, 5 min.

Enfermedad o agente etiológico	Agente causante	Síntomas	Tiempo de incubación	Fuentes/ Alimentos generalmente implicados	Medidas preventivas
Intoxicación estafilo-cóccica	Enterotoxina producida en el alimento por <i>Staphylococcus aureus</i>	Náuseas, vómitos, espasmos abdominales por gastroenteritis (inflamación de paredes de estómago e intestinos). Salvo complicaciones, no es mortal y remite en 1 a 3 días.	3-6 horas	Principal reservorio es la nariz humana; presente en 30 a 40% de las personas sanas que contaminan alimentos cocinados.	Pasteurización de alimentos susceptibles, refrigeración e higiene apropiadas; no exponer alimentos a temperaturas de riesgo para su desarrollo.
<i>Clostridium perfringens</i>	Toxina producida en el hospedero por <i>Clostridium perfringens</i>	Náuseas, vómitos ocasionales, diarrea y dolor ocasional. Recuperación rápida.	8-12 horas	Carne cocinada, aves y pescados mantenidos mucho tiempo a temperatura favorables para desarrollo.	Inmediata refrigeración de carne cocinada, aves y pescados; control de temperaturas de refrigeración. BPHyS.
Salmonelosis (infección)	Infección producida por alguna de las 1200 variedades patógenas de <i>Salmonella</i>	Náuseas, diarrea, fiebre, dolor abdominal que puede ir seguido de escalofríos y dolor de cabeza. En ocasiones, vómito. Duración: de 1 día a 1 semana. Mortalidad <1%.	6-24 horas	Carne, aves, huevos y productos lácteos poco cocinados o recalentados; son especialmente susceptibles cuando se mantienen mucho tiempo en frigorífico	Limpieza e higiene en los manipuladores de alimentos y del equipo; pasteurización, refrigeración apropiada y envasado. BPHyS
Shigellosis (disentería bacilar)	Infección por especies de <i>Shigella</i>	Náuseas, vómitos, diarrea líquida que puede ser sanguinolenta, fiebre, dolor abdominal, escalofríos y dolor de cabeza. Duración de pocos días.	1-7 días	Alimentos manipulados por trabajadores poco escrupulosos en higiene	Prácticas higiénicas de los manipuladores de alimentos; BPHyS
<i>Aeromonas</i>	Infección por <i>Aeromonas hydrophila</i>	Gastroenteritis	1 a 5 días	Agua, carne de aves, carnes rojas	Procesado, y almacenado higiénico; almacenar a T <2° C.

Enfermedad o agente etiológico	Agente causante	Síntomas	Tiempo de incubación	Fuentes/ Alimentos generalmente implicados	Medidas preventivas
Campylobacteriosis	Especies infectivas de <i>Campylobacter</i> : <i>C. jejuni</i> (89-93%) <i>C. coli</i> (7-10%)	Diarrea, dolor abdominal, retortijones, fiebre, abatimiento, heces sanguinolentas, dolor de cabeza, dolor muscular, desvanecimiento y raramente muerte. Duración de 2 a 14 días.	1-7 días	Aves y carnes rojas	Manipulación, proceso, preparación y almacenamiento de carnes siguiendo prácticas higiénicas. Control de T interna en la cocción.
Listeriosis	Infección por <i>Listeria monocytogenes</i> serotipo 4b	Diarrea, fiebre y dolor abdominal, puede resultar en: meningitis y meningoencefalitis, septicemia listerial, fiebre, intenso dolor de cabeza, náuseas, vómitos, lesiones post-contacto, colapso, coma, influenza falsa, interrupción del embarazo, parto con niño muerto; 30% de mortalidad en infantiles y adultos inmunocomprometidos.	1 día a varias semanas	Leche, ensalada de col, quesos, helados, aves, carnes rojas	Evitar el consumo de alimentos crudos que hayan contactado con animales infectados; almacenar alimentos a -2° C. Pasteurización adecuada; control de T en los procesos. BPHyS.
Yersiniasis	Infección por <i>Yersinia enterocolitica</i>	Dolor abdominal, fiebre, diarrea, vómitos, erupción cutánea durante 2-3 días y rara vez muerte	1-3 días	Productos lácteos, carne cruda, pescado, verdura fresca	Manipulación, procesado, preparación y almacenamiento de los alimentos en condiciones higiénicas
Infección por <i>E. coli</i> enteropatógena	<i>Escherichia coli</i> . Serotipos asociados a infecciones	Dolor de cabeza, fiebre, diarrea, vómito y dolor abdominal con duración de pocos días.	10-12 horas, con rango de 5-48 h	Agua y alimentos contaminados, principalmente cárnicos sub-cocinados y lácteos.	Manipulación higiénica y tratamientos térmicos suficientes.

Enfermedad o agente etiológico	Agente causante	Síntomas	Tiempo de incubación	Fuentes/ Alimentos generalmente implicados	Medidas preventivas
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (infección)	Infección por <i>Escherichia coli</i> O157:H7 enterohemorrágica	Colitis enterohemorrágica, puede provocar síndrome hemolítico urémico, con un 5-10% de mortalidad. Dolor abdominal, vómitos, anemia, trombocitopenia, lesión renal aguda con orina sanguinolenta, convulsiones, pancreatitis.	1 a 5 días	Carne de vaca picada, productos lácteos, carne cruda de vaca, agua, sidra de manzana, mayonesa;	Manipulación higiénica, irradiación, cocinar a 65° C o más.
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Toxina producida en el hospedador por <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Dolor abdominal, diarrea muy acuosa, náusea y vómito, fiebre y dolor de cabeza. Duración de 2 a 5 días. Mortalidad muy baja.	12-14 h, con rango de 2-48 h	Exclusivo de ambientes marinos Moluscos, bivalvos, crustáceos y peces.	Manipulación higiénica y cocinado suficiente de productos marinos.

Elaboración a partir de: Barreto, 2000; Katsuyama, 2005; Marriot, 2003; Forsythe, 2002 y Velazco, 2011.

Micotoxicosis

Se designa con el nombre de micotoxinas a las sustancias tóxicas producidas por el crecimiento de los mohos en los alimentos; existen más de 200 especies diferentes de mohos que producen sustancias tóxicas por vía oral para animales y el hombre. Se han identificado más de 300 micotoxinas y los tres géneros más importantes son *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Forsythe, 2002).

A continuación se muestran las micotoxinas más frecuentes en las ETA's y los alimentos implicados.

Tabla 1-7 Micotoxinas más importantes para la industria alimentaria

Micotoxina	Principales productores	Alimentos implicados
Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Granos de cereales, harina, pan, harina de maíz, palomitas de maíz, mantequilla de maní
Patulina	<i>Penicillium cyclopium</i> <i>Penicillium expansum</i>	Manzanas y productos derivados
Ac. Penicílico	Especies de <i>Aspergillus</i>	Alimentos enmohecidos de supermercados
Ocratoxina	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium viridicatum</i>	Granos de cereales, granos verdes de café
Esterigmatocistina	<i>Aspergillus versicolor</i>	Granos de cereales, queso, carne desecada, pastelería refrigerada y congelada.

Fuente: Marriot, 2003

Como se observa en la siguiente tabla, los efectos patológicos de las micotoxinas son adversos, y el consumo de dosis altas ó frecuentes puede producir enfermedades subsecuentes importantes.

Tabla 1-8 Efectos patológicos de algunas micotoxinas

Micotoxina	Origen	Efectos tóxicos
Aflatoxina	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>parasiticus</i> y <i>nomius</i> ; posiblemente también otras especies y géneros	Carcinogenicidad, con especial afinidad por el hígado; inmunosupresión
Fusarenona	<i>F. nivale</i>	Inhibición de la síntesis de proteínas en las células de los tejidos hematopoyéticos
Fusarina C	<i>F. moniliforme</i>	Mutagenicidad
Fusariogenina	<i>F. sporotrichioides</i>	Aleucia tóxica alimentaria (ATA)
Grioseofulvina	<i>P. islandicum</i>	Carcinogenicidad
Islandicina	<i>P. islandicum</i>	Mutagenicidad
Islandotoxina	<i>P. islandicum</i>	Hepatotoxicidad
Kójico, ácido	Varias especies de <i>Aspergillus</i> y <i>Penicillium</i>	Convulsiones
Luteosquirina	<i>P. islandicum</i>	Carcinogenicidad con especial afinidad por el hígado
Maltorrizina	<i>A. oryzae</i>	Efectos hemorrágicos y neurotóxicos
Moniliformina	Varias especies de <i>Fusarium</i>	Degeneración miocárdica
Ácido micofenólico	Varias especies de <i>Penicillium</i>	Toxicidad para los leucocitos, provocando anemia
Ocratoxinas	Varias especies de <i>Aspergillus</i> y <i>Penicillium</i>	Hepatotoxicidad; nefrotoxicidad
Oxalina	<i>P. oxalicum</i>	Neurotoxicidad
Paspalinina	<i>Claviceps paspali</i>	Producción de temblores
Patulina	Varias especies de <i>Penicillium</i> y <i>Aspergillus</i> , <i>Byssosclamyces nivea</i>	Toxicidad general y posiblemente carcinogenicidad
Paxilina	<i>P. paxilli</i>	Producción de temblores
Penicílico, ácido	Varias especies de <i>Penicillium</i> y <i>Aspergillus</i>	Carcinogenicidad; cardiotoxicidad
Psoraleno	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Efectos dermatíticos
Roquefortina	<i>P. roqueforti</i>	Neurotoxicidad, provocando ataques convulsivos
Roridina E	<i>Stachybotris atra</i>	Aleucia tóxica alimentaria (ATA)*
Rubratoxinas	<i>P. rubrum</i> y <i>purpurogenum</i>	Efectos hemorrágicos; hepatotóxico

Micotoxina	Origen	Efectos tóxicos
Secalónico ácido	D, Varias especies de <i>Penicillium</i>	Efectos hemorrágicos
Eslaframina	<i>Rhizoctonia leguminicola</i>	Interacción con el sistema nervioso parasimpático
Solaniol	<i>Fusarium solani</i>	Neurotoxicidad
Esporidesmina	<i>Pithium chartarum</i>	Hepatotoxicidad; eczema facial
Esporofusario-genina	<i>F. sporotriichioides</i>	Aleúcia tóxica alimentaria (ATA)
Vomitoxina	Varias especies de <i>Fusarium</i>	Vómitos
Wortmannina	<i>P. wortmannii</i> ; <i>Myrothecium spp.</i> ; <i>Fusarium oxysporum</i>	Hemorragias en estómago, intestino, corazón y timo
Xantoascina	<i>A.candidus</i>	Lesiones miocárdicas y pulmonares
Zearalenol	<i>P. roseum</i>	Afectan al útero
Zearalenona	Varias especies de <i>Fusarium</i>	Vómitos; interferencia con los sistemas de hormonas esteroides

*ATA: vómitos, inflamación aguda del aparato digestivo, anemia, insuficiencia circulatoria y convulsiones. (FAO, 2003)

Fuente: Mossel, 2003

Virus

Los alimentos pueden actuar como vehículos de transmisión de los virus; se denomina enterovirus a aquellos que producen infecciones gastrointestinales ya que se multiplican en el intestino de la persona infectada. Hay tres grupos principales involucrados en gastroenteritis viral: virus estructurados redondos pequeños (ó SRSV por sus siglas en inglés), virus de la hepatitis infecciosa y rotavirus (Forsythe, 2002).

La dosis infectiva puede ser tan baja como 10 partículas víricas y los alimentos con mayor frecuencia implicados en la transmisión de virus son los moluscos bivalvos, tales como almejas, berberechos, mejillones y ostiones (Caballero, 2008).

El virus de la hepatitis A produce fiebre, dolor abdominal, náuseas, espasmos e ictericia; los síntomas se presentan aproximadamente 25 días después de consumirlo, se encuentra en mariscos crudos de aguas contaminadas, bocadillos, ensaladas y postres. Para prevenir su presencia y transmisión se recomienda un manejo higiénico de los alimentos y cocinarlos a 70°C (Marriot, 2003).

En la siguiente tabla se resumen las principales ETA's virales,

Tabla 1-9 Virus transmitidos por alimentos y enfermedades asociadas

Familia	Virus	Enfermedad asociada
<i>Adenoviridae</i>	Adenovirus grupo F, Serotipos 40 y 41 (Ad V)	Gastroenteritis
<i>Astroviridae</i>	Astrovirus humano, 7 serotipos (HuAv)	Gastroenteritis benigna
<i>Liciviridae</i>	Calcivirus entérico humano, 5 o más serotipos (HuCv). Virus pequeños esféricos. Ejemplo: Norwalk o NLV. 4-9 (serotipos)	Gastroenteritis
	Hepatitis E (HEV)	Hepatitis
	Hepatitis infecciosa	
<i>Parvoviridae</i>	Parvovirus, ejemplo: agente de Dichling, y Cockle	Gastroenteritis asociada con mariscos
<i>Picornaviridae</i>	Poliovirus tipos 1 y 3 Echovirus tipos 1-65 Enterovirus (68-71) Coxsackie A(1-23) Coxsackie B(1-6) Hepatitis A (HAV)	Meningitis, parálisis, fiebre Meningitis, exantema, diarrea, fiebre, síntomas respiratorios Meningitis, síntomas respiratorios, miocarditis, Hepatitis infecciosa
<i>Reovirus</i>	Reovirus Rotavirus, principal A, ocasional Grupos B y C	Gastroenteritis
<i>Coronaviridae</i>	Coronavirus entérico humano (HECV)	Gastroenteritis posiblemente. Enterocolitis necrotizante del recién nacido
<i>Torovirus</i>	Torovirus humano	Gastroenteritis

(Caballero, 2008)

Para prevenir la contaminación de los alimentos por virus se debe poner énfasis en las BPHyS, mantener elevados estándares de protección de los alimentos y procedimientos sanitarios, y monitorear la salud del personal involucrado en su preparación (Adams, 1997).

A diferencia de las bacterias, los virus no se pueden multiplicar en los alimentos y como se pueden inactivar con tratamientos térmicos se recomienda la pasteurización de la leche para eliminar el virus de la hepatitis A. En el caso de los moluscos algunas instituciones recomiendan calentar de 85 a 90°C por lo menos durante 90 s, para destruir los virus (Caballero, 2008).

En la siguiente tabla se muestran datos para la inactivación de los virus en alimentos.

Tabla 1-10 Mínima temperatura interna y tiempo de cocción que asegura la inactivación de los virus

Alimento	Tiempo	Temperatura (° C)
Pollo y carnes rellenas	15 s	73.9
Carne molida	15 s	68.3
Carne de cerdo	15 s	68.3
Carnes inyectadas	60 s	65.6
Pescado picado	3 min	62.8
Huevo en platillo	3 min	62.8
<i>Rosbif</i>	12 min	60.0
Pescado, mariscos, carne de res (cubos, rebanadas), huevos en cascarón y otros guisos potencialmente riesgosos	15 s	62.8

Fuente: Caballero, 2008.

Parasitosis

Algunas veces los alimentos actúan como vehículo de parásitos, que al ser ingeridos por el hombre ocasionan enfermedades; éstas se producen como consecuencia de la presencia y acción nociva de los parásitos sobre las personas o animales. Los parásitos tienen diferentes características y algunos poseen ciclos vitales complejos pasando por diferentes fases en hospederos animales distintos (Forsythe, 2002; Costamagna, 2007).

Los parásitos afectan a sus hospederos en varios grados. Sus modos de acción incluyen por lo general una combinación de los siguientes: toman nutrientes del hospedero; consumen, digieren y destruyen sus tejidos; algunos productos de su metabolismo son tóxicos. Algunas infestaciones de parásitos únicamente causan molestias, pero otras causan importantes síntomas como: falta de apetito; crecimiento retardado; debilidad general; tos; pelo áspero; pérdida rápida de peso; diarrea (sanguinolenta) persistente; muerte (UGRJ, 2011).

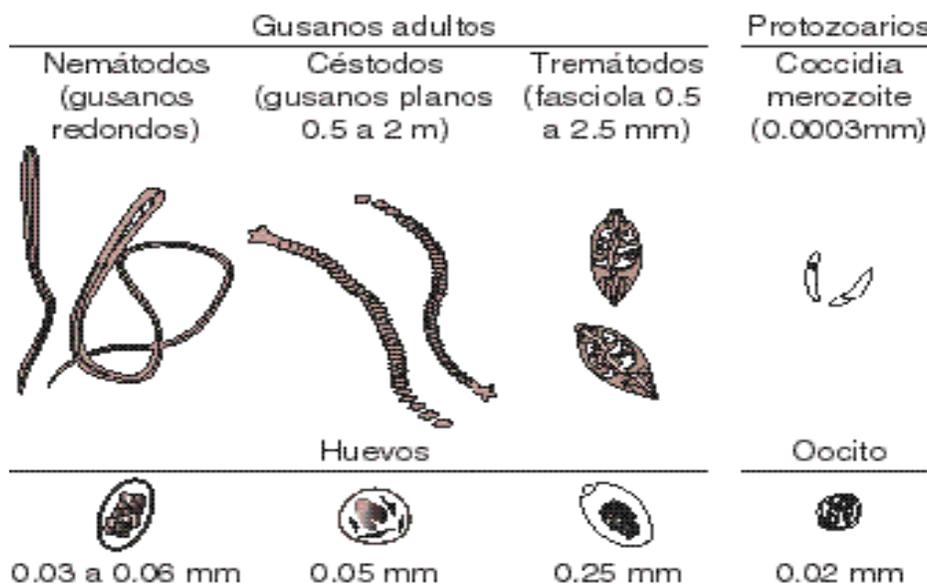


Figura 1-3 Parásitos internos comunes. Fuente: UGRJ, 2011

La infección indica entrada y multiplicación del parásito en el hospedador; mientras que el término infestación se emplea para aquellos parásitos que no se multiplican en el organismo del hospedador (para generar nuevos ejemplares necesitan cerrar un nuevo ciclo) (Costamagna, 2007).

Tabla 1-11 Principales enfermedades parasitarias humanas

Tipo	Especies	Enfermedad producida	Síntomas principales	Principal fuente de contagio	Hospederos intermediarios
Protozoos (organismos unicelulares)	<i>Entamoeba histolytica</i>	Disentería amebiana	Variables. Desde diarreas limitadas a ulceraciones de los órganos y hasta la muerte	Verduras y frutas contaminadas por manipuladores, moscas, etc. agua contaminada	Ninguno
	<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplasmosis	Hidrocefalia y ceguera en los niños. Menos grave en los adultos, a menudo crónica con posible afección de los ojos	Carnes crudas o poco cocidas (cerdo, cordero, vacuno, aves). Gatos domésticos	Gatos domésticos
Trématodos (gusanos planos sin segmentar, duelas)	<i>Fasciola hepática</i>	Fasciolosis	Inflamación, abscesos y hemorragias intestinales	Berros	Caracoles y rumiantes
	<i>Clonorchis sinensis</i>	Clonorquiasis	Infección del conducto biliar, vesícula biliar e hígado	Peces de agua dulce crudos o poco cocidos	Caracoles y peces de agua dulce
Céstodos (gusanos planos segmentados, tenias)	<i>Taenia solium</i> y <i>T. saginata</i>	Teniasis	Pérdida de peso o vómitos, dolores abdominales y en casos graves hasta la muerte	Cerdo (<i>T. solium</i>) y vacuno (<i>T. saginata</i>) poco cocidos	Cerdos y vacunos

Tipo	Especies	Enfermedad producida	Síntomas principales	Principal fuente de contagio	Hospederos intermediarios
Nemátodos (gusanos cilíndricos sin segmentar, gusanos redondos)	<i>Diphyllobothrium latum</i>	Difilobotriosis	Asintomática en el 50% de los casos. Diarrea, vómitos, somnolencia y debilidad general	Pescado crudo o poco cocido	Pescado de agua dulce
	<i>Trichinella spiralis</i>	Triquinelosis	Asintomática en la mayoría de los casos. En otros vómitos y diarrea los primeros días; después fiebres musculares, edema y fiebre	Carne de cerdo y embutidos crudos o poco cocidos	cerdos
	<i>Anisakis sp.</i>	Anisakiasis o enfermedad del "gusano del arenque"	Variables. Puede limitarse a dolor gástrico y vómitos, en los casos graves pueden producir úlcera de estómago	Pescado crudo o poco cocido. A menudo ligeramente salado	Pescados marinos, incluidos los arenques

Fuente: Forsythe, 2002.

1.3 LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN

Los residuos que contienen microorganismos pueden contaminar los alimentos, así como formar biopelículas que los protegen del ambiente y desinfectantes y que son difíciles de eliminar del equipo y los utensilios; los residuos de alimentos permiten la multiplicación de microorganismos, por lo que es importante garantizar que la limpieza sea eficaz y elimine los residuos de alimentos y de microorganismos.

La suciedad es material que se encuentra en un sitio inadecuado. Se compone de restos de lo que ha pasado por ahí; en el caso de la industria alimentaria, de restos de alimentos y polvo con partículas sueltas y materia orgánica (residuos de alimentos, jabones, objetos de limpieza) que puede encontrarse en un servicio de comidas o instalación procesadora de alimentos; también puede contener materia inorgánica como depósitos minerales, metálicos y alcalinos (Marriot, 2003).

1.3.1 Tipo de suciedad

El tipo de suciedad a eliminar varía de acuerdo con la composición del alimento y la naturaleza del proceso a que ha sido sometido; para limpiarlos deben elegirse los agentes de limpieza más convenientes. Los restos alimenticios pueden ser partículas secas y residuos desecados o cocidos, pegajosos, grasosos o viscosos; para eliminarlos se requiere una combinación de medios físicos, agua caliente y agentes químicos de limpieza (Forsythe, 2002).

A continuación se presenta una clasificación de los tipos de suciedad más comunes en la industria alimentaria.

Tabla 1-12 Tipos de suciedad

Componente en la superficie	Solubilidad	Limpieza	Cambios al calentar
Azúcar	Hidrosoluble	Fácil	Caramelización; más difícil de limpiar
Grasa	Insoluble en agua, soluble en álcali	Difícil	Polimerización; más difícil de limpiar
Proteína	Insoluble en agua, soluble en álcali, poco soluble en ácidos	Muy difícil	Desnaturalización; muy difícil de limpiar
Sales minerales	Hidrosolubilidad variable, la mayoría ácido-solubles	Fácil a difícil	Interacción con otros componentes difíciles de eliminar

Elaborada a partir de: Tamplin, 1980 en Forsythe, 2002 y Marriot, 2003.

1.3.2 El proceso de limpieza y desinfección

Los procesos de limpieza tienen cinco etapas básicas (Johns, 1995):

- Preparación o pre-limpieza: Desmantelamiento del equipo
- Operación de limpieza: Eliminación de partículas de alimentos adheridas a la superficie con agua 50-60°C y detergentes.
- Enjuague: Eliminación de residuos tras la limpieza, usando agua limpia.
- Desinfección: Destrucción de bacterias que sobreviven al proceso de limpieza, mediante calentamiento o usando productos químicos.
- Secado: Eliminación de agua que puede atraer a las bacterias; puede ser mediante evaporación o con aire caliente.

Existen cuatro tipos de manejo para el mantenimiento y limpieza, según la etapa de aplicación (Forsythe, 2002):

- Correctivo: Se basa en el informe rápido y eficaz de los defectos y acción de respuesta rápida.

- Preventivo: Consiste en determinar cuándo será necesario realizar el siguiente tratamiento y se planea ligeramente antes de la fecha en que se prevé que será indispensable.
- Planificado: Para acciones mayores que afectan al sistema productivo por lo que es necesario predeterminar cuándo sucederá; incluye inspecciones y documentaciones más rigurosas que los otros, generalmente con participación de personal de supervisión.
- Aplicando funcionamiento del equipo: Se aplica a aparatos muy difíciles de desarmar y/o de limpiar efectivamente por métodos simples; los sistemas "*Clean In Place*" o CIP por sus siglas en inglés, son ejemplo de estos procesos. Generalmente se aplican entre turnos.

1.3.3 Clasificación de detergentes

Las propiedades deseables de un agente limpiador son: completa y rápida solubilidad, no ser corrosivo a superficies metálicas, brindar completo ablandamiento de agua, excelente acción humectante, emulsificante de la grasa, solvente de los sólidos que se desea limpiar, buenas propiedades de enjuague, acción germicida, bajo precio, no tóxico y biodegradable (Flores, 1999). Se clasifican con base en su composición:

- Detergentes alcalinos, especialmente útiles para eliminar grasa: sosa cáustica, fosfato trisódico, bicarbonato de sodio, tetraborato de sodio.
- Detergentes ácidos, especialmente útiles para eliminar residuos de proteínas: ácido glucónico, ácido sulfónico.
- Detergentes a base de polifosfatos que actúan como secuestrantes de iones, útiles para eliminar residuos minerales; el ion trifosfato es de

gran utilidad porque forma complejos solubles con los iones calcio, fierro, magnesio y manganeso, quitando las manchas que estos ocasionan (Lomelí, 2007): Pirofosfato tetrasódico, hexametáfosfato de sodio.

- Agentes abrasivos (limpieza en seco): Arena a presión.

1.3.4 Técnicas de desinfección

La desinfección es un proceso físico o químico que reduce significativamente la carga microbiana, especialmente de microorganismos patógenos, de un material, medio o equipo (Forsythe, 2002). En la industria alimentaria, se aplican tratamientos de desinfección después del lavado como una de las medidas que en conjunto permiten asegurar la inocuidad de los productos que se procesan en dicho equipo.

De acuerdo a la NOM-093-SSA1-1994 las superficies de equipo de cocción de alimentos deben desinfectarse por lo menos cada 24 horas y las superficies que se utilicen en la elaboración de alimentos como rebanadora, sierra, mezcladora, molino, peladora, procesadora, batidoras, abrelatas, extractores de jugos y similares deben lavarse o limpiarse según el caso después de cada uso.

Los científicos han desarrollado una gran diversidad de técnicas de desinfección, pero comentaremos únicamente aquellas aplicables a la desinfección de superficies en la industria alimentaria.

Desinfección con agentes físicos: calor (seco/húmedo), radiación UV, radiaciones ionizantes (Flores, 1999).

Desinfección con sustancias químicas mediante la aplicación de: cloro, yodóforos, compuestos cuaternarios de amonio, compuestos anfóteros

tensoactivos, ácidos y álcalis fuertes, fenol y compuestos relacionados, agentes gaseosos esterilizantes, entre otros. Cabe señalar que en el uso de desinfectantes químicos, es indispensable (Wildbrett, 2000; Flores, 1999):

- Comprobar su eficacia y determinar si su acción es inhibidora o letal (microbiostática o microbicida) y su espectro de acción (bacteriostático, fungistático, viricida, bacteriocida, fungicida o parasiticida) e inclusive el grupo específico contra el cual es eficaz.
- Verificar la efectividad en la matriz del (o los) alimento(s) que se procesan en cada equipo
- Rotar los desinfectantes para evitar adaptación de los microorganismos y/o selección de mutantes resistentes.
- Considerar las condiciones de utilización: temperatura, el tiempo de acción, la concentración, la estabilidad y precauciones.

A continuación se presenta una tabla con las combinaciones de detergentes/desinfectantes más utilizadas en la industria.

Tabla 1-13 Combinaciones de detergentes/desinfectantes más utilizados en la industria alimentaria

Detergente	Desinfectante
Álcalis inorgánicos	Hipocloritos Compuestos orgánicos que liberan cloro QAC's *
Ácidos inorgánicos	Tensioactivos no iónicos Iodóforos
Tensoactivos aniónicos	Compuestos orgánicos que liberan cloro
Tensoactivos no iónicos	QAC's Yodóforos

*Compuestos cuaternarios de amonio.
Fuente: Forsythe, 2002.

1.4 EVALUACIÓN DE LA HIGIENE

El objetivo de la limpieza y desinfección es asegurar la elaboración de alimentos inocuos y con buena capacidad de conservación. Y es necesario llevar a cabo un control microbiológico del equipo e instalaciones sometidas a limpieza y desinfección, para comprobar que dichos procesos son eficaces y contribuyen al objetivo. Los controles que pueden aplicarse son (Forsythe, 2002):

- Vigilar las condiciones de trabajo en la limpieza y desinfección.
- Comprobar el estado microbiológico de las instalaciones limpiadas o dispuestas para el funcionamiento.
- Llevar a cabo el control microbiológico inicial del producto preparado.
- Controlar reclamaciones concretas.

Hasta los años 1980's el único método para medir el estatus higiénico de las superficies en contacto con alimentos era el método tradicional basado en cuenta estándar de bacterias, en placa de agar (Easter, 2003); muchas especificaciones para la industria, se han hecho con base en esta determinación, como ejemplifica la siguiente tabla:

Tabla 1-14 Especificaciones de número aceptable de microorganismos alterantes en las superficies de contacto con los alimentos

Recuento microbiano UFC's	Condición de la superficie
< 1/cm ²	Excelente
2-10/cm ²	Bueno
11-100/cm ²	Se requiere limpieza
101->1000/cm ²	Fuera de control: parar el proceso y buscar el fallo

Adaptada de: Snyder, 1995 en Forsythe, 2002.

De acuerdo a la NOM-093-SSA1-1994, las especificaciones microbiológicas para superficies inertes en contacto con alimentos son: Cuenta total de mesófilos aerobios < 400 UFC/cm² de superficie y coliformes totales < 200 UFC/cm² de superficie.

Recientemente se han desarrollado diversos métodos de evaluación de higiene, de los cuales no todos se han trasladado a la industria debido a problemas en su aplicación o interpretación; se muestran algunos ejemplos en la siguiente tabla.

Tabla 1-15 Técnicas de detección de la suciedad en sistemas CIP

Técnica	Medición	Escala de tiempo	Problemas
Transferencia de calor	Rendimiento térmico-Nivel de suciedad	Tiempo real	Precisión e interpretación dependientes del modelo del proceso
Flujo de calor local	Rendimiento térmico-Nivel de suciedad	Tiempo real	Confiabilidad a escala local según el material del modelo
Pérdida de la presión total o tasa de flujo	Rendimiento hidráulico espesor de la suciedad	Tiempo real	Precisión (presión diferencial); interpretación de unidades complejas dependientes de un patrón de flujo
Ultrasonido	Espesor de la suciedad	Tiempo real	Escala local, intrusión en el flujo, calibración
Técnicas de ATP/ADN	Actividad microbiana	Retrospectiva	Tiempo de espera, especificidad de detección según costo, volumen del líquido de medición, células inactivas
Microbiológicas (hisopado)	Actividad química y microbiana.	Retrospectiva	Tiempo de espera, consumo de tiempo, operadores hábiles, acceso invasivo para la toma de muestras
Visual	Suciedad o biopelículas	Tiempo real	Fácil, sin equipos y rápida. Precisión y resolución subjetivas.
Instrumentos ópticos: FTIR, NR	Suciedad o biopelículas	Tiempo real	Acceso a las superficies de proceso; escala local, calibración, umbral del sensor.
Propiedades eléctricas de líquidos (capacitancia, conductividad, amperometría)	Suciedades	Tiempo real	Detecta materiales en líquidos, no en superficies, agrega incertidumbre según la fuente, la sensibilidad varía para diferentes contaminantes, cambia la resolución según concentraciones, especificidad
Propiedades eléctricas de superficies	Suciedad, biopelículas y corrosión	Tiempo real	Escala local, implementación en áreas de proceso, calibración

Fuente: Wilson, 2005.

1.4.1 Determinación de residuos persistentes

Desde luego, que hay residuos que son más fáciles de eliminar y algunos que son persistentes; ello depende de la composición de las matrices manejadas en el equipo, las temperaturas de proceso, el material y características de la superficie, el tiempo transcurrido entre el uso y la limpieza. Para el control de residuos de grasa, Trautman (1981) considera las siguientes posibilidades (Wildbrett, 2000):

- Visual: Utilización de colorantes para hacer evidente el residuo.
- Fotométrica: Disolviendo una muestra de la superficie en alcohol para medir la capacidad de transmisión de la solución, que depende de la grasa presente.
- Radiométrica: Marcaje radioactivo de la grasa y medición de la actividad residual sobre las superficies enjuagadas (para fines de diseño e investigación).
- Gravimétrica: Pesar el soporte portador de la suciedad antes y después de la limpieza.
- Conductométrica: Determinación del proceso de desengrasado con un electrodo en el líquido de enjuague, a través del aumento de la conductividad eléctrica.

Los residuos persistentes de almidón pueden determinarse con un método de antrona conjugada, en microescala (Lang y Wildbrett, 1989). Rietz (1993) elaboró un protocolo simplificado de este proceso (Wildbrett, 2000).

Los restos persistentes de proteína pueden disolverse con lejía de sosa y para verificar la eficiencia se aplica al agua de enjuague una hidrólisis

ácida y reacción con ninhidrina; la determinación puede ser cualitativa (visual) o cuantitativa mediante espectrofotómetro (Wildbrett, 2000).

Finalmente, para detectar residuos inorgánicos, se disuelven en ácido y se cuantifican en el fotómetro de llama (Sauerer, 1989 en Wildbrett, 2000).

1.4.2 Análisis microbiológico

Según investigaciones de mercado realizadas en 2003 por *Strategic Consulting Inc.*, del total de ensayos microbiológicos realizados por la industria en el mundo (1,136.5 millones), el 58% (660.5 millones) correspondieron a la Industria de la Alimentación, de los cuales 49% se aplicaron en alimentos y 9 % en bebidas. Aproximadamente, el 20% de los análisis se dirigieron a la detección de los microorganismos patógenos *Salmonella* y *Escherichia coli* O157:H7 y el 80% restante fueron análisis rutinarios (recuento total, de coliformes, de mohos y de levaduras) (Herranz, 2008).

Debido al gran número y variedad de los microorganismos presentes, los análisis bacteriológicos son menos exactos y precisos que los métodos químicos de análisis y aunque el análisis bacteriológico puede que no proporcione resultados precisos, es muy útil para indicar el nivel de higiene en el equipo, utensilios manejo de materias primas y otros aspectos del ambiente y productos alimenticios (Marriot, 2003).

Los que se aplican específicamente para evaluación de sistemas de higiene son los de análisis microbiológico de superficies inertes; pueden llevarse a cabo por métodos tradicionales que se caracterizan por ser laboriosos, emplear grandes volúmenes de medios de cultivo y requerir un tiempo considerable para la obtención de resultados (Herranz,

2008); ó por métodos modernos, entre los que se incluyen los basados en la detección de ATP por bioluminiscencia (Forsythe, 2002).

Los métodos tradicionales más usados para estos análisis son:

Cuenta en placa de bacterias aerobias: El método de cuenta en placa, a veces denominado recuento total en placa, puede utilizarse para conocer el grado de contaminación del aire, agua, superficies del equipo, instalaciones y productos alimenticios. Cuando se aplica a superficies, éstas se frotran con hisopos, que luego se diluyen en un líquido adecuado como agua peptonada o buffer de fosfatos, según el nivel de contaminación esperado; éste líquido se inocula luego en un medio nutritivo solidificado con agar, en una caja Petri y se incuba en las condiciones adecuadas para el grupo microbiano que se quiere detectar, generalmente mesófilos (Marriot, 2003). Una vez que se tienen las diluciones, el análisis también puede llevarse a cabo utilizando placas Petrifilm 3M™.

Técnica de la placa de contacto: En esta técnica, en vez de utilizar hisopos y diluciones, se abre una placa cubierta hasta el borde con el medio de cultivo (o una diseñada específicamente para ello, como la placa *Rodac*) y se comprime contra la superficie a estudiar; sólo puede utilizarse en superficies ligeramente contaminadas, por ejemplo para comprobar la eficacia de un programa desinfectante (Marriot, 2003).

Sin embargo una importante limitación de estos métodos es que se requieren al menos 18 a 24 horas de incubación, antes de tener un resultado; es largo para una prueba de higiene previa a la producción.

1.4.3 Métodos rápidos de evaluación de higiene

El principio en el que se basan estos sistemas es que las señales del desarrollo microbiano tales como niveles de trifosfato de adenosina (ATP); el cual se emplea para almacenar y liberar energía en las células de los seres vivos mediante las interconversiones de ATP y ADP (difosfato de adenosina) (Brown, 2004), enzimas específicas, pH, impedancia, conductancia y capacitancia eléctricas, se modifican paralelamente con el crecimiento microbiano; para que las mediciones sean significativas es necesario establecer la correlación entre estos parámetros y el recuento de células viables (Herranz, 2008).

Algunos de los más importantes son:

Pruebas con indicadores y la reducción del colorante: Algunas enzimas producidas por microorganismos son capaces de inducir reacciones de reducción que se pueden detectar mediante sustancias indicadoras como colorantes. La reducción es acompañada de un cambio de color, proporcional al cambio de potencial redox, que a su vez es proporcional al número de microorganismos presentes. En su versión más simple se usa un papel filtro empapado de colorante que se aplica directamente sobre una muestra de alimento, una pieza del equipo o una superficie para conocer su estado higiénico (Marriot, 2003).

Existen tiras para la prueba de "contaminación con tejido o líquido tisular" (TTFC) que detectan los péptidos y azúcares reductores; un resultado positivo indica la presencia de material orgánico que puede favorecer el desarrollo microbiano en una superficie (Forsythe, 2002).

También existen hisopos para la detección de proteínas, los cuales no requieren instrumentos de medición ya que se interpretan visualmente, detectando el cambio de color que indica la presencia de proteínas y

proporciona una medida de la higiene; algunos autores consideran que la interpretación es algo subjetiva (3M, 2011).



Figura 1-5 Hisopo Pro-Tect de 3M para detección de residuos proteicos



Figura 1-4 Hisopo Flash de Biocontrol. Detectores instantáneos tipo lápiz para detección de restos de proteínas en superficies.

A continuación se muestra una tabla con algunos de los principales productos de este grupo:

Tabla 1-16 Hisopos monitores de proteína de 3M para verificación de limpieza y determinación de proteínas alergénicas

Producto	Aller-tect	Pro-tect	Protect-M
Analito	Proteínas alergénicas	Proteínas totales	Proteínas residuales
Procedimiento	Incubación 15 min a 55° C	Incubación 10 min a T amb	Incubación 45 min a 37° C
Aplicaciones	Monitoreo Alérgenos en equipo para Alimentos	Monitoreo de limpieza, industria de Alimentos	Monitoreo de limpieza, industria de alimentos, hospitales
Sensibilidad	5 µg	50 µg	3 µg
Resultados	Verde: pasa Morado: Desaprobado	Verde: pasa Morado: Desaprobado	Verde: pasa Morado: Desaprobado
Todos están basados en la reacción de Biuret, que presenta interferencias por limpiadores alcalinos y H ₂ O ₂ , y se almacenan en refrigeración.			

Fuente: adaptado de 3M, 2011.

1.4.4 Bioluminiscencia

La bioluminiscencia es la capacidad de algunos organismos vivos para emitir luz; hay organismos luminiscentes entre los crustáceos, protozoos, hongos, celentéreos, bacterias, gusanos y medusas (bioluminiscencia sin O₂), así como entre insectos y peces (Shimomura, 2006).

El estudio moderno de la bioluminiscencia comenzó cuando R. Dubois, fisiólogo francés en 1885 realizó la primer reacción luciferina-luciferasa con dos extractos acuosos de *Pyrophorus* y en 1887 con extractos de *Pholas dactylus*; uno de los extractos se obtuvo triturando los insectos con agua fría y otro extracto fue hecho con agua caliente, los dos extractos se tornaban luminiscentes cuando eran mezclados, de lo que Dubois concluyó que el extracto de agua fría contenía una enzima termolábil específica y necesaria para la reacción luminosa a la que llamó "luciferasa", también concluyó que el extracto de agua caliente contenía una sustancia relativamente estable al calor y específica para la reacción a la cual designó "luciferina". Se percibió entonces que se trataba de una reacción sustrato-enzima que emitía luz. El resplandor de la luciérnaga procede de un órgano en el abdomen y el ritmo de la secuencia de destellos está bajo control nervioso (Shimomura, 2006).

Se creía que todos los fenómenos de bioluminiscencia se debían a la reacción luciferina-luciferasa, hasta que en 1961 se descubrió la proteína aequorina, a partir de la medusa *Aequorea*. La aequorina emite luz en soluciones acuosas, con adición de Ca²⁺, en presencia o ausencia de oxígeno, la emisión de luz es una reacción intramolecular de la proteína, y es proporcional a la cantidad de proteína. Las propiedades de la aequorina fueron distintas a las de la luciferina o la luciferasa y entonces se introdujo el término fotoproteína.

Ahora se conocen más fotoproteínas: las sensibles al Ca^{2+} , en celenterados y en protozoarios; las de activación por peróxido encontradas en gusanos y en coleópteros; y las de activación por ATP encontradas en el ciempiés *Luminodesmus* (Shimomura, 2006).

La luciérnaga utiliza el ATP en un conjunto de reacciones que convierten energía química en energía luminosa. Los principales componentes son la luciferina (un ácido carboxílico complejo) y la luciferasa (una enzima) (Lenhinger, 1993).

El ATP es altamente soluble en agua y muy estable en soluciones de pH entre 6.8 y 7.4, pero se hidroliza rápidamente a pH extremo. Por consiguiente, se almacena mejor como una sal anhidra, tarda varias semanas en hidrolizarse. La masa molecular del ATP es de 507,181 g/mol y su acidez es de 6.5 (Yurkanis, 2008).

Las células eucariontes contienen alrededor de un gramo de ATP por kilogramo, cantidad que sólo alcanza para una milésima parte del consumo diario (Garrahan, 1994). Una célula procarionte contiene aproximadamente de 10-15 pg ATP (Forsythe, 2002). El ATP se produce de forma continua y cualquier proceso que bloquee su producción provoca la muerte rápida.

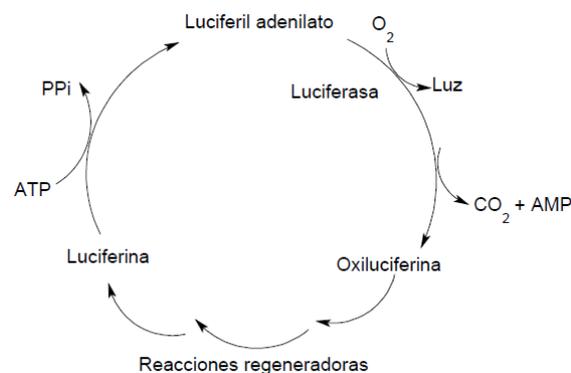


Figura 1-6 Ciclo de la bioluminiscencia (Lenhinger, 1993)

En el laboratorio se utilizan luciferina y luciferasa de luciérnaga para medir cantidades muy pequeñas de ATP, del orden de 10^{-12} mol. Debido a que la necesidad del ATP es específica, la reacción luminiscente de la luciérnaga es un ensayo altamente sensible y específico para la presencia de ATP en una muestra; un destello de luz resultante de aproximadamente 10^{-10} mol de ATP puede medirse sin dificultad por medio de un fotomultiplicador (Lenhinger, 1993).

- **La reacción luminiscente de las luciérnagas**

La reacción de bioluminiscencia de las luciérnagas requiere, además del ATP, la luciferina y la luciferasa, de ión Mg^{2+} como cofactor. La luciferina es activa en la forma D y como la forma L es inactiva y es un inhibidor competitivo (Shimomura, 2006).

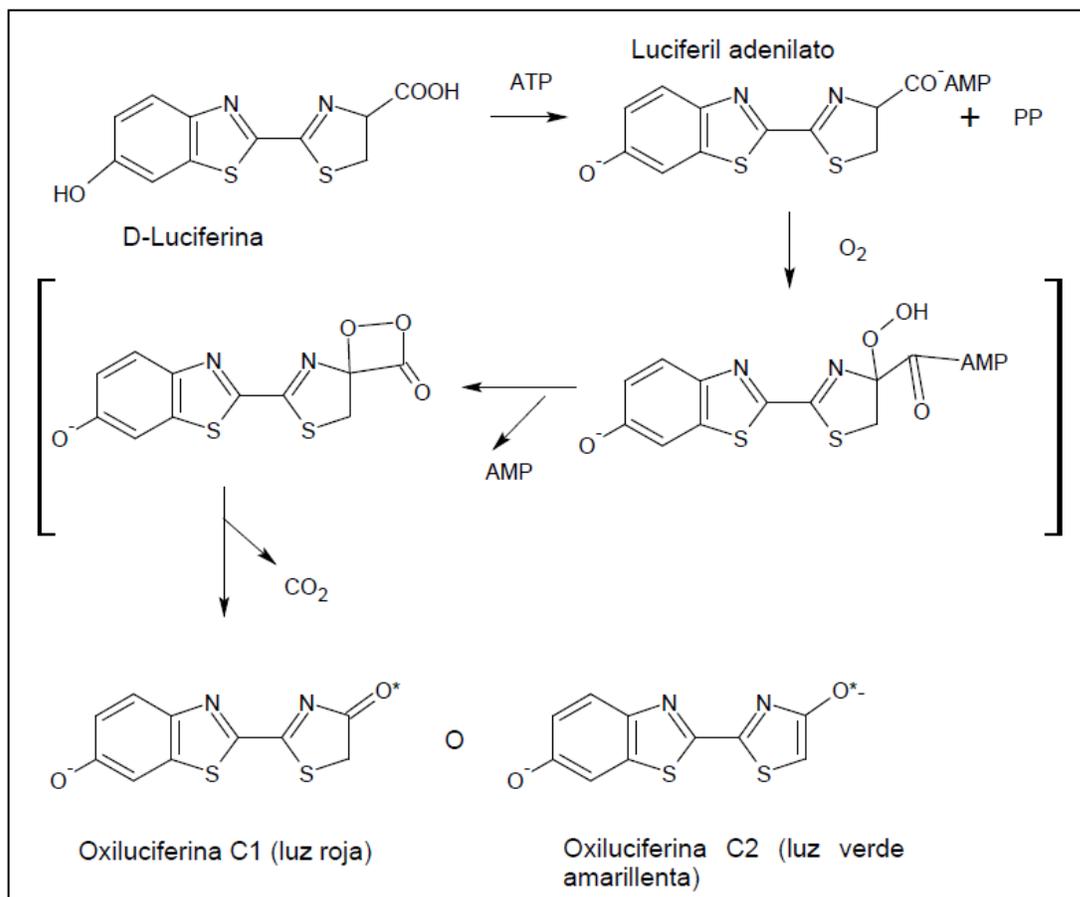


Figura 1-7 Esquema del mecanismo de la reacción de bioluminiscencia
Fuente: Shimomura, 2006.

En el primer paso de la reacción, el sustrato se prepara por unión de AMP, seguidamente se oxigena con liberación de AMP y a continuación se parte con liberación de CO₂. El principal producto, la oxiluciferina puede estar en dos formas isoméricas ceto C1 y enólica C2. Según el pH (pH>7.5 favorece la forma ceto), se forma en un estado excitado singulete que emite un *cuanto* de luz al pasar a su estado electrónico fundamental, la emisión tiene su máximo a 562 nm (Shimomura, 2006). El pH óptimo es de 7.8 y la temperatura óptima es de 20-22 °C (Forsythe, 2002).

- **Inhibidores de la reacción**

Son inhibidores de la reacción de bioluminiscencia los detergentes, pH ácido y alcalino, colores fuertes y cloro libre. Los detergentes se neutralizan con lecitina y Tween 80 (Scharam, 1991 en Forsyhte, 2002); también hay productos comerciales patentados para neutralizar la acción de detergentes específicos, por ejemplo ciclodextrinas para neutralizar los compuestos cuaternarios de amonio y otros detergentes catiónicos (Forsyhte, 2002).

Los sanitizantes usados en la industria pueden tener influencia sobre la reacción (Green, 1998):

El hipoclorito de sodio en concentraciones menores a 70 ppm y los compuestos cuaternarios de amonio en concentraciones menores a 30 ppm no tienen efecto en las mediciones.

El ácido láctico en concentraciones $\geq 0.5\%$ reduce las lecturas de Unidades Relativas de Luz (RLU por sus siglas en inglés *Relative Light Units*) hasta en un 75% ($P \leq 0.05$).

El fosfato trisódico $> 1\%$ reduce en un 60% las lecturas RLU.

El peróxido de hidrógeno al 0.1% no tiene efecto en las mediciones de ATP, pero al 1% reduce las lecturas en un 60 % ($P \leq 0.05$).

El triclosán al 0.25% no tiene efecto significativo sobre las lecturas, pero al 0.5% y al 1%, las lecturas se reducen en un 30% y 50% respectivamente.

Por lo tanto cuando se piensa incluir los sistemas de evaluación basados en bioluminiscencia para determinar la calidad sanitaria del equipo de proceso, es esencial considerar el tipo y concentración de limpiador o sanitizante que se utiliza.

- **Componentes para llevar a cabo un ensayo**

Además de los componentes básicos, para llevar a cabo un ensayo los kits comerciales cuentan con otros componentes, ya sea para estabilizar el pH, la emisión de fotones y en general aumentar el rendimiento de la reacción; desde luego los componentes específicos, concentraciones y otros detalles son parte de las patentes de los productos, pero en general, utilizan (La Rosa, 1998; Shimomura, 2006):

- Buffer tricina 25 mM pH=7.8, 10-25mM Tris-HCl o buffer glicil-glicina, pH 7.5-7.8, para asegurar condiciones óptimas de pH para la reacción,
- $MgSO_4$ 5mM ó $MgCl_2$ en la misma concentración para proporcionar el cofactor,
- EDTA 0.5mM para secuestrar iones que pueden interferir,
- DTT (Ditiotreitol) 0.5mM, para mejorar la reacción de bioluminiscencia, por su actividad reductora del grupo sulfhidrilo (Niwa, 2004),
- BSA (Albúmina sérica bovina) para estabilizar la enzima y
- Agua como medio de reacción.

Como en toda reacción enzimática, hay un tiempo óptimo o pico de la reacción, que ocurre entre los 0.3 y 0.5 segundos después de la inyección del ATP. La intensidad de la luz en el pico de la reacción es proporcional a la cantidad de luciferasa, pero debido al corto tiempo de respuesta, la intensidad de la luz se mide a los 5 y 10 segundos después de la inyección del ATP, y no en el momento pico (Shimomura, 2006).

La duración de la emisión de luz se puede hacer más larga y constante si se adiciona alguno de los siguientes suplementos: 13-20 μM PPI (Pirofosfato), 0.18 mM oCTP (periodato oxidado histidina trifosfato), 1 mM ADP, 270-500 μM CoA y 1 μM PPI con 16 μM L-luciferina (La Rosa, 1998).

Los fabricantes de los equipos utilizan hisopos humedecidos con un extractante de ATP que puede ser cloruro de benzalconio, Triton X-100, cloruro de bencetonio, cloruro de cetilpiridinio o ácido tricloroacético (Forsythe, 2002).

- **El luminómetro**

El luminómetro contiene un fotomultiplicador para detectar la señal luminosa, que es un instrumento electrónico cuya finalidad es convertir una señal luminosa (a veces de unos pocos fotones) en un pulso eléctrico amplificado; sus principales elementos son: una capa fotosensible llamada fotocátodo y una estructura multiplicadora de electrones construida por una serie de dínodos sometidos a diferentes voltajes en orden creciente (Botija, 2011). El fotón llega al fotocátodo y transfiere su energía al electrón que es empujado por fuerzas electrostáticas alejándolo del cátodo y cuando éste choca contra una placa, le arranca varios electrones, los electrones van de una placa a la siguiente, y cada vez se multiplica su número. Si hay 10 placas, y cada

electrón arranca cuatro electrones secundarios, cuando el rayo electrónico llega a la última placa comprende ya alrededor de un millón de electrones. El número de electrones secundarios que se libera de este modo, depende de la energía cinética de los electrones incidentes, de la tensión con que estos últimos han sido acelerados y de las capas de óxido de magnesio u óxido de cesio con que estén formadas las paredes (Barros, 2001).

Los instrumentos de la primera generación requerían sumergir el hisopo utilizado en un dispersante y mezclar en otro recipiente con los reactivos; por lo tanto había operaciones de pipeteado y retrasos en la lectura que son fuente de errores. Los instrumentos de segunda generación tienen la cubeta para la lectura con los reactivos, en el extremo del estuche del hisopo, sellados con una capa que se rompe con el mismo hisopo después de tomar la muestra, de manera que la reacción se produce inmediatamente y como un todo se llevan al luminómetro para hacer la lectura sin demora (Forsythe, 2002).

1.4.5 Evaluación de higiene por bioluminiscencia

El control de la higiene en el proceso de producción puede realizarse fácilmente utilizando un equipo de bioluminiscencia para detectar ATP, ya que permite la determinación en tiempo real de los niveles de higiene, para identificar áreas problemáticas y confirmar la efectividad de las acciones correctivas (Forsythe, 2002), se lleva a cabo en menos de 1 minuto (3M, 2008), desde la toma de muestra hasta el resultado, en tanto que el cultivo de microorganismos más sencillo requiere de 18 a 24 horas. Existen diversos sistemas para realizar esta evaluación, se muestran algunos sistemas en la tabla siguiente.

Tabla 1-17 Análisis comparativo de sistemas de monitoreo de higiene por ATP

Marca	Hygiena™	Charm™	Charm™	Biotrace™	BioControl™	Neogen™	Merck®
Nombre del Instrumento	systemSURE II	Luminator-T	NovaLum	Unilite NG	Lightning MVP	Accupoint	HY-Lite 2
Tiempo de lectura (s)	15	5	5	10	10	10	10
Nombre del hisopo colector	Ultrasnap	PocketSwab Plus	PocketSwab Plus	Clean-Trace	Lightning MVP Swab	AccuClean	Hy-Lite Rinse Pen
Almacenamiento de hisopos	2-8° C	2-25° C	2-25° C	2-8° C	2-30° C	2-8° C	2-8° C
Sensibilidad ¹ (Femtomoles de ATP)	0.97 – 9,999	1.73 – 100,000	N/A	1.53 – 100,000	0.2 -10,000	2.6 - 999	N/A
Reproducibilidad ²	8% - 18%	9% - 28%	N/A	8% - 20%	11% - 56%	N/A	N/A
Forma de lectura	Relación: 1fM=1RLU	RLU	RLU	RLU	Escala log y RLU	RLU	RLU
Tamaño (cm) instrumento	18.5x7x 3	22.5x13x8	18.1x9.8x6	15x10x20	20.5x10x5.5	14x8.5x4.5	11x13x28

fM = femtoMol. Un femtoMol = 10⁻¹⁵ de un mol.

¹Sensibilidad se define como:

Limite de Detección (L.O.D.)=(3xDesviación estándar del blanco)+Media del blanco.

²Reproducibilidad o coeficiente de variación se calculó utilizando 10 réplicas para cada dilución de ATP (2-2000 fM) aplicadas a hisopos directamente.

N/A (Not Available)- Información no disponible o que no se pudo encontrar.

Fuente: *Hygiena™*, 2006.

- **Los sistemas de evaluación de higiene utilizados en el estudio**

Los sistemas seleccionados *3M™ Clean Trace™* (anteriormente *Biotrace™*) y *BioControl™ Lightning MVP*, son instrumentos de segunda generación, similares en cuanto a precio y con escalas arbitrarias en RLU (Unidades Relativas de Luz) para que el usuario pueda tomar decisiones a partir de los resultados, el sistema de *BioControl™* muestra dos valores en pantalla, uno referente a las RLU y otro con el cual se toman límites de rechazo-aceptación recomendados.

Tabla 1-18 Parámetros de los sistemas utilizados

Parámetro	Sistema	
	<i>3M™ Clean Trace™</i>	<i>BioControl™ Lightning MVP</i>
Superficie limpia	Lectura <150 RLU	Desde 0 hasta 2.5
Precaución	150 a 299 RLU	De 2.6 a 3.0
Superficie sucia	> 300 RLU	De 3.1 a 7.5
Sensibilidad	1.53–100,000 femtomoles de ATP (Hygiena, 2006)	0.2-10,000 femtomoles de ATP (Hygiena, 2006)
Repetibilidad/ Reproducibilidad	Repetibilidad CV=7.8% (Simpson, 2006) Reproducibilidad CV=8%-20% (Hygiena, 2006)	Reproducibilidad CV=11%-56% (Hygiena, 2006)

La repetibilidad se refiere al grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método en intervalos cortos de tiempo y la reproducibilidad se refiere al grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea por dos analistas o instrumentos diferentes, usando el mismo método en diferentes días (Vega, 2011).

El proceso de evaluación de higiene se ha estandarizado prácticamente en todos los equipos para muestrear áreas de 100 cm² (10x10 cm²) con un hisopado de 10 trazos en un sentido y otros 10 trazos en sentido perpendicular.

Los límites de aceptación – rechazo recomendados por los fabricantes pueden modificarse de acuerdo a los requerimientos de higiene y características del lugar; por ejemplo tienden a ser más estrictos en líneas de envasado o empacado de producto terminado, que en zonas donde se trabajan materias primas que luego serán sometidas a tratamientos térmicos.

El equipo *3M™ Clean Trace™* indica que, una vez activado el hisopo, se debe agitar lateralmente 5 veces y se toma la lectura. El *BioControl™ Lightning MVP* dice que se debe agitar lateralmente 5 segundos y se toma la lectura. Ninguno de los dos establece límite de tiempo para tomar la lectura, o estabilidad de la misma. Por eso, como parte de este trabajo, se registraron las lecturas a intervalos regulares hasta 55 segundos.

La sensibilidad se refiere al límite de detección, es la mínima concentración que puede ser atribuida al analito, convencionalmente se define como la concentración correspondiente a una respuesta igual a la señal del blanco (y_b) más tres veces la desviación estándar de la señal del blanco ($LD_S = y_b + 3s_b$), esta respuesta es interpolada en la curva de calibración para obtener la mínima concentración detectable (LANAVASE, 2010), que es de 100 RLU (1.53 femtomoles de ATP o 10 000 microorganismos) para el sistema de *3M™*.

- **Otras aplicaciones de la bioluminiscencia**

La luz emitida por la luciferasa en la reacción de bioluminiscencia se ha utilizado también para monitorear la expresión de genes, cuando se hacen modificaciones genéticas dirigidas (Mao Yi, 2011), así como para otras aplicaciones bioanalíticas, como en la detección y cuantificación de inhibidores de la nitrificación natural en los sistemas suelo-planta utilizando *Nitrosomonas europaea* recombinante, debido a la expresión de los genes luxAB introducidos, de *Vibrio harveyi* (Subbarao, 2006).

Recientemente se han desarrollado métodos basados en bioluminiscencia para determinar exclusivamente la contaminación microbiana en muestras de alimentos; se utiliza extracción diferencial para separar ATP somático de ATP microbiano, el ensayo requiere aproximadamente 5 minutos en total, el coeficiente de correlación entre Unidades Formadoras de Colonias y la medida en RLU es de 0.82 y la probabilidad de clasificar correctamente por niveles de contaminación microbiana es superior a 98% (Siragusa, 1996).

Para determinar únicamente el ATP microbiano se extrae éste selectivamente; primero se extrae el ATP no microbiano con un detergente no iónico (Tritón X-100) y se destruye inmediatamente mediante alta concentración de ATPasa de patata. A continuación se extrae el ATP microbiano con ácido tricloroacético al 5% o con un disolvente orgánico como etanol, acetona o cloroformo, y finalmente se hace la reacción de bioluminiscencia con el ATP disponible, que será el que se ha extraído de los microorganismos (Simpson, 1991 en Forsythe, 2002).

También se han desarrollado métodos con membrana para la detección y enumeración microbiológica rápida (RMDS) de Milliflex® para muestras que se pueden filtrar, los datos se dan directamente en Unidades Formadoras de Colonias y su sensibilidad es equivalente al método tradicional, obteniendo los resultados en menos horas, como se muestra en la tabla siguiente (Chollet, 2008).

Tabla 1-19 Detección rápida y tradicional de microorganismos ATCC y poblaciones mezcladas en agua estéril

Microorganismo	Detección rápida Milliflex		Cuenta tradicional	
	Tiempo de incubación (horas)	Cuenta de UFC (SD)	Tiempo de incubación (días)	Cuenta de UFC (SD)
Cepas ATCC				
Escherichia coli ATCC 8739	6	44 (4.5)	1	58.2 (2.4)
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	8	66.6 (3.8)	1	76.4 (5.1)
Burkholderia cepacia ATCC 25416	16	42.3 (1.5)	2	53 (2.6)
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	9	78.3 (1.5)	1	104 (7.2)
Saccharomyces cerevisiae ATCC 7754	4	48 (2.0)	2	51 (2.5)
S. epidermidis + B. cepacia	16	65.7 (6.1)	2	64.7 (5.8)

UFC es la media de tres pruebas. ATCC (Colección americana de tipos de cultivos) UFC (Unidades formadoras de colonias) SD (Desviación estándar) (Chollet, 2008)

El método se basa en la filtración por membrana, la bioluminiscencia de ATP y el análisis de imagen; se filtra la muestra, se incuba, se introduce en el sistema y se adiciona una solución para lisar las células, después se rocía automáticamente una solución con los componentes para la reacción de bioluminiscencia e inmediatamente se toma una foto con una cámara, en la que se captura la imagen luminosa y se transforman los resultados a UFC`s, directamente por el sistema (Chollet, 2008).

II. OBJETIVO

Comparar la sensibilidad de dos sistemas de evaluación de higiene, basados en la determinación de ATP por bioluminiscencia en superficies de plástico y de acero inoxidable, mismos que son: *3M™ Clean Trace™* (anteriormente *Biotrace™*) y *BioControl™ Lightning MVP* y determinar la estabilidad de las lecturas.

Los sistemas se compararon:

- ❖ Mediante la aplicación de suspensiones de alimentos y microorganismos en superficie de plástico.

- ❖ Mediante la aplicación de suspensiones de alimentos y microorganismos en superficie de acero.

- ❖ En todos los casos se midió la estabilidad de la lectura.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES:

Hisopos de superficie *3M™ Clean Trace™*

Hisopos de líquidos *3M™ Clean Trace™*

Hisopos de superficie para el sistema *BioControl™ Lightning MVP*

Tubos de ensayo

Matraces de 1000 y 100mL

Probeta de 100mL

Pipetas graduadas de 10 mL

Varilla de vidrio en L

Placas *Petrifilm™ 3M™ AC*

Placas *Petrifilm™ 3M™ YM*

SUSTANCIAS, MEDIOS Y MUESTRAS

Solución salina isotónica (SSI)

Extracto de Levadura

Caldo BHI

Caldo lactosado

Caldo y agar sabouraud con 2% dextrosa

Agar soya tripticasa

Alcohol etílico 70°

Jugo de naranja envasado "Único fresco" de Jumex®

Leche entera pasteurizada

Alim. lácteo fermentado *Sofúl®*

Salchicha tipo viena

Detergente líquido lavatrastes sin cloro

CEPAS (obtenidas del Cepario de FQ de la UNAM):

Salmonella typhi CFQ-B 138

Escherichia coli ATCC 10536

Listeria monocytogenes CFQ-B 103

Candida albicans ATCC 10231

EQUIPO:

Medidor de densidad óptica *Densimat Biomerieux®* y tubos para su uso

Parrilla eléctrica

Agitador de tubos (Vórtex), *MAXI MIX Plus™ Thermolyne*

Difusores para las placas *Petrifilm™*

Contador de colonias Quebec

Homogeneizador *Stomacher™* y bolsas para su uso con doble cierre

Luminómetro *3M™ Clean Trace™*

Luminómetro *BioControl™ Lightning MVP*

Micropipeta *Accumax PRO™* de 10-100 µL y puntas estériles

Micropipeta *Accumax PRO™* de 100-1000 µL y puntas estériles

Incubadora de 37° C

Incubadora de 28° C

Autoclave

Mechero de Bunsen

Cronómetro *Agilent Technologies™*

Gradilla para tubos

Tablas de polipropileno para alimentos, *Microban®* (36x25)cm

Superficies de acero inoxidable (40x45)cm

Plantillas de opalina con recuadro interno de 10cmx10cm

Descripción del proyecto

Este trabajo consistió en comparar la sensibilidad de los dos sistemas de evaluación de higiene por bioluminiscencia *3M™ Clean Trace™* y *Biocontrol™ Lightning MVP*. Entre las actividades previas se tomaron lecturas con la solución blanco, diluyente para todas las muestras solución salina isotónica SSI estéril (solución de NaCl al 0.85%), verificándose lecturas RLU que no interfirieran con los resultados, se estandarizaron los cultivos de los microorganismos que se utilizaron mediante la escala de Mc Farland (ver apéndice A) y corroborando la concentración mediante cuenta en placa; se verificó el funcionamiento de ambos sistemas y se hicieron pruebas preliminares para estandarizar el método de higienización de las dos superficies en estudio, así como la manera de contaminarlas tanto con microorganismos como con alimentos, y para asegurar que había respuesta de los equipos, con las concentraciones de microorganismos y de alimentos que se planeaba utilizar.

Para la comparación, se hicieron ensayos simultáneos, por triplicado, en superficies de plástico y acero inoxidable; primero se hicieron con diferentes cargas de los 4 microorganismos: *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, y *Candida albicans*, por último se aplicaron las soluciones de los 4 alimentos diferentes representativos de la industria alimentaria: cárnicos (salchicha), lácteos (leche pasteurizada y alimento lácteo fermentado) y bebidas (jugo de naranja). En todos los casos se midió también la estabilidad de la lectura. Los consumibles de *3M™ Clean Trace™* fueron proporcionados por 3M™ de México al igual que el sistema de evaluación de higiene. Los cultivos de microorganismos fueron proporcionados por el Cepario de la FQ.

3.1 CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Los microorganismos utilizados se estandarizaron a partir de cultivos de 24 h a los cuales se midió densidad óptica mediante *Densimat Biomerieux*[™] y se sembraron para cuentas en placa, de manera que se pudieran relacionar los datos de ambos métodos (ver apéndice A) y, a lo largo del estudio, se pudiera ajustar la concentración necesaria de microorganismos mediante densidad óptica (ver apéndice B). Cabe señalar que siempre se confirmó mediante cuenta en placa.

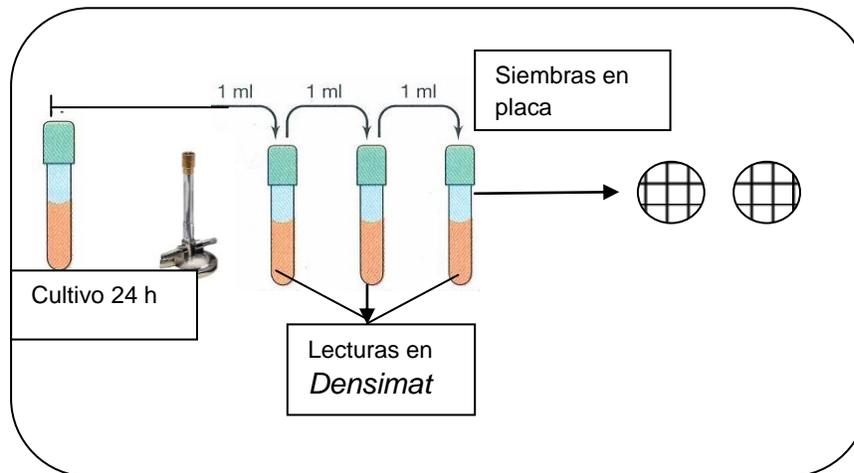


Figura 3-1 Diagrama de la cuantificación de microorganismos

3.2 VERIFICACIÓN DE LOS SISTEMAS DE EVALUACIÓN DE HIGIENE

Para asegurar que los sistemas de evaluación de higiene estuvieran en óptimas condiciones, se verificó que la fecha de última calibración siguiera vigente y se efectuaron los controles según las especificaciones de cada fabricante.

BioControl™ Lightning MVP

Control negativo: Activar el hisopo sin haberlo utilizado y se deben tener valores de 1.3 – 2.2 en la escala arbitraria, valores que se obtuvieron:

Tabla 3-1 Control negativo efectuado Biocontrol™

Tiempo de lectura (s)	Hisopo 1		Hisopo 2	
10	1.8	677	1.7	533
25	1.6	406	1.5	325
40	1.5	341	1.5	292
55	1.5	332	1.4	256

Control positivo: Vial de 1×10^{-13} mol de ATP liofilizado, que aplicado al hisopo debe dar de 3 – 4 en la escala arbitraria; resultados menores a 2 indican un problema con el instrumento, si se obtienen resultados de 2 – 2.9 se debe repetir. Resultados mayores a 4 indican contaminación.

Preparación de la concentración de 1×10^{-13} mol de ATP a partir de vial con 3 ng de ATP: $(3 \text{ ng ATP}/1.183 \text{ mL}) \times (20 \text{ } \mu\text{L}) = (1 \times 10^{-13} \text{ mol ATP})$
Resultados obtenidos en el intervalo de 3 a 4, como lo indicado.

Tabla 3-2 Control positivo efectuado Biocontrol™

Tiempo de lectura (s)	Hisopo 1	
10	3.3	18803
25	3.3	19486
40	3.3	19616
55	3.3	19310

3M™ Clean Trace™

Control negativo: Lectura menor a 10 RLU del sistema sin hisopo, comprobada al encenderlo.

Control positivo: Vial de 3 ng de ATP, que de acuerdo a su preparación y aplicación debe dar los siguientes resultados.

Tabla 3-3 Control positivo con sistema 3M™. Valores RLU de acuerdo a la cantidad de ATP.

[ATP]	Cantidad aplicada a hisopo	Lectura en RLU
Vial de ATP	3 ng	>10 000
3 ng/mL	20 Ml	>300
0.3 ng/mL	20 µL	<100

Preparación según instrucciones del fabricante: $(3 \text{ ng/mL}) \cdot (20 \mu\text{L}) > 300 \text{ RLU}$, las lecturas obtenidas fueron las siguientes.

Tabla 3-4 Control positivo con estándar de ATP purificado, efectuado 3M™

Tiempo de lectura(s)	Hisopo 1	Hisopo 2
10	792	859
25	803	864
40	824	878
55	853	869

Se verificó que los sistemas de evaluación de higiene estaban en condiciones satisfactorias para realizar las pruebas, ya que cumplieron las especificaciones de los fabricantes mediante el uso de los controles positivos y negativos.

3.3 PROCESO DE LIMPIEZA-DESINFECCIÓN

El proceso diseñado consistió en las siguientes etapas:

- Enjuague con agua caliente
- Aplicación de solución detergente
- Aplicación de fuerza mecánica con fibra de celulosa
- Enjuagues con agua fría y caliente
- Secado

Después de varias pruebas, se determinó que el enjuague con agua caliente, sería a 80°C; la solución detergente sería con “salvo alternativa al cloro™” en concentración 1:20, la fuerza mecánica se aplica por 60 segundos y los enjuagues son 3 con 500 mL de agua fría y uno con el mismo volumen de agua a 80 °C, para cada superficie. Finalmente se determinó que la mejor forma de secar es al ambiente, pues el uso de paños o papel deja residuos que pueden interferir.

3.4 MÉTODO PARA LA APLICACIÓN DE CONTAMINANTES Y ESTABILIDAD DE LECTURAS

Se preparó la dilución del alimento o microorganismo y se inocularon 100 µL a la superficie limpia y seca, delimitada por plantilla de opalina (Davidson, 1999) y se extendió con varilla de vidrio esterilizada, con dos pases perpendiculares sin girarla y tres retoques a la superficie, dejando 1 cm de los bordes del recuadro. Se dejaron secar las muestras al ambiente, por 20 min.

Se hicieron los hisopados como lo indican los fabricantes (ver apéndice C), atemperando los hisopos antes de usarlos, en el ambiente del laboratorio durante 20 minutos después de sacarlos de refrigeración; una vez tomada la muestra, se activaron los hisopos y se introdujeron al luminómetro para hacer las lecturas, registrándolas a los 10 segundos después de activado el hisopo (como indican los fabricantes) y a los 25, 40 y 55 segundos, para establecer la estabilidad de las lecturas.

3.5 PRUEBAS PRELIMINARES CON ALIMENTOS

Se hicieron diluciones de cada alimento, aplicando 20 μL directo al hisopo y se determinaron las RLU. De las mismas diluciones, se aplicaron 100 μL a superficies de plástico y de acero previamente sanitizadas y secas para establecer qué concentraciones era adecuado probar en el estudio.

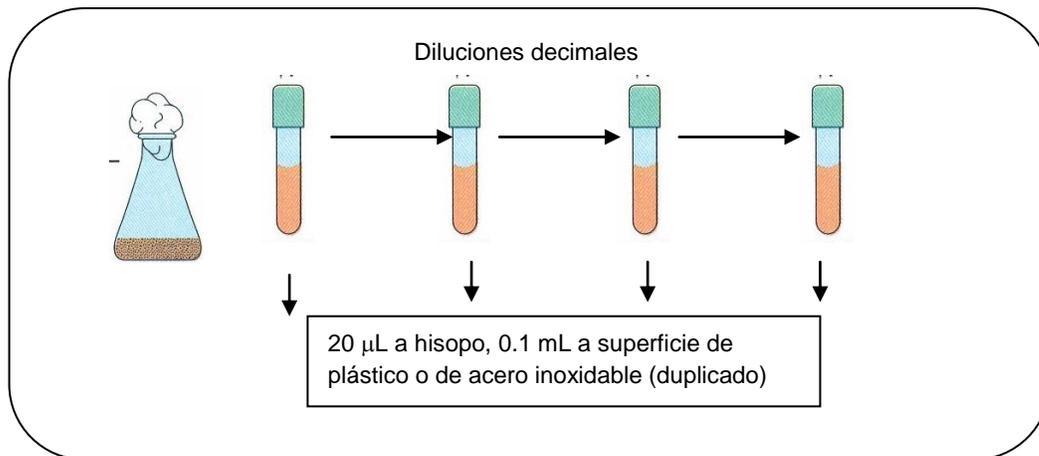


Figura 3-2 Diagrama de las pruebas preliminares con alimentos

3.6 PRUEBAS PRELIMINARES CON MICROORGANISMOS

Se efectuaron con suspensiones de cultivos de 24 h, ajustadas a una concentración que permitiera lecturas, de acuerdo con la sensibilidad reportada para ambos equipos. Se aplicaron igual que las suspensiones de alimentos y se registraron las lecturas.

3.7 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD CON LOS DOS SISTEMAS DE EVALUACIÓN DE HIGIENE

Para cada experimento, primero se higienizaban superficies de acero y plástico; luego se aplicaban por triplicado las suspensiones de microorganismos a partir de cultivos de 24 h (estandarizadas y verificadas) y soluciones de los alimentos, siguiendo el procedimiento descrito para la aplicación de contaminantes. A continuación se tomaron muestras con los hisopos correspondientes para cada sistema y se hicieron lecturas a los 10 segundos en los equipos respectivos. Las lecturas se repitieron a los 25, 40 y 55 segundos, para determinar su estabilidad.

En esta etapa se incorporó el uso de hisopos para líquidos de *3M*[™], para conocer si el límite de detección era similar en los hisopos de superficie y de líquidos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PRUEBAS PRELIMINARES CON ALIMENTOS

Las pruebas preliminares con alimentos se efectuaron con el sistema *3M™ Clean Trace™*, en dos modalidades: se aplicaron 20 µL de las suspensiones directamente al hisopo de superficie y se contaminaron las superficies de prueba con 100 µL de las suspensiones; el tiempo de secado después de la contaminación, se estableció en 20 min. Se muestran a continuación los resultados de estas pruebas preliminares; todas se hicieron por duplicado.

Cabe mencionar que el propósito del estudio es determinar cuál de los dos sistemas detecta mejor la contaminación, o cual marca precaución y rechazo con cantidades más bajas de contaminantes, para lo cual se establecieron primero las suspensiones de alimentos y microorganismos que dieran lecturas cercanas al límite de precaución para el sistema *3M™ Clean Trace™*.

Conviene recordar cuáles son las formas de interpretar las lecturas en RLU para fines de evaluación de higiene del sistema *3M™ Clean Trace™*, que fue el utilizado en las pruebas preliminares.

Tabla 4-1 Interpretación de RLU para evaluación de higiene de *3M™ Clean Trace™*

Interpretación	Lectura del sistema <i>3M™ Clean Trace™</i>
Superficie limpia o ACEPTABLE	<150 RLU
Precaución o REPETIR EL ENJUAGUE	150 a 299 RLU
Superficie sucia o RECHAZO, SE REQUIERE VOLVER A LAVAR	> 300 RLU

4.1.1 Leche pasteurizada

Tabla 4-2 Resultados preliminares de leche pasteurizada

Pruebas contaminando el hisopo (20 µL directamente al hisopo). Lecturas en RLU																
t(s)	Leche 10 ⁻³				Leche 10 ⁻²				Leche 10 ⁻¹							
10	29		38		94		115		134		1219		1409			
21	22		28		89		115		120		1176		1417			
33	19		25		91		111		117		1189		1415			
Pruebas en superficies. Lecturas en RLU																
t(s)	Plástico								Acero							
	10 ⁻¹		10 ^{-2*}		10 ⁻²		10 ⁻³		10 ^{-1*}		10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻²	
10	241	292	177	92	77	84	88	68	71	233	1163	1277	1501	289	132	90
25	240	288	192	92	72	81	86	62	71	234	1226	1276	1505	283	133	87
40	233	294	199	94	73	85	93	64	71	239	1216	1271	1505	277	132	82
55	240	299	207	97	72	85	95	66	74	234	1210	1287	1489	277	132	81

* Se repitió en vista de resultados poco consistentes.

Para la aplicación de la suspensión directamente al hisopo, se obtuvieron lecturas muy bajas en concentración 10⁻³, en 10⁻² las lecturas son bajas pero cercanas al límite de precaución y en 10⁻¹ se tienen valores aproximadamente 10 veces mayores como es de esperarse; esto significa que el límite de precaución y rechazo para las soluciones de leche se encuentra entre 10⁻² y 10⁻¹, pero más cercano a 10⁻². Hay una razonable proporcionalidad entre los resultados a diferentes concentraciones de leche.

En cambio, como puede observarse, los valores obtenidos al aplicar las suspensiones de leche a las superficies de prueba, no son tan

consistentes. En los resultados mostrados (y en algunos otros, no mostrados), se puede apreciar que hay variaciones en los resultados interpretados y que son aún más erráticos en el acero, lo cual coincide con la dificultad encontrada para dispersar la contaminación en dicha superficie.

Los resultados en RLU para suspensiones de leche 10^{-2} y 10^{-3} aplicadas a superficies de plástico, están por debajo del límite de precaución, que es de 150 RLU. Mientras que para la concentración 10^{-1} , los valores de RLU están en la zona de precaución.

En la superficie de acero se observó que para la solución de leche 10^{-2} los valores son menos consistentes ya que aunque todos los datos son de aceptación, algunos están cercanos al límite de precaución. En la solución de leche 10^{-1} los valores son como 10 veces mayores que para la solución de leche 10^{-2} , pero incluye resultados de aceptación, de precaución y de rechazo, aunque éstos últimos predominan. Los límites de precaución y rechazo estarían en las soluciones intermedias entre 10^{-1} y 10^{-2} . A partir de estos resultados, las superficies se contaminaron con suspensiones 10^{-1} y 10^{-2} de leche.

4.2.2 Jugo de naranja

Tabla 4-3 Resultados preliminares de jugo

Pruebas contaminando el hisopo (20 µL directamente en hisopo). Lecturas en RLU																
t(s)	Jugo 10 ⁻²				Jugo 10 ⁻³				Jugo 10 ⁻⁴							
10	5832		5454		1258		961		101		125					
20	5953		5715		1266		958		92		117					
30	5996		5888		1253		962		90		115					
60	6129		5786													
Pruebas en superficies. Lecturas en RLU																
t(s)	Plástico						Acero									
	10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴		10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴		10 ⁻⁴ *	
10	10695	8476	2129	1942	157	205	74801	70057	7260	5834	671	725	290	62	151	94
25	10895	9032	2204	1952	152	202	74094	69670	7331	5860	662	716	293	62	149	93
40	11299	9591	2244	1949	154	200	73827	69256	7376	5878	660	727	290	60	152	92
55	11488	10153	2268	1948	154	203	73469	69019	7433	5893	654	720	294	59	152	92

* Se repitió en vista de resultados poco consistentes.

Lo primero que se puede notar es que son datos mucho más consistentes que en las pruebas preliminares con leche. En las muestras directamente aplicadas al hisopo, el límite de precaución está por encima de 10⁻⁴, ya que en 10⁻³ se tienen valores mucho más altos.

La tabla anterior muestra que para las soluciones de jugo aplicadas a superficies de plástico, el equipo mostró valores de precaución desde la solución de 10⁻⁴, y en concentración de jugo de 10⁻³ ya se obtienen valores muy altos, muy superiores al límite de rechazo.

En la tabla que antecede se observa también que para las soluciones de jugo 10⁻⁴ aplicadas a la superficie de acero, los valores presentan mucha

variación y la solución de jugo 10^{-3} da valores de rechazo; el límite de precaución quedaría entre 10^{-3} y 10^{-4} para jugo.

4.2.3 Salchicha tipo Viena

Se homogenizaron 10 g de salchicha en 90 mL de SSI estéril, en *Stomacher* a velocidad alta durante 120 seg (10^{-1}) y a partir de esta suspensión, se elaboraron las siguientes diluciones decimales. Se omitieron las pruebas con aplicación directa al hisopo, ya que los resultados no se ven afectados por la interacción con la superficie.

Tabla 4-4 Resultados preliminares de salchicha

Salchicha	Lecturas en RLU											
	Plástico				Acero							
t(s)	10^{-3}		10^{-4}		10^{-3}		10^{-4}		10^{-5}		10^{-6}	
10	226	110	70	67	391	320	432	389	326	1048	391	320
25	230	124	64	65	394	329	437	404	333	1066	394	329
40	227	133	66	68	395	330	432	405	330	1059	395	330
55	232	128	64	69	395	332	426	408	330	1055	395	332

En plástico la suspensión de salchicha 10^{-3} tiene valores de aceptación y de precaución, en tanto que la suspensión de 10^{-4} da valores muy cercanos, dentro de la zona de aceptación.

En acero la solución 10^{-3} da valores cercanos y similares a la aplicación de la misma solución en superficie de plástico; pero en las suspensiones más diluidas, no hay proporcionalidad en las lecturas; se atribuyó a interferencias por la composición de la salchicha, ya que fue constante aún en repeticiones (no mostradas). Para las pruebas finales, se

estandarizó la forma de tomar la suspensión de salchicha para contaminar, a fin de reducir en lo posible dichas interferencias. Se consideró que el límite de precaución está cercano a la solución 10^{-3} .

4.3 PRUEBAS PRELIMINARES CON MICROORGANISMOS

Se llevaron a cabo como las preliminares con alimentos, por duplicado, aplicando 20 μ L al hisopo de superficie y 100 μ L a superficies limpias y secas, de plástico y acero inox., 20 minutos de secado de la muestra e hisopado según instrucciones, registrando lecturas a 10, 25, 40 y 55 s.

4.3.1 *E. coli*

Se preparó el inóculo y se corroboró el recuento mediante siembra en placas *Petrifilm AC* por duplicado (ver apéndice B). En la tabla siguiente se muestran las cantidades del microorganismo realmente aplicadas.

Tabla 4-5 Resultados Preliminares con *E. coli*

Pruebas contaminando el hisopo (20 μL directamente en hisopo). Lecturas en RLU																
t(s)	80x10 ³ UFC							80x10 ² UFC								
10	406			402				64				53				
25	424			423				62				49				
40	449			430				60				49				
55	466			441				64				49				
Pruebas en superficies. Lecturas en RLU																
t(s)	Plástico								Acero							
	40x10 ⁴ UFC		40X10 ³ UFC*						40X10 ² UFC		40x10 ⁴ UFC		40X10 ³ UFC		40X10 ² UFC	
10	679	735	820	439	135	165	134	107	56	352	246	91	59	36	31	
25	703	755	836	431	134	171	135	110	56	355	250	94	59	36	31	
40	724	736	842	441	131	177	135	109	56	365	261	90	56	35	36	
55	730	772	846	435	128	171	140	110	59	366	268	92	61	35	39	

* Se repitió en vista de resultados poco consistentes.

Cuando el hisopo se contamina con 80×10^3 se obtiene un resultado de rechazo, y cuando se aplican sólo 80×10^2 UFC, los resultados son de aceptación.

En la superficie de plástico, cuando se aplican 40×10^4 UFC los valores son altos, por encima del límite de rechazo, mientras que en la suspensión con 40×10^3 UFC se obtuvieron valores en la zona de rechazo y cercanos a la zona de precaución; consistentemente, al aplicar 40×10^2 UFC se obtuvieron valores en la zona de aceptación.

En acero se obtuvieron valores de precaución y rechazo al contaminar con 40×10^4 UFC, mientras que para 40×10^3 UFC se obtuvieron valores en la zona de aceptación, y para 40×10^2 UFC los resultados son de aceptación muy por debajo del límite de precaución.

La suspensión de 40×10^4 , se eligió para comenzar con las pruebas con ambos sistemas.

4.3.2 *Salmonella typhi*

Se preparó el inóculo como se ha explicado y se corroboró el recuento mediante siembra en placas *Petrifilm AC* por duplicado (ver apéndice B). En la tabla siguiente se muestran las cantidades del microorganismo realmente aplicadas.

Tabla 4-6 Resultados preliminares *S. typhi*

Pruebas contaminando el hisopo (20 µL directamente en hisopo). Lecturas en RLU										
t(s)	86x10 ⁴ UFC		86x10 ³ UFC*						86x10 ² UFC	
10	5897	6332	63	459	255	85	260	253	18	19
25	6016	6374	70	476	297	97	315	319	19	23
40	6050	6421	78	496	330	109	356	346	19	19
55	6077	6490	82	508	361	121	386	390	19	18

Pruebas en plástico. Lecturas en RLU										
t(s)	43x10 ⁴ UFC		43x10 ³ UFC*				43x10 ² UFC*			
10	742	882	253	74	403	251	377	170	372	84
25	772	882	264	77	400	257	380	174	386	78
40	768	893	267	78	404	272	376	182	393	76
55	780	894	269	79	408	276	382	183	395	78
Pruebas en acero. Lecturas en RLU										
t(s)	43x10 ⁴ UFC*				43x10 ³ UFC		43x10 ² UFC			
10	328	164	499	457	170	225	114	110		
25	346	181	517	491	173	232	118	112		
40	363	191	528	512	177	237	124	122		
55	381	206	544	524	177	241	129	124		

* Se repitió en vista de resultados poco consistentes.

En las pruebas de aplicación al hisopo, el límite de precaución se encuentra cercano a 86×10^3 UFC, ya que se obtuvieron tres valores en la zona de precaución, dos valores en la zona de aceptación y uno de rechazo; en acero y plástico el límite de precaución está cercano a 43×10^3 UFC y el de rechazo está cercano a 43×10^4 UFC.

4.3.3 *Listeria monocytogenes*

Se preparó el inculó como se ha explicado y se corroboró el recuento mediante siembra en placas *Petrifilm AC* por duplicado (ver apéndice B). En la tabla siguiente se muestran las cantidades del microorganismo realmente aplicadas. Se omitieron las pruebas con aplicación directa al hisopo, en vista de que los resultados eran mucho más proporcionales al nivel de contaminación y menos interesantes puesto que no se ven afectados por la interacción con la superficie.

Tabla 4-7 Resultados preliminares *L. monocytogenes*

	Lecturas en RLU							
	Plástico				Acero			
t(s)	49x10 ³ UFC		49x10 ² UFC		49x10 ³ UFC		49x10 ² UFC	
10	228	289	113	52	114	272	73	88
25	227	183	117	52	116	277	77	93
40	226	189	125	55	112	286	74	94
55	230	190	129	56	112	289	74	97

En plástico se observa claramente que el límite de precaución está cercano a 49×10^3 UFC, ya que se obtienen valores en la zona de precaución, mientras que en acero se obtienen valores más bajos.

Como se puede observar, los resultados son semejantes entre *E. coli*, *Salmonella* y *Listeria*; en general el límite de precaución está cercano a 50×10^3 UFC para las tres bacterias.

4.3.4 *Candida albicans*

Se preparó el inóculo como se ha explicado y se corroboró el recuento mediante siembra en placas Petrifilm AC por duplicado (ver apéndice B). En la tabla siguiente se muestran las cantidades del microorganismo realmente aplicadas.

Tabla 4-8 Resultados Preliminares *C. albicans*

Lecturas en RLU												
Plástico							Acero					
t(s)	23x10 ² UFC			230 UFC			23x10 ³ UFC	23x10 ² UFC			230 UFC	
10	384	145	221	109	58	90	1878	84	234	170	25	59
25	395	152	265	111	54	89	2838	90	238	182	24	59
40	401	162	324	112	53	92	3574	94	244	192	24	62
55	407	162	360	110	54	93	4023	98	247	205	26	65

En plástico se obtienen dos valores de precaución y uno de rechazo para la suspensión 23x10² UFC, lo que indica que se acerca al límite de rechazo, y la solución de 230 UFC da valores de aceptación.

En acero la concentración de 23x10³ UFC da valores muy altos, por encima del límite de rechazo, y se obtienen dos valores de precaución y uno de aceptación para la suspensión 23x10² UFC, lo que indica que se acerca al límite de precaución; la contaminación con 230 UFC da valores muy bajos, que son de aceptación.

Se aprecia una mayor sensibilidad con la levadura *Candida albicans* que con las bacterias, observándose valores de precaución con 23x10² UFC, lo cual es consistente con el hecho de que se trata de un organismo eucarionte con mayor tamaño y mayor cantidad de ATP.

Para las pruebas con ambos sistemas se determinó que las concentraciones utilizadas de *Candida albicans* fueran similares a las de las bacterias para tener concentraciones similares para todos los microorganismos.

4.4 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS CON AMBOS SISTEMAS DE EVALUACIÓN DE HIGIENE

Aunque ya se mencionaron los parámetros e interpretación de ambos sistemas, consideramos importante ponerlos aquí, para facilitar la lectura de las tablas y la comparación. Conviene enfatizar que las lecturas de 3M™ Clean Trace™ están en RLU (unidades relativas de luz) y las de Biocontrol™ *Lightning MVP* se reportan primero en la escala arbitraria (EA) de 0 a 7.5 (dividida en 0.1) y, en la línea inferior, en RLU que, como el nombre lo indica, son, establecidas por cada sistema, ya que dependen –además del ATP recolectado– de la concentración de reactivos y de las características del fotomultiplicador y del luminómetro en general, que no son iguales en los dos sistemas, por lo que no corresponden a una misma unidad.

Tabla 4-9 Interpretación de RLU para la evaluación de higiene

Interpretación	Sistema	
	<i>3M™ Clean Trace™</i>	<i>BioControl™ Lightning MVP</i>
Superficie limpia o ACEPTABLE	Lectura <150 RLU	Desde 0 hasta 2.5
Precaución o REPETIR EL ENJUAGUE	150 a 299 RLU	De 2.6 a 3.0
Superficie sucia o RECHAZO, SE REQUIERE VOLVER A LAVAR	> 300 RLU	De 3.1 a 7.5

A continuación se muestran los resultados de las superficies contaminadas por triplicado, para ambos sistemas de evaluación de higiene, tomando las lecturas de cada prueba a los 10, 25, 40 y 55 s y también se muestra el Coeficiente de variación CV% (calculado como la desviación estándar entre la media, por 100) de la lectura respecto al tiempo; el CV% es inverso a la estabilidad de la lectura, y se han determinado rangos del CV% para decidir si son datos homogéneos.

4.4.1 Leche pasteurizada

Tabla 4-10 Resultados con suspensión de pasteurizada 10⁻¹

10 ⁻¹	Superficie de plástico						Superficie de acero inoxidable					
t(s)	3M™ Clean Trace™ (RLU)			BioControl™ Lightning MVP (EA/RLU)			3M™ Clean Trace™ (RLU)			BioControl™ Lightning MVP (EA/RLU)		
10	225	145	171	3.2 17407	2.7 5427	2.7 4487	476	110	2388	2.4 2257	3.7 46872	3.1 12661
25	222	145	177	3.2 17186	2.7 4859	2.6 4089	510	108	2808	2.3 2038	3.7 48692	3.1 12575
40	227	150	181	3.2 16002	2.7 4502	2.6 3857	521	111	3024	2.3 1945	3.7 47515	3.1 12044
55	226	148	183	3.2 14770	2.6 4196	2.5 3543	536	111	3156	2.3 1863	3.6 44420	3.1 11256
CV %	1.0	1.7	3.0	7.4	11.1	10.0	5.0	1.3	11.8	8.4	3.8	5.3

Tabla 4-11 Resultados con suspensión de leche pasteurizada 10⁻²

10 ⁻²	Superficie de plástico						Superficie de acero inoxidable					
t(s)	3M™ Clean Trace™ (RLU)			BioControl™ Lightning MVP (EA/RLU)			3M™ Clean Trace™ (RLU)			BioControl™ Lightning MVP (EA/RLU)		
10	185	362	118	1.8 603	3.2 15460	3.1 11981	64	221	103	2.6 3701	3.0 11145	3.4 23287
25	179	452	121	1.6 393	3.2 15379	3.1 11633	61	215	101	2.5 3495	3.0 10945	3.4 22617
40	179	502	115	1.6 433	3.2 14737	3.0 11010	58	213	99	2.5 3484	3.0 10532	3.3 21662
55	174	542	119	1.6 391	3.1 13690	3.0 10325	63	212	101	2.5 3338	3.0 9669	3.3 20200
CV%	2.5	16.7	2.1	22.1	5.5	6.5	4.3	1.9	1.6	4.3	6.2	6.1

4.4.2 Jugo de naranja

Tabla 4-12 Resultados con suspensión de jugo de naranja 10⁻³

10 ⁻³	Superficie de plástico						Superficie de acero inoxidable					
t(s)	3M™ Clean Trace™ (RLU)			BioControl™ Lightning MVP (EA/RLU)			3M™ Clean Trace™ (RLU)			BioControl™ Lightning MVP (EA/RLU)		
10	1922	1966	1942	3.7 53554	4.1 126990	4.1 140455	249	234	337	2.5 3319	3.0 9667	3.3 19511
25	1910	1948	1944	3.7 52261	4.1 125052	4.1 135588	232	230	338	2.4 2629	3.0 9362	3.3 19722
40	1905	1952	1931	3.7 48753	4.1 120495	4.1 126712	236	230	333	2.4 2566	3.0 8964	3.3 19190
55	1891	1933	1911	3.7 45148	4.1 114196	4.1 117635	233	233	331	2.4 2432	2.9 8573	3.3 18669
CV %	0.7	0.7	0.8	7.6	4.7	7.7	3.3	0.9	1.0	14.5	5.2	2.4

Tabla 4-13 Resultados con suspensión de jugo de naranja 10⁻⁴

10 ⁻⁴	Superficie de plástico						Superficie de acero inoxidable					
t(s)	3M™ Clean Trace™ (RLU)			BioControl™ Lightning MVP (EA/RLU)			3M™ Clean Trace™ (RLU)			BioControl™ Lightning MVP (EA/RLU)		
10	313	386	309	3.6 42956	2.4 2494	3.0 10236	150	86	224	2.8 6719	2.9 8469	2.7 5499
25	297	376	299	3.6 41727	2.3 2105	3.0 9684	155	77	217	2.8 6338	2.9 8122	2.7 5107
40	296	377	304	3.6 39797	2.3 2054	3.0 9143	149	74	213	2.8 6142	2.9 7650	2.7 4927
55	293	375	300	3.6 37387	2.3 1900	2.9 8576	150	75	211	2.8 5705	2.9 7089	2.7 4551
CV %	3.0	1.3	1.5	6.0	11.8	7.6	1.8	7.0	2.7	6.8	7.6	7.9

4.4.3 Salchicha

Tabla 4-14 Resultados con suspensión de salchicha 10⁻³

10 ⁻³	Superficie de plástico						Superficie de acero inoxidable					
t(s)	3M™ Clean Trace™ (RLU)			BioControl™ Lightning MVP (EA/RLU)			3M™ Clean Trace™ (RLU)			BioControl™ Lightning MVP (EA/RLU)		
10	556	185	96	2.6 4150	2.9 7922	2.3 2193	185	147	57	2.7 5092	2.3 2173	2.5 3292
25	547	177	95	2.6 3683	2.9 7535	2.3 1969	175	131	44	2.7 4591	2.3 1819	2.5 2946
40	545	173	94	2.5 3482	2.9 7226	2.3 1910	168	129	34	2.6 4396	2.2 1717	2.4 2735
55	531	173	93	2.5 3340	2.8 6899	2.3 1809	166	124	40	2.6 4019	2.2 1556	2.4 2515
CV %	1.9	3.2	1.4	9.7	5.9	8.3	5.0	7.5	22.3	9.9	14.4	11.5

Tabla 4-15 Resultados con suspensión de salchicha 10⁻⁴

10 ⁻⁴	Superficie de plástico						Superficie de acero inoxidable					
t(s)	3M™ Clean Trace™ (RLU)			BioControl™ Lightning MVP (EA/RLU)			3M™ Clean Trace™ (RLU)			BioControl™ Lightning MVP (EA/RLU)		
10	66	114	177	2.7 4576	2.7 4723	2.7 4498	70	52	201	2.1 1339	2.3 2098	2.6 3668
25	62	103	162	2.7 4643	2.6 4230	2.6 3789	63	42	199	2.1 1152	2.3 1920	2.5 3094
40	57	104	158	2.7 4540	2.6 4060	2.6 3679	65	38	200	2.0 1090	2.2 1765	2.5 2845
55	56	98	154	2.6 4413	2.6 3914	2.6 3565	60	37	200	2.0 1103	2.2 1674	2.4 2588
CV %	7.7	6.4	6.2	2.1	8.3	10.8	6.5	16.2	0.4	9.8	10.0	15.1

4.4.4 Alimento lácteo fermentado. (Sofúl)

Tabla 4-16 Resultados con suspensión de *Sofúl* 10⁻³

10 ⁻³	Superficie de plástico						Superficie de acero inoxidable					
t(s)	<i>3M™ Clean Trace™</i> (RLU)			<i>BioControl™ Lightning MVP</i> (EA/RLU)			<i>3M™ Clean Trace™</i> (RLU)			<i>BioControl™ Lightning MVP</i> (EA/RLU)		
10	315	240	118	3.1 13438	2.1 1280	2.8 6437	30	49	34	2.3 1810	1.7 490	2.6 3695
25	309	237	120	3.1 13530	2.1 1175	2.8 6381	29	48	33	2.2 1636	1.6 407	2.5 3437
40	307	235	118	3.1 12760	2.0 1105	2.8 6046	26	46	32	2.2 1561	1.6 389	2.5 3349
55	306	232	117	3.1 11973	2.0 1065	2.7 5602	25	47	39	2.2 1489	1.6 384	2.5 3164
CV %	1.3	1.4	1.1	5.6	8.2	6.3	8.7	2.7	9.0	8.5	11.8	6.5

4.4.5 *Salmonella typhi*

Tabla 4-17 Resultados con suspensión de *S. typhi* 56x10³ UFC

	Superficie de plástico						Superficie de acero inoxidable					
	<i>3M™ Clean Trace™</i> (RLU)			<i>BioControl™ Lightning MVP</i> (EA/RLU)			<i>3M™ Clean Trace™</i> (RLU)			<i>BioControl™ Lightning MVP</i> (EA/RLU)		
t(s)	<i>Salmonella</i> 56x10 ³ UFC											
10	335	250	392	3.2 15354	3.4 23662	3.6 44450	166	149	143	3.1 12574	3.3 18577	3.4 26236
25	342	252	391	3.2 15688	3.4 24077	3.6 44244	181	153	149	3.1 13701	3.3 18631	3.4 26635
40	339	257	382	3.2 15424	3.4 23859	3.6 43545	195	160	152	3.1 13748	3.3 18359	3.4 26635
55	340	253	385	3.2 15045	3.4 22794	3.6 41747	209	166	157	3.1 13588	3.2 17644	3.4 25946
CV %	0.9	1.2	1.2	1.7	2.4	2.8	9.8	4.8	3.9	4.2	2.5	1.3

Tabla 4-18 Resultados con suspensión de *S. typhi* 56x10² UFC

	Superficie de plástico						Superficie de acero inoxidable					
	<i>3M™ Clean Trace™</i> (RLU)			<i>BioControl™ Lightning MVP</i> (EA/RLU)			<i>3M™ Clean Trace™</i> (RLU)			<i>BioControl™ Lightning MVP</i> (EA/RLU)		
t(s)	<i>Salmonella</i> 56x10 ² UFC											
10	67	68	51	2.4 2243	2.4 2769	2.4 2268	286	437	77	2.6 4341	3.0 9721	2.9 8772
25	66	66	49	2.4 2280	2.4 2739	2.3 2159	277	441	79	2.6 4355	3.0 9953	3.0 9060
40	70	72	51	2.4 2249	2.4 2775	2.3 2108	281	442	83	2.6 4324	3.0 9934	3.0 8980
55	68	69	52	2.4 2252	2.4 2707	2.3 2098	281	459	85	2.6 4249	3.0 9550	2.9 8882
CV %	2.5	3.6	2.5	0.7	1.1	3.6	1.3	2.2	4.5	1.1	2.0	1.4

4.4.6 *E. coli*

Tabla 4-19 Resultados con suspensión de *E. coli* 42x10³ UFC

	Superficie de plástico						Superficie de acero inoxidable					
	<i>3M™ Clean Trace™</i> (RLU)			<i>BioControl™ Lightning MVP</i> (EA/RLU)			<i>3M™ Clean Trace™</i> (RLU)			<i>BioControl™ Lightning MVP</i> (EA/RLU)		
t(s)	<i>E. coli</i> 42x10 ³ UFC											
10	380	228	344	3.2 16336	2.9 8401	2.8 6970	18	33	27	2.1 1158	2.4 2497	1.6 442
25	366	228	341	3.2 16299	2.9 7932	2.8 6824	18	36	28	2.1 1128	2.4 2309	1.6 374
40	363	224	338	3.2 15915	2.9 7393	2.8 6602	17	35	24	2.1 1131	2.4 2274	1.6 366
55	365	220	338	3.2 15493	2.9 6733	2.8 6315	17	35	27	2.0 1098	2.3 2166	1.6 385
CV%	2.1	1.7	0.8	2.5	9.4	4.3	3.3	3.6	6.5	2.2	6.0	8.8

4.4.7 *Listeria monocytogenes*

Tabla 4-20 Resultados con suspensión de *L. monocytogenes* 41x10³ UFC

	Superficie de plástico						Superficie de acero inoxidable					
	<i>3M™ Clean Trace™</i> (RLU)			<i>BioControl™ Lightning MVP</i> (EA/RLU)			<i>3M™ Clean Trace™</i> (RLU)			<i>BioControl™ Lightning MVP</i> (EA/RLU)		
t(s)	<i>Listeria</i> 41x10 ³ UFC											
10	170	274	333	3.1 14013	2.9 8079	2.8 5764	74	65	31	2.5 3098	2.6 3598	2.6 3744
25	163	285	332	3.2 14351	2.9 8098	2.8 5716	79	63	30	2.5 3138	2.6 3701	2.5 3463
40	166	288	327	3.2 14188	2.9 7941	2.7 5620	76	64	30	2.5 3083	2.6 3593	2.5 3447
55	162	288	328	3.1 13704	2.9 7556	2.7 5503	75	63	33	2.5 3967	2.6 3448	2.5 3315
CV%	2.2	2.3	0.9	2.0	3.2	2.0	2.8	1.5	4.6	13.0	2.9	5.2

4.4.8 *Candida albicans*

Tabla 4-21 Resultados con suspensión de *C. albicans* 46x10³ UFC

	Superficie de plástico						Superficie de acero inoxidable					
	<i>3M™ Clean Trace™</i> (RLU)			<i>BioControl™ Lightning MVP</i> (EA/RLU)			<i>3M™ Clean Trace™</i> (RLU)			<i>BioControl™ Lightning MVP</i> (EA/RLU)		
t(s)	<i>C. albicans</i> 46x10 ³ UFC											
10	6670	9206	5278	4.2 1627 47	4.9 7661 49	4.4 2489 69	2600	1765	3510	4.8 6751 33	4.3 1959 66	3.9 8094 4
25	7547	1074 4	6790	4.2 1646 46	4.9 7477 67	4.4 2546 09	2720	1872	3515	4.8 6620 94	4.3 1950 53	3.9 7789 7
40	8719	1276 3	8893	4.2 1580 07	4.8 6945 88	4.4 2452 84	2820	1927	3519	4.8 6293 13	4.3 1853 63	3.9 7406 0
55	1018 0	1497 8	1052 7	4.2 1483 11	4.8 6350 75	4.4 2289 63	2928	1982	3574	4.8 5903 12	4.2 1722 72	3.8 6844 6
CV%	18.4	21.0	29.3	4.6	8.3	4.5	5.1	4.9	0.9	5.9	5.9	7.2

Tabla 4-22 Resultados con suspensión de de *C. albicans* 46x10² UFC

t(s)	Superficie de plástico						Superficie de acero inoxidable					
	<i>3M™ Clean Trace™</i> (RLU)			<i>BioControl™ Lightning MVP</i> (EA/RLU)			<i>3M™ Clean Trace™</i> (RLU)			<i>BioControl™ Lightning MVP</i> (EA/RLU)		
	<i>C. albicans</i> 46x10 ² UFC											
10	495	549	721	3.4 2355 9	3.5 3276 4	3.6 3690 5	420	402	284	3.3 2023 9	3.0 1116 1	3.9 7481 7
25	575	541	719	3.4 2405 7	3.5 3305 9	3.6 3654 5	430	398	282	3.3 2008 2	3.0 1078 0	3.9 7289 8
40	668	540	706	3.4 2328 2	3.5 3178 5	3.5 3522 6	421	397	283	3.3 1907 1	3.0 1027 0	3.8 6870 5
55	766	533	709	3.4 2178 6	3.5 3007 8	3.5 3342 0	424	403	293	3.3 1812 2	3.0 9645	3.8 6358 9
CV%	18.7	1.2	1.0	4.2	4.2	4.4	1.1	0.7	1.8	5.1	6.3	7.1

Tabla 4-23 Resultados con suspensiones de alimentos en hisopos para líquidos (500 µL)

t(s)	Leche 10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴	
10	1278	1756	278	206	42	41
25	1386	1788	287	215	44	45
40	1422	1789	288	222	42	42
55	1461	1766	293	219	42	42
CV%	5.68	0.92	2.18	3.23	2.35	4.08
t(s)	Jugo 10 ⁻⁴		10 ⁻⁵		10 ⁻⁶	
10	1243	1542	409	561	90	76
25	1289	1616	428	576	95	78
40	1311	1661	441	585	97	75
55	1347	1669	449	587	94	75
CV%	3.35	3.59	4.04	2.05	3.13	1.86
t(s)	Salchicha 10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴	
10	44	60	35	32	27	39
25	41	51	33	33	23	23
40	42	48	32	32	19	21
55	37	49	32	31	17	18
CV%	7.18	10.53	4.29	2.55	20.63	37.20

t(s)	Sofúl 10 ⁻³		10 ⁻⁴	
10	292	387	118	145
25	310	415	118	153
40	316	428	117	157
55	322	437	112	158
CV%	4.18	5.23	2.47	3.86

Tabla 4-24 Resultados con suspensiones de microorganismos en hisopos para líquidos (500µL)

t(s)	S. typhi 56x10 ⁵ UFC/mL		Sol 56x10 ⁴ UFC/mL	
10	281	301	42	62
25	301	326	44	67
40	310	330	44	68
55	318	336	44	66
CV%	5.27	4.76	2.30	4.00
t(s)	E. coli 42x10 ⁴ UFC/mL		Sol 42x10 ³ UFC/mL	
10	1050	135	161	43
25	1078	151	166	43
40	1107	153	173	43
55	1120	157	173	43
CV%	2.87	6.48	3.48	0.00
t(s)	C. albicans Sol 46x10 ³ UFC/mL		Sol. 46x10 ² UFC/mL	
10	2742	2152	93	97
25	2825	2247	98	85
40	2865	2287	99	85
55	2890	2312	98	83
CV%	2.29	3.13	2.79	7.32
t(s)	Listeria monocytogenes Sol. 41x10 ⁴ UFC/mL		Sol 41x10 ³ UFC/mL	
10	1034	1653	134	151
25	1043	1684	137	152
40	1046	1701	139	156
55	1035	1711	135	153
CV%	0.57	1.51	1.63	1.41

Los hisopos para líquidos 3M™ son más sensibles con alimentos y microorganismos que los hisopos de superficies 3M™, en general dan valores en suspensiones 100 veces más diluidas, también tienen mayor repetibilidad, ya que para la misma suspensión, se obtienen valores más cercanos, en la misma escala de decisión. El CV % es aceptable, excepto para el caso de salchicha 10^{-4} , pero ésta lectura está muy por debajo de la sensibilidad del sistema.

4.5 ANÁLISIS DE RESULTADOS PARA AMBOS SISTEMAS DE EVALUACIÓN DE HIGIENE

Conviene recordar que se utilizaron los siguientes contaminantes, tanto sobre superficies de plástico, como de acero inoxidable, y que en tablas y comentarios siguientes utilizaremos los códigos que aquí se indican, combinando iniciales de los contaminantes y concentración en que se aplicaron:

Leche: L10⁻¹ y L10⁻²

Jugo: J10⁻³ y J10⁻⁴

Salchicha: S10⁻³ y S10⁻⁴

Alimento lácteo fermentado: F10⁻³

Salmonella typhi: S.t. 56x10³ UFC y 56x10² UFC

Escherichia coli: E.c. 42x10³ UFC

Listeria monocytogenes: L.m. 41x10³ UFC

Candida albicans: C.a. 46x10³ UFC y 46x10² UFC

Para alimentos se obtuvieron valores similares en preliminares y pruebas con ambos sistemas, excepto para la salchicha en que se

obtuvieron valores más altos en las preliminares, debido a que no se había decantado suficientemente después de homogeneizar y fueron residuos sólidos los que impactaron esos resultados, por lo que se estandarizó el tiempo de decantado después de la homogenización.

Para ambos sistemas, con jugo de naranja se tuvo la mayor sensibilidad, ya que con la solución 10^{-3} se tuvieron valores de rechazo y precaución, y con la solución 10^{-4} valores de precaución y aceptación.

Con salchicha se obtuvieron valores de rechazo, precaución y aceptación con la suspensión 10^{-3} , y con la suspensión 10^{-2} se obtuvieron valores de precaución y aceptación. En el caso del alimento lácteo fermentado, con 10^{-3} se obtuvieron valores de rechazo, precaución y aceptación en plástico y de precaución y aceptación en acero. Finalmente, con leche se obtuvieron valores irregulares por la dificultad de dispersión homogénea, ya que se obtuvieron valores de rechazo, precaución y aceptación tanto para la solución 10^{-1} como para 10^{-2} .

En las pruebas preliminares con microorganismos, se encontró que con concentraciones de bacterias de 50×10^3 , se obtienen valores de precaución, similarmente a los resultados obtenidos en las pruebas con ambos sistemas.

En la tabla siguiente se integran los resultados de "Aceptación" = A, "Precaución" = P y "Rechazo" = R para todos los contaminantes tomados a los 10 segundos, en ambas superficies y se identifica el sistema con mayor sensibilidad en cada caso definiendo ésta como la capacidad de detección del contaminante, que se traduce en rechazo.

Tabla 4-25 Número de superficies: Aceptadas(A), en Precaución (P) y Rechazadas (R), para cada contaminante aplicado y sistema con mayor sensibilidad para el caso. Los sistemas se identificaron como: 3M™Clean Trace™ = 3M y BioControl™ Lightning MVP =BC. Cuando la sensibilidad es prácticamente igual, se registró como similar = S.

Contaminante	Aplicadas en plástico						Mayor sensibilidad	Aplicadas en acero						Mayor sensibilidad
	Sistema 3M			Sistema BC				Sistema 3M			Sistema BC			
Decisión	A	P	R	A	P	R		A	P	R	A	P	R	
L10 ⁻¹	1	2	0	0	2	1	BC	1	0	2	1	0	2	S
L10 ⁻²	1	1	1	1	0	2	BC	2	1	0	0	2	1	BC
J10 ⁻³	0	0	3	0	0	3	S	0	2	1	1	1	1	3M
J10 ⁻⁴	0	0	3	1	1	1	3M	1	2	0	0	3	0	BC
S10 ⁻³	1	1	1	1	2	0	3M	2	1	0	2	1	0	S
S10 ⁻⁴	2	1	0	0	3	0	BC	2	1	0	2	1	0	S
F10 ⁻³	1	1	1	1	1	1	S	3	0	0	2	1	0	BC
Σ con Alim.	6	6	9	4	9	8		11	7	3	8	9	4	
S.t. 56x10 ³ UFC	0	1	2	0	0	3	BC	2	1	0	0	0	3	BC
S.t. 56x10 ² UFC	3	0	0	3	0	0	S	1	1	1	0	3	0	BC
E.c. 42x10 ³ UFC	0	1	2	0	2	1	3M	3	0	0	3	0	0	S
L.m.41x10 ³ UFC	0	2	1	0	2	1	S	3	0	0	1	2	0	BC
C.a.46x10 ³ UFC	0	0	3	0	0	3	S	0	1	2	0	0	3	BC
C.a.46x10 ² UFC	0	0	3	0	0	3	S	0	0	3	0	1	2	3M
Σ con Microorg.	3	4	11	3	4	11		9	3	6	4	6	8	
Σ Total	9	10	20	7	13	19	BC=4	20	10	9	12	15	12	BC=7
							3M=3							3M=2
							S=6							S=4

Analizaremos los resultados de las 13 formas de contaminación, en ambas superficies:

En plástico el sistema 3M detectó mejor: $J10^{-4}$, $S10^{-3}$ y *E.c.* 42×10^3 UFC; que son el 23.1 % mientras que el sistema BC fue más sensible para la detección de residuos de $L10^{-1}$, $L10^{-2}$, $S10^{-4}$ y *S.t.* 56×10^3 UFC; es decir que detectó mejor 30.8 % de los contaminantes, y tienen una sensibilidad similar en 6 de los casos: $J10^{-3}$, $F10^{-3}$, *S.t.* 56×10^2 UFC, *L.m.* 41×10^3 UFC, *C.a.* 46×10^3 UFC y *C.a.* 46×10^2 UFC; que son el 46.1 % de los contaminantes.

En superficie de acero inoxidable, la sensibilidad del sistema 3M detectó mejor sólo 2 residuos: $J10^{-3}$ y *C.a.* 46×10^2 UFC, es decir el 15.4 % y el sistema BC detectó mejor 7 de los contaminantes: $L10^{-2}$, $J10^{-4}$, $F10^{-3}$, *S.t.* 56×10^3 UFC, *S.t.* 56×10^2 UFC, *L.m.* 41×10^3 UFC y *C.a.* 46×10^3 UFC, es decir que detectó mejor 53.8 % de los contaminantes, en tanto que. La sensibilidad de ambos sistemas es similar en 5 casos: $L10^{-1}$, $S10^{-3}$, $S10^{-4}$ y *E.c.* 42×10^3 UFC, lo que representa el 30.8 %.

En total se hicieron 26 pruebas con contaminantes, en las que que 3M fue más sensible en 5 de las pruebas, que corresponden al 19.2 %, mientras que BC fue más sensible en 10, es decir el 38.5 %, y los dos sistemas tienen un desempeño similar en 42.4 % que corresponde a 11 pruebas.

Como las pruebas con los 13 contaminantes se corrieron por triplicado, podemos decir que se hicieron 39 determinaciones de eficiencia de la higiene con cada sistema, en cada una de las superficies en estudio.

Para el total de pruebas en la superficie de plástico, ($n=39$ para cada sistema ya que son 13 suspensiones y muestreos por triplicado), para el sistema 3M se obtuvieron 23 % (9 muestras) de aceptación, 26 % (10

muestras) de precaución y 51 % (20 muestras) de rechazo, y para BC se obtuvieron 18 % (7 muestras) de aceptación, 33 % (13 muestras) de precaución y 49 % (19 muestras), se interpreta que es más sensible BC ya que detecta los contaminantes aplicados en el 82 % de las muestras (sumando precaución + rechazo), en tanto que 3M sólo los detecta en el 77 % (precaución + rechazo) Aunque la diferencia no es demasiado grande, el sistema BC detectó 5 % más de contaminantes.

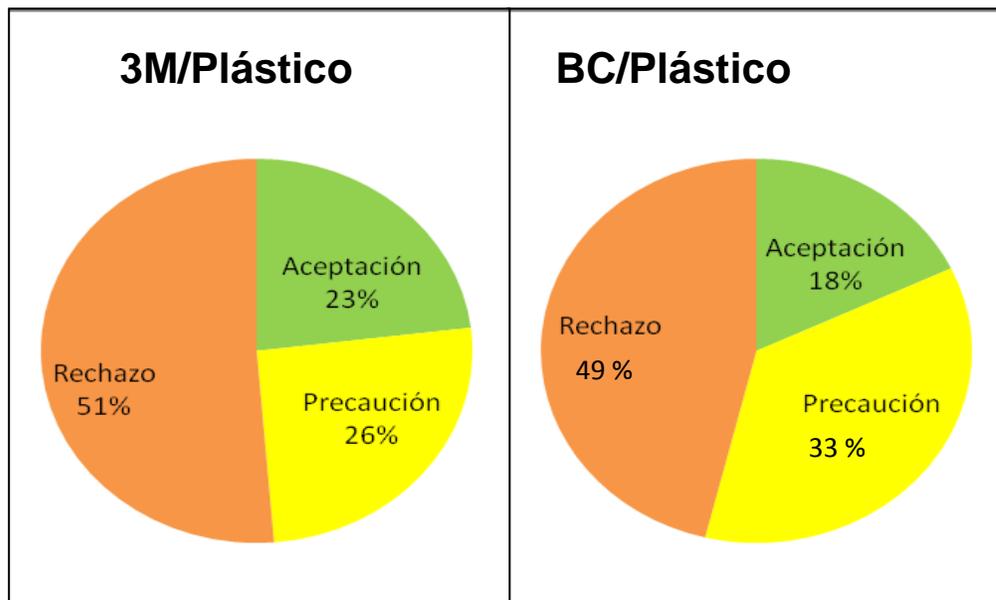


Figura 4-1 Porcentaje de muestras aceptadas-rechazadas para cada sistema en plástico

A continuación se presentan gráficos de frecuencia del número de muestras aceptadas, en precaución o rechazadas, para cada superficie y sistema. El número de contaminante corresponde a su lugar en la tabla 4.25.

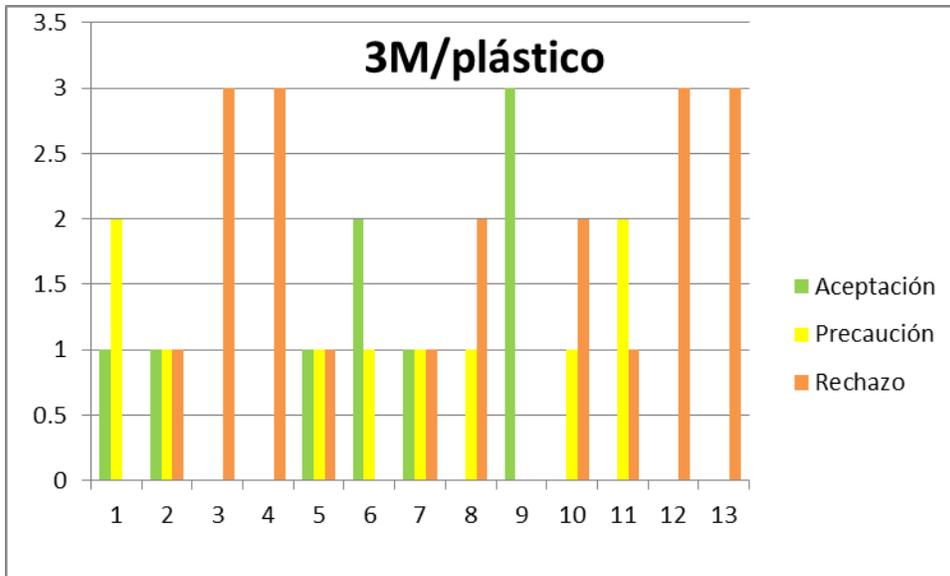


Figura 4-2 Frecuencia de resultados en plástico con 3M

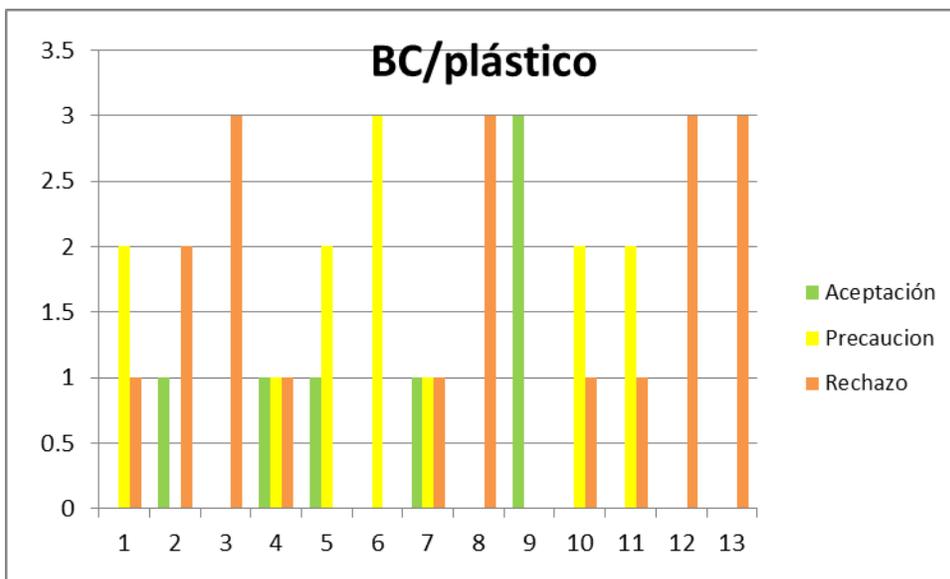


Figura 4-3 Frecuencia de resultados en plástico con BC

Respecto a las superficies, cuando los contaminantes son alimentos en plástico (n=21 para cada sistema, las 7 primeras suspensiones y muestreos por triplicado) mediante 3M se obtuvo 29% de aceptación (6 pruebas), 29% de precaución y 43% (9 pruebas de rechazo).

Con el sistema BC se obtuvo 19% (4 muestras) de aceptación, 43% de precaución (9 muestras) y 38% (8 muestras) de rechazo, lo que sugiere que BC tiene mayor sensibilidad para detectar contaminación con alimentos en superficies de plástico, ya que detecta el 81% de la contaminación probada, mientras que 3M sólo detectó el 72% (rechazo + precaución).

Con muestras de microorganismos en plástico (n=18 para cada sistema, las 6 últimas suspensiones y se tomaron 3 muestras en cada caso) para 3M se obtuvo 17% (3 muestras) de aceptación, 22% de precaución y 61%(11 muestras) con rechazo. Con BC se obtuvo 17%(3 muestras) de aceptación, 22% de precaución (4 muestras) 61%(11 muestras) de rechazo, lo que denota similar sensibilidad a la contaminación microbiana, en superficies de plástico.

Del total de muestras en la superficie de acero inoxidable(n=39 para cada sistema ya que son 13 suspensiones y muestreos por triplicado), para el sistema 3M se obtuvieron 51 % (20 muestras) de aceptación, 26 % (10 muestras) de precaución y 23% (9 muestras) de rechazo, y para BC se obtuvieron 31 % (12 muestras) de aceptación, 38 % (15 muestras) de precaución y 31 % (12 muestras) de rechazo, lo que muestra mayor sensibilidad para el sistema de BC con respecto al sistema de 3M, ya que detecta los contaminantes aplicados en el 69 % de las muestras (sumando precaución + rechazo), en tanto que 3M sólo los detecta en el 49 % (precaución + rechazo), el sistema BC detectó 20 % más de contaminantes.

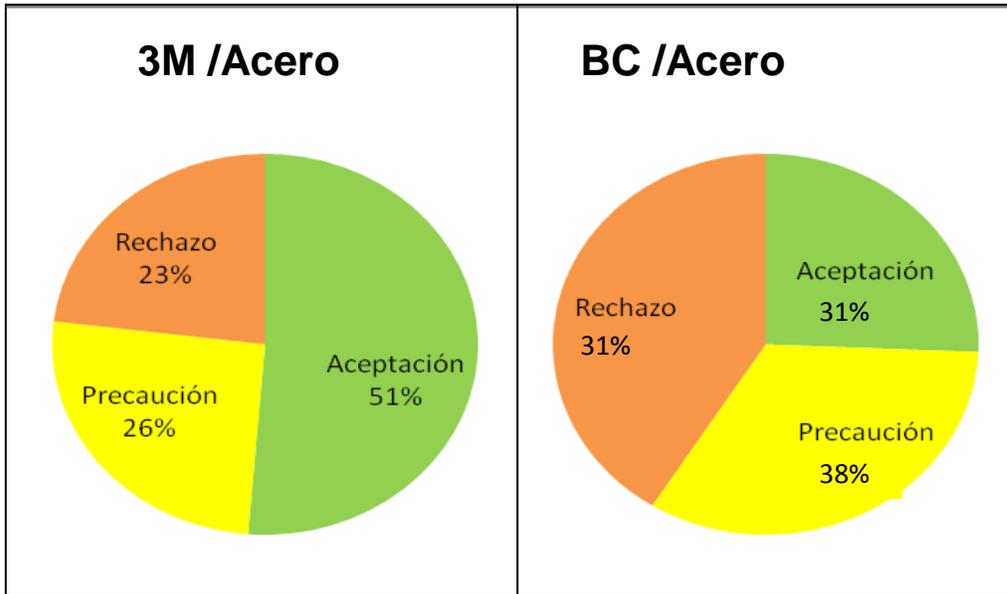


Figura 4-4 Porcentaje de muestras aceptadas-rechazadas para cada sistema en acero.

A continuación se muestran los gráficos de frecuencia de los resultados obtenidos en la superficie de acero para 3M y para BC.

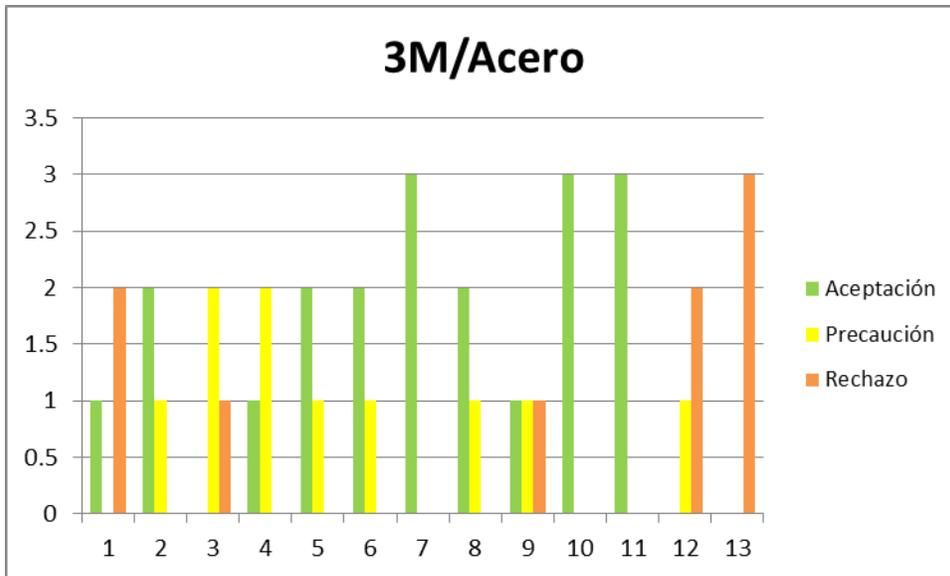


Figura 4-5 Frecuencia de resultados en acero con 3M

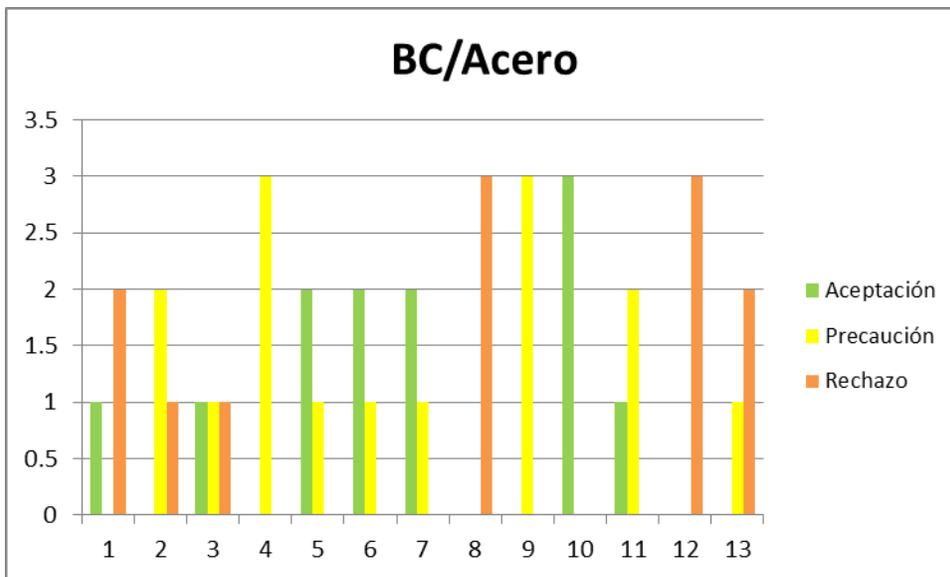


Figura 4-6 Frecuencia de resultados en acero con BC

Con muestras de alimentos en acero (n=21 para cada sistema, ya que son las primeras 7 suspensiones y muestreos por triplicado) para el sistema 3M se obtuvieron 52 % (11 muestras) de aceptación, 33 % (7 muestras) de precaución y 14 % (3 muestras) de rechazo, mientras que para el sistema BC se obtuvieron 38 % (8 muestras) de aceptación, 43

% (9 muestras) de precaución y 19 % (4 muestras) de rechazo, lo que sugiere mayor sensibilidad para el sistema BC, ya que detecta los contaminantes aplicados en el 62 % de las muestras (sumando precaución + rechazo), en tanto que 3M sólo los detecta en el 47 % (precaución + rechazo), el sistema BC detectó 15 % más de los contaminantes.

Con muestras de microorganismos en acero (n=18 para cada sistema, las 6 últimas suspensiones y muestreos por triplicado) para el sistema 3M se obtuvieron 50% (9 muestras) de aceptación, 17% (3 muestras) de precaución y 33% (6 muestras) de rechazo, y para el sistema BC se obtuvieron 22% (4 muestras) de aceptación, 33% (6 muestras) de precaución y 44% (8 muestras) de rechazo, lo que sugiere mayor sensibilidad para el sistema BC, porque detecta los contaminantes aplicados en el 77 % de las muestras (sumando precaución + rechazo), en tanto que 3M sólo los detecta en el 50 % (precaución + rechazo), el sistema BC detectó 27 % más de contaminantes.

Para el total de muestras en ambas superficies (n=78 para cada sistema, ya que son 13 suspensiones, muestreos por triplicado y en dos superficies), con el sistema 3M se obtuvo 37% de aceptación, 26% de precaución y 37% de rechazo (29, 20 y 29 muestras respectivamente) y mediante el sistema BC se obtuvo 24% de aceptación, 36% de precaución y 40% de rechazo (19, 28 y 31 muestras respectivamente). Lo que muestra una mayor sensibilidad para detectar contaminantes para el sistema BC en general. Cabe señalar que la tendencia se mantiene en casi todas las pruebas: BC es más sensible, excepto en la detección de microorganismos en plástico, donde tienen un desempeño muy similar.

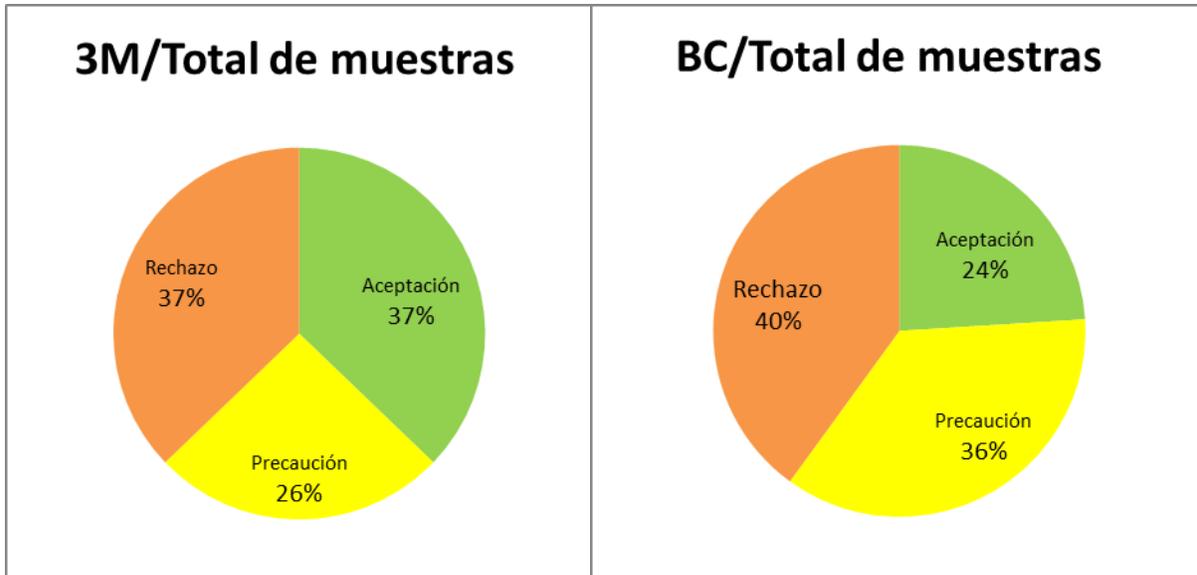


Figura 4-7 Porcentaje de resultados generales para cada sistema.

A continuación se asignaron valores numéricos para cada nivel de higiene, como se señala:

Nivel de higiene:	Aceptación(A)	Precaución(P)	Rechazo(R)
Valor numérico Asignado:	1	2	3

Tomando en cuenta los valores numéricos asignados para cada nivel de higiene, se calculó el CV % de las tres aplicaciones de cada contaminante, con lectura a los 10 segundos (como indican los fabricantes); para 3M se obtienen CV % promedio de 22.8 % en plástico, de 27.2 % en acero y de 25.0 % en general, en tanto que el sistema BC da CV % promedio de 19.9 % en plástico, de 23.9 % en acero y de 21.9 % en general. Se observa que el sistema BC tiene mayor repetibilidad entre los resultados de niveles de higiene en general, en un 3.1 %, se muestran los CV % para las pruebas en la siguiente tabla.

Tabla 4-26 CV % del nivel de higiene de los contaminantes aplicados

Muestra	Sistema	
	3M	BC
Alimentos en superficie de plástico	32.5	29.8
Alimentos en superficie de acero	34.1	36.3
Microorganismos en superficie de plástico	11.3	8.24
Microorganismos en superficie de acero	19.1	9.4
Total en Superficie de Plástico	22.8	19.9
Total en Superficie de Acero	27.2	23.9
Total	25.0	21.9

Se puede observar que para ambos sistemas se presenta más variación en los alimentos que en los microorganismos, esto debido a que la cantidad de ATP de los microorganismos es más uniforme que en los residuos de alimentos, así como en la superficie de acero respecto a la de plástico, porque fue mejor la dispersión en la superficie de plástico.

Análisis estadístico

Se efectuaron comparaciones por pares para datos categóricos, mediante la *Prueba de los signos*, prueba no paramétrica apropiada para analizar datos pareados cualitativos y determinar si sus medias son diferentes ya que considera las diferencias entre pares. Y mediante la *Prueba de los rangos signados* o también llamada *Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon*, que es similar a la anterior, pero más específica porque toma en cuenta la magnitud de cada diferencia (Weimer, 2007).

Prueba de los signos

El estadístico para la prueba de los signos es el siguiente y se puede utilizar cuando $n \geq 10$, que es cuando la distribución muestral es aproximadamente igual a la distribución normal estándar.

$$z = \frac{2x - n}{\sqrt{n}}$$

z = Valor estadístico de prueba

z_c = Valor crítico (Distribución normal)

n = número de signos

x = número de signos positivos

Cuando $z < z_c$ no se rechaza H_0 y si $z > z_c$ se rechaza H_0

COMPARACIÓN 3M VS BC

1. COMPARACIÓN DEL TOTAL DE MUESTRAS DEL SISTEMA DE 3M Y EL SISTEMA BC

Prueba de dos colas

a) $H_0: \mu_{3M} - \mu_{BC} = 0$

b) $H_1: \mu_{3M} - \mu_{BC} \neq 0$

c) Número de signos $n = 31 \geq 10$

d) Valor del estadístico de prueba: $z = -1.62$

e) Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$ (Nivel de confianza del 95%)

f) Valor crítico $z_{0.025} = 1.96$

g) Decisión: Como $z = -1.62 < z_{0.025} = 1.96$, No se rechaza H_0 y se concluye que no hay diferencia significativa entre ambos sistemas en general.

Prueba de una cola

a) $H_0: \mu_{3M} - \mu_{BC} \leq 0$

b) $H_1: \mu_{3M} - \mu_{BC} > 0$

c) Número de signos $n = 31 \geq 10$

- d) Valor del estadístico de prueba: $z = -1.62$
- e) Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$ (Nivel de confianza del 95%)
- f) Valor crítico $z_{0.05}=1.65$
- g) Decisión: Como $z = -1.62 < z_{0.05} = 1.65$, No se rechaza H_0 y se concluye que el sistema 3M es menor o igualmente sensible que el BC.

2. SUPERFICIE DE PLÁSTICO

Prueba de dos colas

- a) $H_0: \mu_{3M} - \mu_{BC} = 0$
- b) $H_1: \mu_{3M} - \mu_{BC} \neq 0$
- c) Número de signos $n = 15 \geq 10$
- d) Valor del estadístico de prueba: $z = -0.26$
- e) Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$ (Nivel de confianza del 95%)
- f) Valor crítico $z_{0.025}=1.96$
- g) Decisión: Como $z = -0.26 < z_{0.025} = 1.96$, No se rechaza H_0 y se concluye que no hay diferencia significativa entre ambos sistemas en plástico.

Prueba de una cola

- a) $H_0: \mu_{3M} - \mu_{BC} \leq 0$
- b) $H_1: \mu_{3M} - \mu_{BC} > 0$
- c) Número de signos $n = 15 \geq 10$
- d) Valor del estadístico de prueba: $z = -0.26$
- e) Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$ (Nivel de confianza del 95%)
- f) Valor crítico $z_{0.05}=1.65$
- g) Decisión: Como $z = -0.26 < z_{0.05} = 1.65$, No se rechaza H_0 y se concluye que el sistema de 3M es menor o igualmente sensible al sistema BC.

3. SUPERFICIE DE ACERO

Prueba de dos colas

- a) $H_0: \mu_{3M} - \mu_{BC} = 0$
- b) $H_1: \mu_{3M} - \mu_{BC} \neq 0$

- c) Número de signos $n = 16 \geq 10$
- d) Valor del estadístico de prueba: $z = -2.00$
- e) Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$ (Nivel de confianza del 95%)
- f) Valor crítico $z_{0.025} = 1.96$
- g) Decisión: Como $z = -2.00 > z_{0.025} = 1.96$, Se rechaza H_0 y se concluye que existe diferencia significativa entre ambos sistemas en superficie de acero.

Prueba de una cola

- a) $H_0: \mu_{3M} - \mu_{BC} \leq 0$
- b) $H_1: \mu_{3M} - \mu_{BC} > 0$
- c) Número de signos $n = 16 \geq 10$
- d) Valor del estadístico de prueba: $z = -2.00$
- e) Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$ (Nivel de confianza del 95%)
- f) Valor crítico $z_{0.05} = 1.65$
- g) Decisión: Como $z = -2.00 > z_{0.05} = 1.65$, Se rechaza H_0 y debido al signo negativo obtenido se concluye que el sistema BC es significativamente más sensible que el sistema de 3M en superficie de acero.

Se observa que los casos en que se rechaza H_0 es en la comparación en superficie de acero, por lo tanto hay diferencia significativa entre el sistema de 3M y el de BC cuando se hacen las pruebas en acero, resultando una mayor sensibilidad para el sistema BC.

COMPARACIÓN 3M

PARA 3M SUPERFICIE DE PLÁSTICO VS SUPERFICIE DE ACERO

Prueba de dos colas

- a) $H_0: \mu_{PLA} - \mu_{ACE} = 0$
- b) $H_1: \mu_{PLA} - \mu_{ACE} \neq 0$
- c) Número de signos $n = 25 \geq 10$
- d) Valor del estadístico de prueba: $z = 3.40$
- e) Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$ (Nivel de confianza del 95%)

- f) Valor crítico $z_{0.025}=1.96$
- g) Decisión: Como $z = 3.40 > z_{0.025} = 1.96$, Se rechaza H_0 y se concluye que hay diferencia significativa entre los resultados obtenidos en plástico y acero para 3M.

Prueba de una cola

- a) $H_0: \mu_{PLA} - \mu_{ACE} \leq 0$
- b) $H_1: \mu_{PLA} - \mu_{ACE} > 0$
- c) Número de signos $n = 25 \geq 10$
- d) Valor del estadístico de prueba: $z = 3.40$
- e) Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$ (Nivel de confianza del 95%)
- f) Valor crítico $z_{0.05}=1.65$
- g) Decisión: Como $z = 3.40 > z_{0.05} = 1.65$, Se rechaza H_0 y se concluye que es más sensible significativamente la evaluación de higiene en superficie de plástico que en superficie de acero.

COMPARACIÓN BC

PARA BC SUPERFICIE DE PLÁSTICO VS SUPERFICIE DE ACERO

Prueba de dos colas

- a) $H_0: \mu_{PLA} - \mu_{ACE} = 0$
- b) $H_1: \mu_{PLA} - \mu_{ACE} \neq 0$
- c) Número de signos $n = 21 \geq 10$
- d) Valor del estadístico de prueba: $z = 1.53$
- e) Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$ (Nivel de confianza del 95%)
- f) Valor crítico $z_{0.025}=1.96$
- g) Decisión: Como $z = 1.53 < z_{0.025} = 1.96$, No se rechaza H_0 y se concluye que no hay diferencia significativa entre los resultados en plástico y en acero para el sistema BC.

Prueba de una cola

- a) $H_0: \mu_{PLA} - \mu_{ACE} \leq 0$
- b) $H_1: \mu_{PLA} - \mu_{ACE} > 0$
- c) Número de signos $n = 21 \geq 10$
- d) Valor del estadístico de prueba: $z = 1.53$

- e) Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$ (Nivel de confianza del 95%)
- f) Valor crítico $z_{0.05}=1.65$
- g) Decisión: Como $z = 1.53 < z_{0.05} = 1.65$, No se rechaza H_0 y se concluye que el sistema BC es menor o igualmente sensible en plástico que en acero.

Prueba de los rangos signados

El estadístico para la prueba de los rangos signados es el siguiente y se puede utilizar cuando $n \geq 15$, que es cuando la distribución muestral es aproximadamente igual a la distribución normal estándar:

$$z = \frac{T - \mu}{s} \qquad \mu = \frac{n(n+1)}{4} \qquad s = \sqrt{\frac{n(n+1)(2n+1)}{24}}$$

z =Valor estadístico de prueba

z_c = Valor crítico (Distribución normal)

n = número de diferencias no cero

T = suma de rangos positivos

μ = media estándar

s = desviación estándar

Cuando $z < z_c$ no se rechaza H_0 y si $z > z_c$ se rechaza H_0

COMPARACIÓN 3M VS BC

1. COMPARACIÓN DEL TOTAL DE MUESTRAS DEL SISTEMA DE 3M Y EL SISTEMA BC

Prueba de dos colas

- a) $H_0: \mu_{3M} - \mu_{BC} = 0$
- b) $H_1: \mu_{3M} - \mu_{BC} \neq 0$
- c) Número de signos $n = 31 \geq 15$
- d) Valor del estadístico de prueba: $z = -1.56$
- e) Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$ (Nivel de confianza del 95%)

- f) Valor crítico $z_{0.025}=1.96$
- g) Decisión: Como $z = -1.56 < z_{0.025} = 1.96$, No se rechaza H_0 y se concluye que no hay diferencia significativa entre ambos sistemas en general.

Prueba de una cola

- a) $H_0: \mu_{3M} - \mu_{BC} \leq 0$
- b) $H_1: \mu_{3M} - \mu_{BC} > 0$
- c) Número de signos $n = 31 \geq 15$
- d) Valor del estadístico de prueba: $z = -1.56$
- e) Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$ (Nivel de confianza del 95%)
- f) Valor crítico $z_{0.05}=1.65$
- g) Decisión: Como $z = -1.56 < z_{0.05} = 1.65$, No se rechaza H_0 y se concluye que el sistema 3M es menor o igualmente sensible que el sistema BC.

2. SUPERFICIE DE PLÁSTICO

Prueba de dos colas

- a) $H_0: \mu_{3M} - \mu_{BC} = 0$
- b) $H_1: \mu_{3M} - \mu_{BC} \neq 0$
- c) Número de signos $n = 15 \geq 15$
- d) Valor del estadístico de prueba: $z = -0.20$
- e) Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$ (Nivel de confianza del 95%)
- f) Valor crítico $z_{0.025}=1.96$
- g) Decisión: Como $z = -0.20 < z_{0.025} = 1.96$, No se rechaza H_0 y se concluye que no hay diferencia significativa entre ambos sistemas en superficie de plástico.

Prueba de una cola

- a) $H_0: \mu_{3M} - \mu_{BC} \leq 0$
- b) $H_1: \mu_{3M} - \mu_{BC} > 0$
- c) Número de signos $n = 15 \geq 15$
- d) Valor del estadístico de prueba: $z = -0.20$
- e) Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$ (Nivel de confianza del 95%)
- f) Valor crítico $z_{0.05}=1.65$

g) Decisión: Como $z = -0.20 < z_{0.05} = 1.65$, No se rechaza H_0 y se concluye que la sensibilidad del sistema de 3M es igual o menor que la del sistema BC en superficie de plástico.

3. SUPERFICIE DE ACERO

Prueba de dos colas

- a) $H_0: \mu_{3M} - \mu_{BC} = 0$
- b) $H_1: \mu_{3M} - \mu_{BC} \neq 0$
- c) Número de signos $n = 16 \geq 15$
- d) Valor del estadístico de prueba: $z = -1.86$
- e) Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$ (Nivel de confianza del 95%)
- f) Valor crítico $z_{0.025} = 1.96$
- g) Decisión: Como $z = -1.86 < z_{0.025} = 1.96$, No se rechaza H_0 y se concluye que no hay diferencia significativa entre ambos sistemas en superficie de acero.

Prueba de una cola

- a) $H_0: \mu_{3M} - \mu_{BC} \leq 0$
- b) $H_1: \mu_{3M} - \mu_{BC} > 0$
- c) Número de signos $n = 16 \geq 15$
- d) Valor del estadístico de prueba: $z = -1.86$
- e) Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$ (Nivel de confianza del 95%)
- f) Valor crítico $z_{0.05} = 1.65$
- g) Decisión: Como $z = -1.86 > z_{0.05} = 1.65$, Se rechaza H_0 y se concluye que el sistema BC es significativamente más sensible que el sistema 3M en superficie de acero.

Se observa que el único caso en que se rechaza H_0 es en la comparación en superficie de acero, por lo tanto hay diferencia significativa entre el sistema de 3M y el de BC cuando se hacen las pruebas en acero, siendo mayor la sensibilidad para el sistema BC.

COMPARACIÓN 3M

Para 3M superficie de plástico vs superficie de acero:

Prueba de dos colas

- a) $H_0: \mu_{PLA} - \mu_{ACE} = 0$
- b) $H_1: \mu_{PLA} - \mu_{ACE} \neq 0$
- c) Número de signos $n = 25 \geq 15$
- d) Valor del estadístico de prueba: $z = 3.01$
- e) Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$ (Nivel de confianza del 95%)
- f) Valor crítico $z_{0.025} = 1.96$
- g) Decisión: Como $z = 3.01 > z_{0.025} = 1.96$, Se rechaza H_0 y se concluye que hay diferencia significativa entre los resultados obtenidos en plástico y acero con el sistema 3M.

Prueba de una cola

- a) $H_0: \mu_{PLA} - \mu_{ACE} \leq 0$
- b) $H_1: \mu_{PLA} - \mu_{ACE} > 0$
- c) Número de signos $n = 25 \geq 15$
- d) Valor del estadístico de prueba: $z = 3.01$
- e) Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$ (Nivel de confianza del 95%)
- f) Valor crítico $z_{0.05} = 1.65$
- g) Decisión: Como $z = 3.01 > z_{0.05} = 1.65$, Se rechaza H_0 y se concluye que el sistema 3M es significativamente más sensible en plástico que en acero.

COMPARACIÓN BC

Para BC superficie de plástico vs superficie de acero: $n = 21$ $z = 1.95$

Prueba de dos colas

- a) $H_0: \mu_{PLA} - \mu_{ACE} = 0$
- b) $H_1: \mu_{PLA} - \mu_{ACE} \neq 0$
- c) Número de signos $n = \geq 15$
- d) Valor del estadístico de prueba: $z = 1.95$
- e) Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$ (Nivel de confianza del 95%)

- f) Valor crítico $z_{0.025}=1.96$
- g) Decisión: Como $z = 1.95 < z_{0.025} = 1.96$, No se rechaza H_0 y se concluye que no existe diferencia significativa entre los resultados en plástico y acero para el sistema BC.

Prueba de una cola

- a) $H_0: \mu_{PLA} - \mu_{ACE} \leq 0$
- b) $H_1: \mu_{PLA} - \mu_{ACE} > 0$
- c) Número de signos $n = \geq 15$
- d) Valor del estadístico de prueba: $z = 1.95$
- e) Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$ (Nivel de confianza del 95%)
- f) Valor crítico $z_{0.05}=1.65$
- g) Decisión: Como $z = 1.95 > z_{0.05} = 1.65$, Se rechaza H_0 y se concluye que el sistema BC es más sensible significativamente en plástico que en acero.

Utilizando la prueba de los signos y la prueba de los rangos signados a un nivel de confianza del 95%, resulta que no hay diferencia significativa en la utilización general de un sistema con respecto al otro, pero en la superficie de acero las pruebas estadísticas concluyen que si hay diferencia significativa, favoreciendo al sistema BC. Para ambas pruebas estadísticas el número de resultados es limitado para efectuar las comparaciones de alimentos en plástico, alimentos en acero, microorganismos en plástico y microorganismos en acero.

Mediante este análisis estadístico se puede concluir que al 95% de confianza se puede utilizar el sistema 3M o el sistema BC sin diferencia significativa en los resultados en plástico, mientras que si hay una diferencia significativa si se efectúan en superficie de acero, siendo más sensible el sistema BC.

Respecto a las comparaciones efectuadas para cada sistema en superficie de plástico y de acero; la prueba

de los signos marca una diferencia significativa para el sistema 3M mientras que no marca diferencia significativa para el sistema BC, pero la prueba de los rangos signados si marca diferencias significativas tanto para 3M como para BC, conclusión opuesta para BC que con la prueba de los signos, misma que está limitada en el manejo de información, y sólo utiliza los signos; mientras que la prueba de los rangos signados utiliza además de los signos la magnitud de la diferencia (Weimer, 2007), entonces se puede concluir que al 95% de confianza existe hay una diferencia significativa al utilizar cualquiera de los dos sistemas de evaluación de higiene en superficie de plástico o superficie de acero, obteniendo resultados considerablemente más bajos en acero.

Tabla 4-27 Resultados obtenidos con las pruebas estadísticas aplicadas

Prueba estadística	Comparación entre 3M y BC			Comparación de cada sistema	
	Total de muestras	Superficie de plástico	Superficie de acero	Comparación de 3M entre superficie de plástico y superficie de acero	Comparación de BC entre superficie de plástico y superficie de acero
Prueba de los signos (2 colas)	No hay diferencia significativa entre ambos sistemas.	No hay diferencia significativa entre ambos sistemas en plástico.	Existe diferencia significativa entre ambos sistemas en superficie de acero.	Hay diferencia significativa entre los resultados obtenidos en plástico y acero para 3M.	No hay diferencia significativa entre los resultados en plástico y en acero para el sistema BC.
Prueba de los signos (1 cola)	El sistema 3M es menor o igual de sensible que BC.	El sistema de 3M es menor o igualmente sensible al sistema BC.	El sistema BC es significativamente más sensible que el sistema de 3M en superficie de acero.	El sistema 3M es significativamente más sensible en plástico que en acero.	El sistema BC es menor o igualmente sensible en plástico que en acero.

Prueba de los rangos signados (2 colas)	No hay diferencia significativa entre ambos sistemas.	No hay diferencia significativa entre ambos sistemas en superficie de plástico.	No hay diferencia significativa entre ambos sistemas en superficie de acero.	Hay diferencia significativa entre los resultados obtenidos en plástico y acero con el sistema 3M.	No existe diferencia significativa entre los resultados en plástico y acero para el sistema BC.
Prueba de los rangos signados (1 cola)	El sistema 3M es menor o igualmente sensible que el sistema BC.	El sistema 3M es menor o igualmente sensible que el sistema BC en plástico.	El sistema BC es significativamente más sensible que el sistema 3M en superficie de acero.	El sistema 3M es significativamente más sensible en plástico que en acero.	El sistema BC es significativamente más sensible en plástico que en acero.

Se observa que en los casos de la comparación de 3M y BC en acero y en la del sistema BC en plástico y acero; la prueba de los rangos signados de dos colas concluye que no hay diferencia significativa, mientras que la de los rangos signados de una cola concluye que si hay diferencia significativa, esto se debe a que es más estricta, ya que en base a su hipótesis no sólo concluye si existe diferencia entre las medias, sino que también aporta información sobre la dirección de la diferencia. En base a las pruebas estadísticas aplicadas a los resultados, se puede concluir que al 95% de confianza, para los resultados de evaluación de higiene en superficie de plástico no existe diferencia significativa entre el sistema 3M y BC, mientras que en superficie de acero el sistema BC es significativamente más sensible.

4.6 ESTABILIDAD DE LAS LECTURAS

Para determinar la estabilidad de las lecturas, para todas las pruebas se tomaron éstas a 10s, 25s, 40s y 55s después de activado el hisopo y se obtuvieron los CV %. Abajo se muestran los CV % obtenidos y posteriormente la interpretación de los valores.

Para el sistema 3M van desde 0.7 hasta 29.3 y para el sistema BC van desde 0.7 hasta 14.5.

Tabla 4-28 Valores de CV % de la estabilidad de la lectura

Contaminante	Superficie de plástico						Superficie de acero inoxidable					
	3M™ Clean Trace™			BioControl™ Lightning MVP			3M™ Clean Trace™			BioControl™ Lightning MVP		
L10 ⁻¹	1.0	1.7	3.0	7.4	11.1	10.0	5.0	1.3	11.8	8.4	3.8	5.3
L10 ⁻²	2.5	16.7	2.1	22.1	5.5	6.5	4.3	1.9	1.6	4.3	6.2	6.1
J10 ⁻³	0.7	0.7	0.8	7.6	4.7	7.7	3.3	0.9	1.0	14.5	5.2	2.4
J10 ⁻⁴	3.0	1.3	1.5	6.0	11.8	7.6	1.8	7.0	2.7	6.8	7.6	7.9
S10 ⁻³	1.9	3.2	1.4	9.7	5.9	8.3	5.0	7.5	22.3	9.9	14.4	11.5
S10 ⁻⁴	7.7	6.4	6.2	2.1	8.3	10.8	6.5	16.2	0.4	9.8	10.0	15.1
F10 ⁻³	1.3	1.4	1.1	5.6	8.2	6.3	8.7	2.7	9.0	8.5	11.8	6.5
S.t. 56x10 ³ UFC	0.9	1.2	1.2	1.7	2.4	2.8	9.8	4.8	3.9	4.2	2.5	1.3
S.t. 56x10 ² UFC	2.5	3.6	2.5	0.7	1.1	3.6	1.3	2.2	4.5	1.1	2.0	1.4
E.c. 42x10 ³ UFC	2.1	1.7	0.8	2.5	9.4	4.3	3.3	3.6	6.5	2.2	6.0	8.8
L.m.41x10 ³ UFC	2.2	2.3	0.9	2.0	3.2	2.0	2.8	1.5	4.6	13.0	2.9	5.2
C.a.46x10 ³ UFC	18.4	21.0	29.3	4.6	8.3	4.5	5.1	4.9	0.9	5.9	5.9	7.2
C.a.46x10 ² UFC	18.7	1.2	1.0	4.2	4.2	4.4	1.1	0.7	1.8	5.1	6.3	7.1

Tabla 4-29 Interpretación de los valores del coeficiente de variación (CV%)

Coeficiente de variación	Interpretación
$0 < CV \leq 5\%$	Bueno – Muy bueno. Datos muy homogéneos, media aritmética muy representativa
$5 \% < CV \leq 20\%$	Aceptable . Datos con homogeneidad aceptable. La media aritmética es representativa
$> 20 \%$	Malo – A desechar. Datos heterogéneos, la media aritmética es poco representativa.

Fuente: Filippini, 2011

El sistema 3M presenta mayor CV % a concentraciones muy altas de contaminantes como en el caso de *C. albicans* 46×10^3 UFC con CV %, que fue de 21.0 y 29.3 %, en plástico y acero respectivamente, también a concentraciones muy bajas, como en el caso de salchicha 10^{-3} , lectura muy por debajo del límite de precaución y debajo de la sensibilidad, se presento un CV de 22.3 %. Se trata de lecturas por encima de 5000 RLU y por debajo de 50 RLU, lo que no afectaría zona de higiene para la toma de decisiones. Solo hubo un caso, Jugo 10^{-4} en plástico en que la zona de higiene cambia de rechazo a precaución con el tiempo.

El sistema BC presenta valores de CV % menores que el sistema 3M, aceptables en todos los casos, sin embargo se presentan más casos en que la zona de higiene cambió dependiendo del tiempo de lectura para las soluciones cercanas a los límites, se recomendaría para éste sistema recorrer en una décima los límites de las zonas de higiene: 0 a 2.4 aceptación, 2.5 a 2.9 precaución y 3.0 a 7 rechazo, ya que se observó que si se tomaran estos límites se apreciaría más la estabilidad de la lectura a los tiempos de lectura de hasta 55 segundos.

Tomando en cuenta los CV % y el número de pruebas en que el tiempo de lectura afectó la zona de higiene en que se encontraban las pruebas,

para ambos sistemas se puede decir que la lectura es estable desde 10 hasta 55 segundos para la evaluación de higiene.

En seguida se presentan gráficos de los datos de lecturas a distintos tiempos para cada muestra (RLU vs t), en los que se puede observar la dispersión de los datos y se aprecia que a valores más altos de RLU se tiene menor estabilidad de la lectura, así mismo se observa que se obtienen valores más bajos de RLU en acero que en plástico, como se ha visto antes en los resultados.

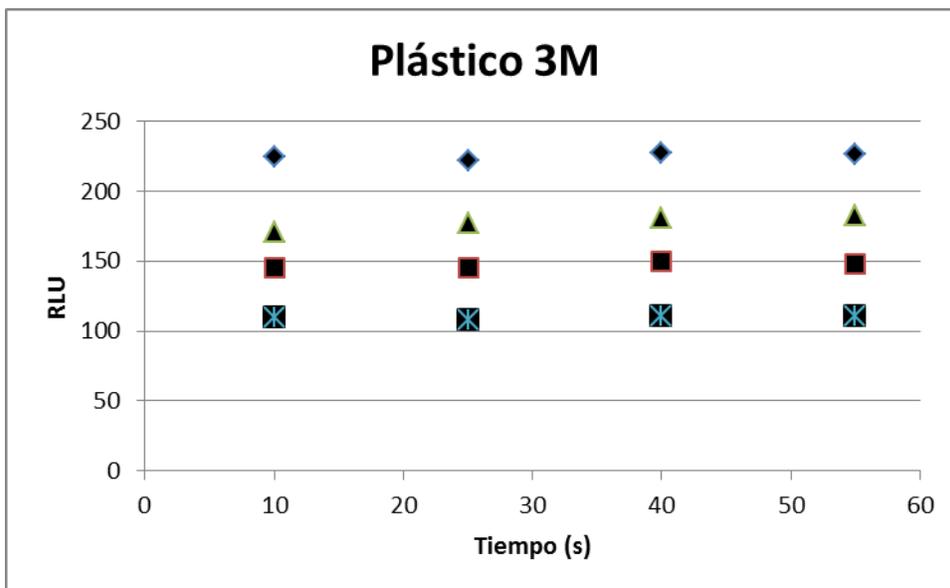


Figura 4-8 Estabilidad de lecturas a bajos RLU, 3M en plástico

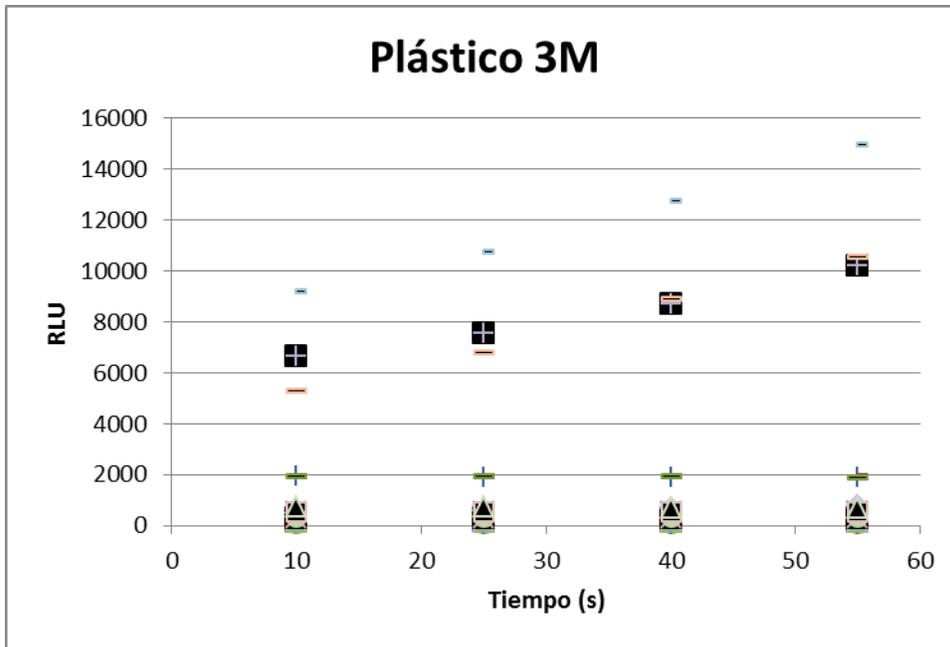


Figura 4-9 Estabilidad de lecturas 3M en plástico

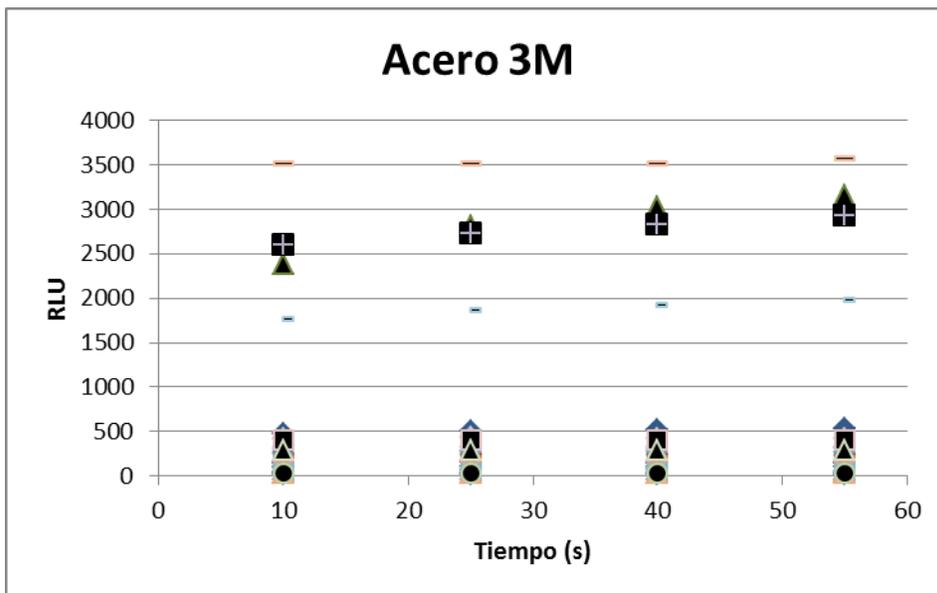


Figura 4-10 Estabilidad de lecturas 3M en acero

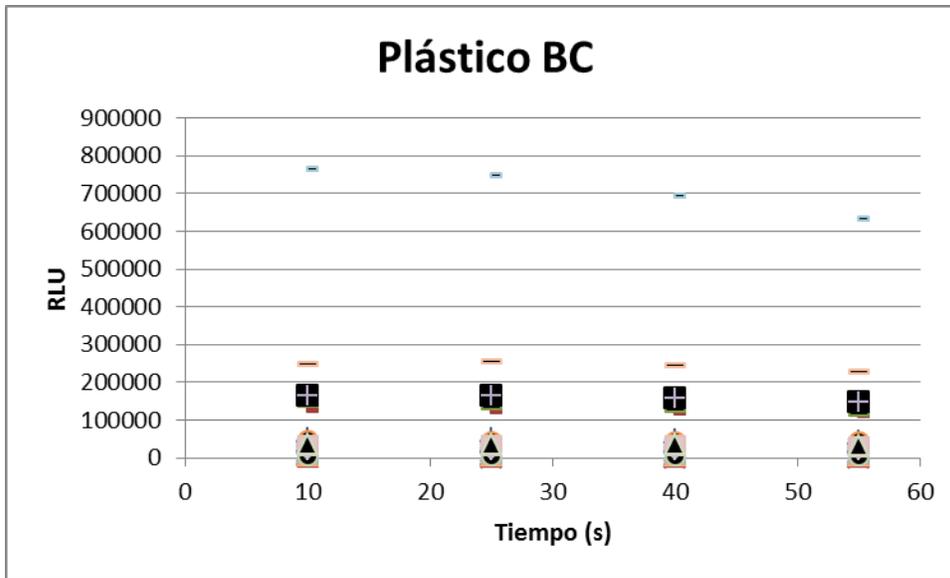


Figura 4-11 Estabilidad de lecturas BC en plástico

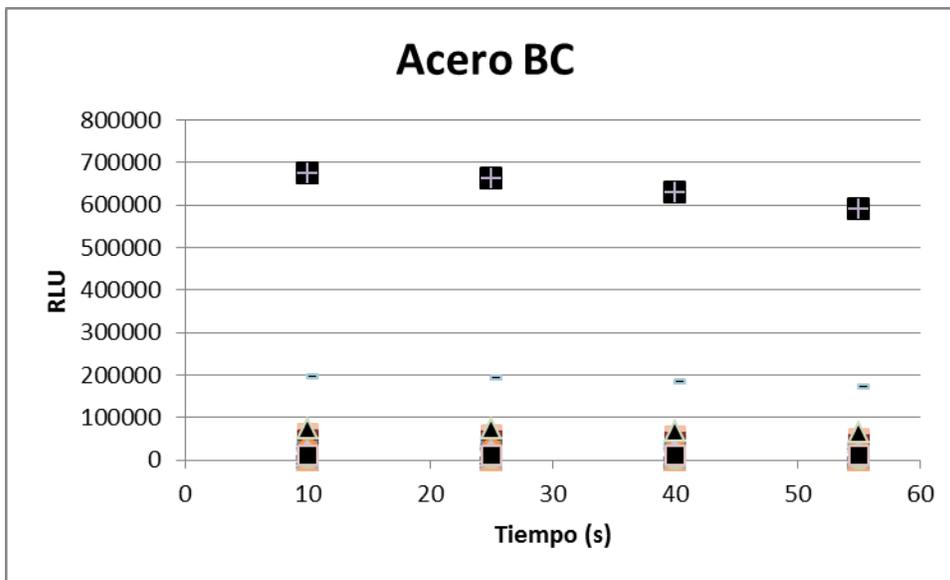


Figura 4-12 Estabilidad de lecturas BC en acero

Para ambos sistemas se observan gráficas con pendiente prácticamente constante a valores relativamente bajos de RLU, justo los que permiten tomar decisiones en el monitoreo de higiene, por lo que también éstas gráficas muestran que la lectura es estable desde 10 hasta 55 segundos después de activado el hisopo.

V. CONCLUSIONES

Para ambos sistemas la sensibilidad con alimentos fue la siguiente en orden decreciente: jugo de naranja, salchicha, alimento lácteo fermentado y leche pasteurizada; esto debido a la cantidad de ATP que contienen y que varía en los alimentos. Con microorganismos, la sensibilidad fue la siguiente en orden decreciente: *C. albicans*, *S. typhi*, *L. monocytogenes* y *E. coli*, siendo mayor en la superficie de plástico que en la superficie de acero. Para cada sistema, los resultados son significativamente más sensibles en superficie de plástico que en acero.

Cabe enfatizar, como ya se mencionó, que cuando hay residuos visibles, no es importante que los valores sean erráticos pues en ese caso, no se evalúa la higiene por bioluminiscencia, sino se repiten la operaciones de sanitización; fue el caso de la contaminación con leche en concentración 10^{-1} en acero inoxidable. Se puede apreciar que hay variaciones en los resultados interpretados y que es mayor en acero, lo cual coincide con la dificultad encontrada para dispersar la contaminación en dicha superficie.

Con muestras de alimentos en plástico, alimentos en acero y microorganismos en acero; el sistema de *BioControl*TM genera más resultados de rechazo, y con muestras de microorganismos en plástico, los resultados son similares en ambos sistemas de evaluación de higiene; se muestran los resultados en porcentajes en la siguiente tabla.

Tabla 5-1 % Resultados obtenidos por residuo y superficie para 3M/BC

Resultado:	Muestra			
	Alim. en plást.	Alim. en acero	Microorg. en plást.	Microorg. en acero
Aceptación	29/19	52/38	17/17	50/22
Precaución	29/43	33/43	22/22	17/33
Rechazo	43/38	14/19	61/61	33/44

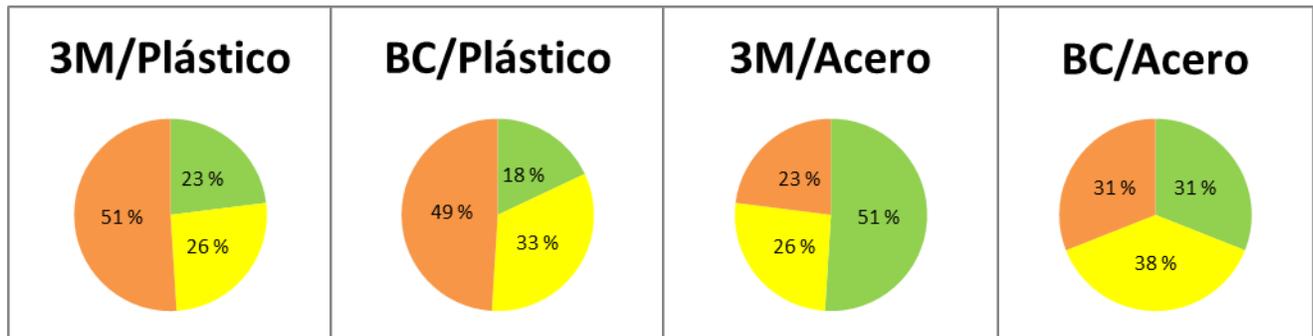


Figura 5-1 Porcentaje de muestras aceptadas-rechazadas para cada sistema en plástico y acero. %Aceptación=Verde, %Precaución=Amarillo, %Rechazo=Rojo.

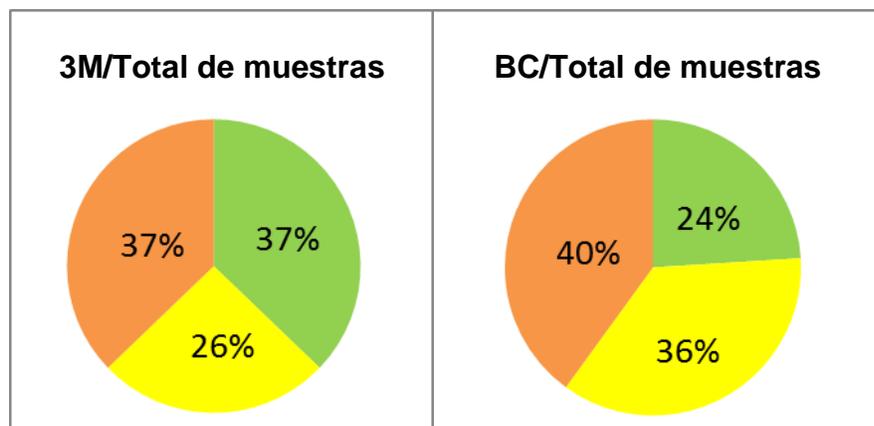


Figura 5-2 Porcentaje de muestras aceptadas-rechazadas para cada sistema en general. %Aceptación=Verde, %Precaución=Amarillo, %Rechazo=Rojo.

Tabla 5-2 Numero de muestras aceptadas-rechazadas para cada sistema en general

Nivel de higiene	3M		BC	
Aceptación	29	37%	19	24%
Precaución	20	26%	28	36%
Rechazo	29	37%	31	40%
Total de pruebas	78	100%	78	100%

Comparando los resultados en superficie de plástico se observa un resultado similar para ambos sistemas, mientras que en superficie de acero se observa claramente que el sistema *BioControl*[™] rechaza más superficies como se observa en la figura 5.1, para el total de muestras el sistema de *BioControl*[™] genera un 3% más de rechazo y un 10% más de precaución que el sistema de *3M*[™], como se observa en la figura 5.2

La variación entre las tres réplicas de cada solución, en términos de la decisión que implican (Aceptación / Precaución / Rechazo) no es muy alta, aún considerando la incertidumbre introducida en las diferentes fases de la contaminación de las superficies y por el hisopado; cabe señalar que se manejan sólo 3 réplicas en cada caso, lo cual es limitado en términos estadísticos (Simpson, 2006), se presentó un CV% promedio de 24.9% para *3M*[™] y de 21.8% para *BioControl*[™].

Tomando en cuenta que un mayor número de superficies rechazadas por un sistema con respecto al otro implica más rigor en las decisiones, tenemos que en plástico ambos sistemas dan resultados similares el 46 % de las veces, en tanto que *BioControl*[™] es más estricto en 8 % respecto a *3M*[™], mientras que en acero son similares el 31 % de las veces y el 38 % de las veces es más estricto el sistema *BioControl*[™].

Respecto a la estabilidad de las lecturas, en ambos sistemas se consideran homogéneos los datos, en función del coeficiente de variación, por lo que se concluye que las lecturas son estables desde 10 hasta 55 segundos después de activado el hisopo.

El estudio realizado proporciona una comparación básica objetiva, en la que el sistema *3M*[™] *Clean Trace*[™] fue encontrado menos estricto para rechazar las superficies contaminadas que el sistema *BioControl*[™]

Lightning MVP en la superficie de acero con soluciones de alimentos y microorganismos, mientras que son similares en la superficie de plástico con soluciones de alimentos y microorganismos.

Mediante el análisis estadístico efectuado se concluye que al 95% de confianza no existe diferencia significativa para la evaluación de la higiene en superficie de plástico entre el sistema 3M y el sistema BC, mientras que para la detección de residuos de alimentos y microorganismos en superficie de acero es significativamente más sensible el sistema BC.

VI. A P É N D I C E S

A. CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Se elaboraron las curvas de cuantificación, basándose en la escala de Mc Farland, hecha para *E. coli*, que relaciona la densidad óptica con la concentración de microorganismos (Cabeza, 2000).

Tabla A-1 Escala de Mc Farland

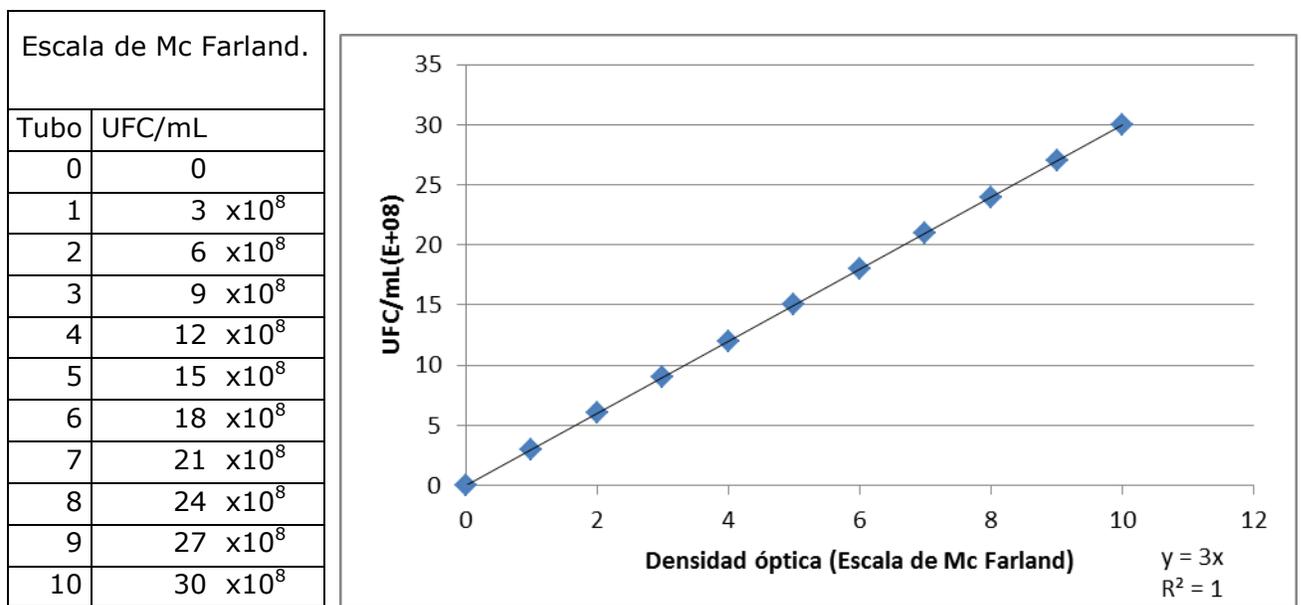


Figura A-1 Curva de la escala de Mc Farland

Se utilizaron cultivos de 24 horas en infusión cerebro corazón, de las 3 bacterias utilizadas en el estudio, determinando la densidad óptica en el *Densimat*® que da las lecturas en unidades de la escala de Mc Farland. Se prepararon diluciones decimales y se llevaron a cabo cuentas en placa, por duplicado para correlacionar las UFC con la densidad óptica para obtener la ecuación que relacionara la densidad óptica con la concentración y poder elaborar soluciones con la concentración deseada.

Cuantificación de *E. coli*

Tabla A-2 Cuantificación de *E. coli*

Diluc.	Densidad óptica (Mc Farland)	UFC/m L	UFC/m L	UFC/mL (calculado)
1:2	2.8	MNPC	MNPC	96×10^7
1:3	1.8	MNPC	MNPC	48×10^7
1:5	1.2	MNPC	MNPC	33×10^7
10^{-1}	0.8	MNPC	MNPC	19×10^7
10^{-2}	0.2	MNPC	MNPC	9.6×10^7
10^{-3}	0.1	MNPC	MNPC	0.96×10^7
10^{-4}		MNPC	MNPC	
10^{-5}	S.L.	MNPC	MNPC	
		Recuento datos experimentales		UFC/mL (promedio)
10^{-6}	S.L.	693	553	623 v.e.
10^{-7}	S.L.	101	92	96
10^{-8}	S.L.	22	9	15 v.e
10^{-9}	S.L.	3	3	3 v.e
10^{-10}	S.L.	0	1	1 v.e

MNPC = muy numerosas para contar

S.L. = Sin lectura

v.e. = valor estimado

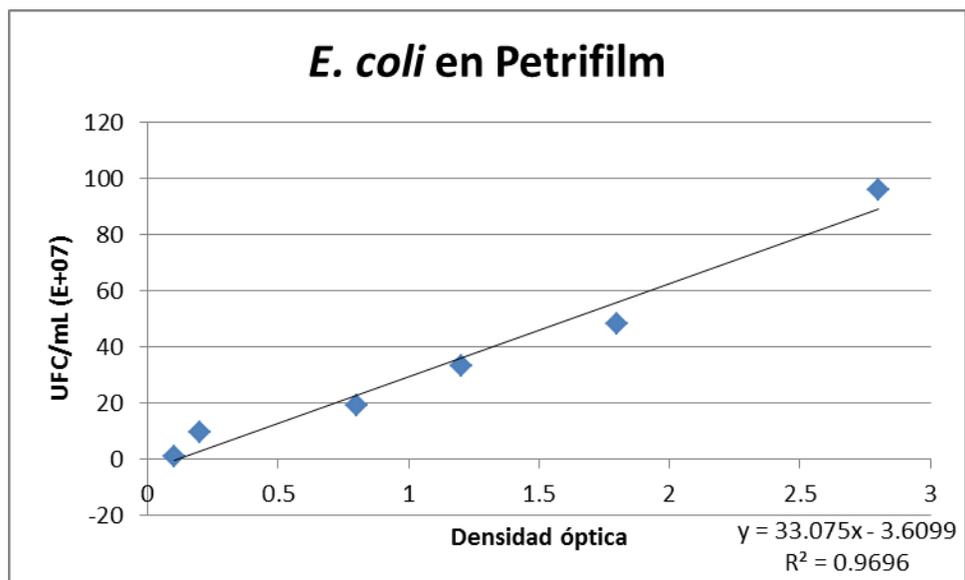


Figura A-2 Curva de cuantificación de *E. coli*

Cuantificación de *Salmonella typhi*

Debido a que la placa *Petrifilm* AC no es el medio ideal para el crecimiento de *Salmonella*, se utilizó Caldo Lactosado como diluyente para su enriquecimiento.

Tabla A-3 Cuantificación de *S. typhi*

Diluciones	Densidad óptica (Mc Farland)	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	UFC/ mL Promedio
1:3	0.9	MNPC	MNPC	MNPC	23 x10 ⁷
10 ⁻¹	0.4	MNPC	MNPC	MNPC	2.3 x10 ⁷
10 ⁻²	0.2	MNPC	MNPC	MNPC	0.23 x10 ⁷
10 ⁻³	0.2	MNPC	MNPC	MNPC	
10 ⁻⁴	S.L.	MNPC	MNPC	MNPC	
10 ⁻⁵	S.L.	MNPC	MNPC	MNPC	
Recuento datos experimentales					
10 ⁻⁶	S.L.	966	746	726	812.6 v.e
10 ⁻⁷	S.L.	72	76	57	68
10 ⁻⁸	S.L.	4	6	5	5 v.e.
10 ⁻⁹	S.L.	neg	neg	Neg	neg
10 ⁻¹⁰	S.L.	neg	neg	Neg	neg

MNPC = muy numerosas para contar

S.L. = Sin lectura

v.e. = valor estimado

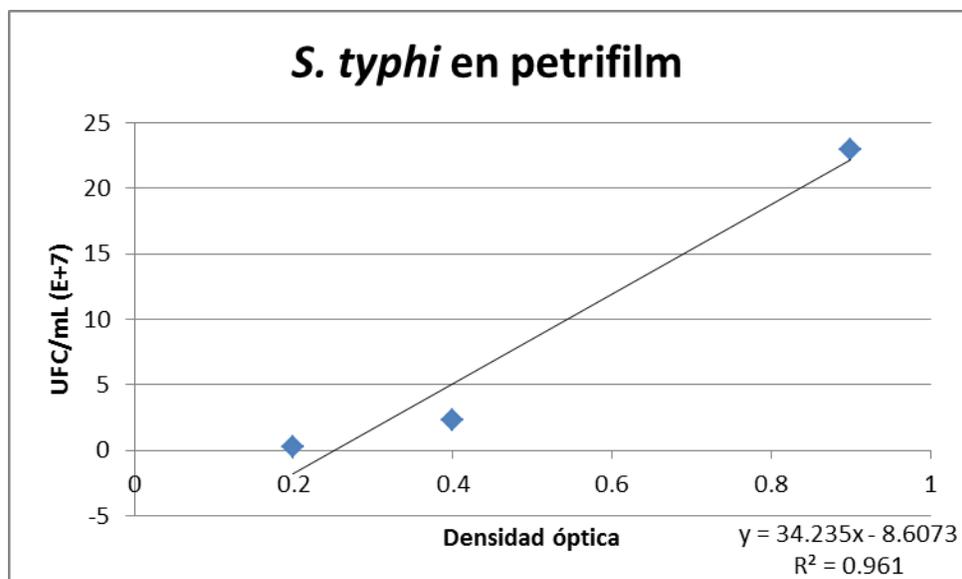


Figura A-3 Curva de cuantificación de *S. typhi*

Cuantificación de *Listeria monocytogenes*

Para estandarizar el cultivo, se utilizó una adaptación con placas *Petrifilm* AC y agar soya tripticasa (AST), en vez de las placas y medio específicos para *Listeria*.

La adaptación consiste en utilizar extracto de levadura (EL) al 0.1 y 0.5 % como diluyente de enriquecimiento, tanto para sembrar en AST como en placas *Petrifilm* AC. El recuento se realizó por duplicado.

Tabla A-4 Cuantificación de *L. monocytogenes*

Diluc	Densidad óptica (Mc Farland)	UFC / mL en <i>Petrifilm</i>		UFC/ mL en AST Con EL 0.5%
		Con EL 0.1%	Con EL 0.5%	
Cepa	1.8	139 x10 ⁷	136 x10 ⁷	122 x10 ⁷
1:2	1.1	70 x10 ⁷	68 x10 ⁷	61 x10 ⁷
1:3	0.8	47 x10 ⁷	34 x10 ⁷	41 x10 ⁷
1:4	0.7	35 x10 ⁷	17 x10 ⁷	30 x10 ⁷
1:5	0.6	28 x10 ⁷	9 x10 ⁷	24 x10 ⁷
10 ⁻¹	0.4	14 x10 ⁷	5 x10 ⁷	12 x10 ⁷
10 ⁻²	0.1	MNPC	MNPC	1.2 x10 ⁷
10 ⁻³	0.1	MNPC	MNPC	MNPC
10 ⁻⁴	0.1	MNPC	MNPC	MNPC
10 ⁻⁵	S.L.	MNPC	MNPC	MNPC
Recuento datos experimentales				
10 ⁻⁶	S.L.	1000	860	1140 v.e.
10 ⁻⁷	S.L.	139	136	122

MNPC = muy numerosas para contar

S.L. = Sin lectura

v.e. = valor estimado

Con *Petrifilm* la diferencia entre las dos concentraciones de EL es mínima, incluso con mejores resultados a la concentración más baja, por lo que es la que se seleccionó.

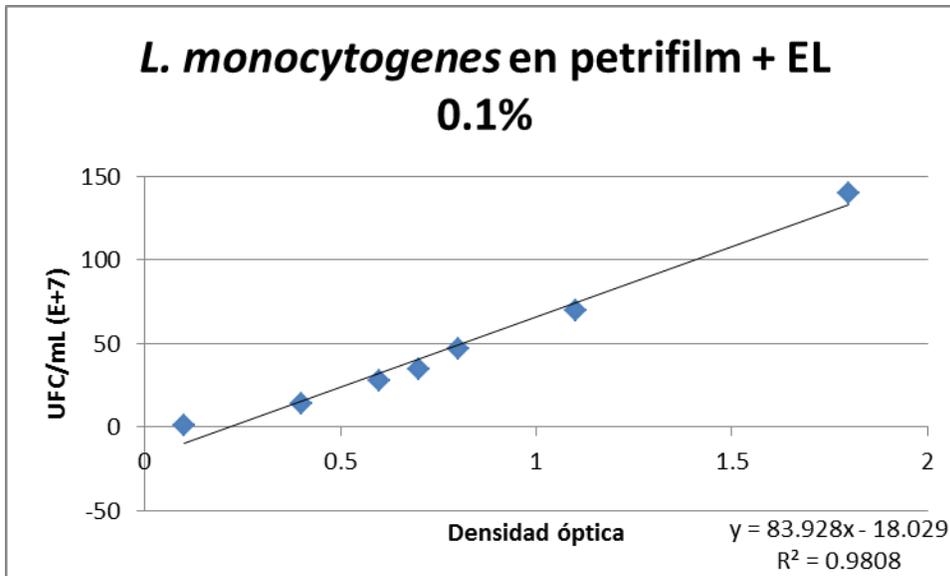


Figura A-4 Curva de cuantificación de *L. monocytogenes* en *Petrifilm*

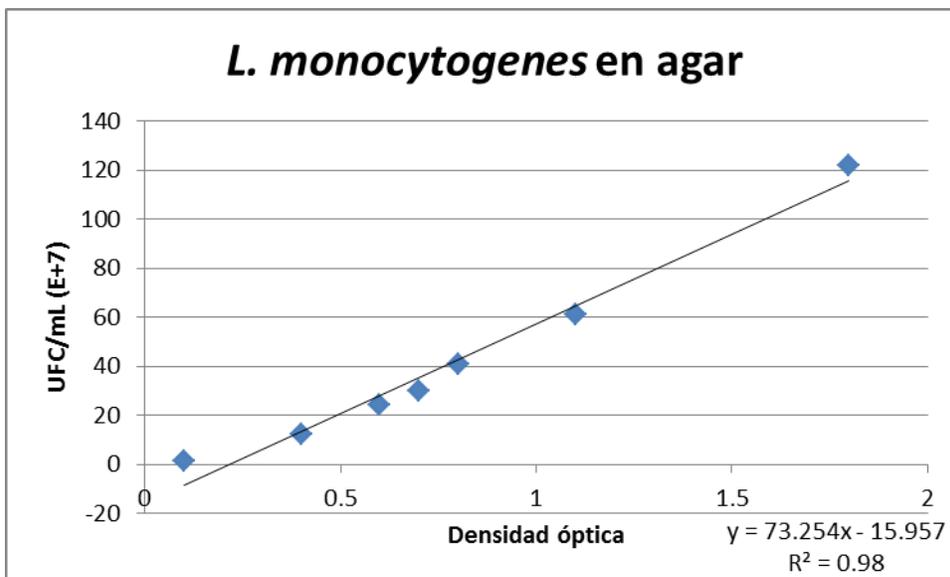


Figura A-5 Curva de cuantificación de *L. monocytogenes* en *ágar*

Resultados de densidad de población en cultivos de 24 horas.

Tabla A-5 Comparación de cuantificación de bacterias

Cepa	Diluc. Con lectura	D. O. de la Dilución	UFC/mL en cultivo	UFC/mL Escala de Mc Farland
<i>Escherichia coli</i>	1:3	1.8	4.8×10^8	5.4×10^8
<i>Salmonella typhi</i>	1:3	0.9	2.3×10^8	2.7×10^8
<i>Listeria monocytogenes</i>	1:3	0.8	4.7×10^8	2.4×10^8

Como se sabe, Mc Farland desarrolló la escala con base en cultivos de *E. coli*, por lo que se considera que genera resultados muy similares para otras bacterias de ese tamaño y forma, lo cual se cumple en nuestros resultados para *E. coli* y *Salmonella typhi*, mientras que para *Listeria monocytogenes* da un resultado mayor porque son bacterias de menor tamaño.

Cuantificación de *Candida albicans*

Se prepararon tubos de distinta densidad óptica en SSI, diluciones y cuentas para cada tubo en particular, y se hizo la correlación entre la escala de Mc Farland y la cuenta en placa en agar Sabouraud y en *Petrifilm* YM (para hongos y levaduras).

Tabla A-6 Cuantificación de *C. albicans* en ágar

1ª Dilución	Densidad óptica (Mc Farland)	2ª dilución	Cuenta en placa agar Sabouraud			UFC/mL calculado
			UFC/mL	UFC/mL	Promedio	
Cepa24h		10 ⁻⁵	157	169	163	1.63 x10 ⁷
1:2		10 ⁻⁵	116	117	116.5	1.17 x10 ⁷
1:3	1.60	10 ⁻⁵	36	50	43	4.30 x10 ⁶
1:4	1.20	10 ⁻⁵	37	31	34	3.40 x10 ⁶
1:5	0.70	10 ⁻⁵	23	28	25.5	2.55 x10 ⁶
1:6	1.20	10 ⁻⁴	351	391	371	3.71 x10 ⁶
1:7	1.10	10 ⁻⁴	297	275	286	2.86 x10 ⁶
1:8	0.70	10 ⁻⁴	160	159	159.5	1.60 x10 ⁶
1:9	0.60	10 ⁻⁴	142	121	131.5	1.32 x10 ⁶

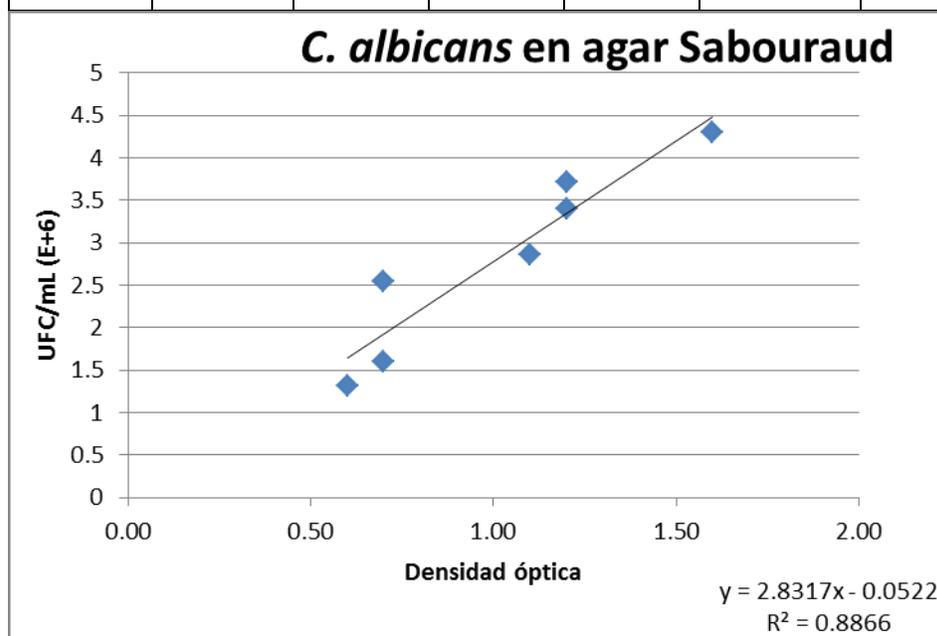


Figura A-6 Curva de cuantificación de *C. albicans* en ágar

Tabla A-7 Cuantificación de *C. albicans* en *Petrifilm* YM

1 ^a Dilución	Densidad óptica (Mc Farland)	2 ^a dilución	Cuenta en <i>Petrifilm</i>			UFC/mL calculado
			UFC/m L	UFC/mL	Promedio	
Cepa 24h		10 ⁻⁵	174	190	182	1.82 x10 ⁷
01:02		10 ⁻⁵	134	139	136.5	1.37 x10 ⁷
01:03	1.60	10 ⁻⁵	79	64	71.5	7.15 x10 ⁶
01:04	1.20	10 ⁻⁵	40	39	39.5	3.95 x10 ⁶
01:05	0.70	10 ⁻⁵	25	28	26.5	2.65 x10 ⁶
01:06	1.20	10 ⁻⁴	389	381	385	3.85 x10 ⁶
01:07	1.10	10 ⁻⁴	333	304	318.5	3.19 x10 ⁶
01:08	0.70	10 ⁻⁴	259	219	239	2.39 x10 ⁶
01:09	0.60	10 ⁻⁴	159	168	163.5	1.64 x10 ⁶

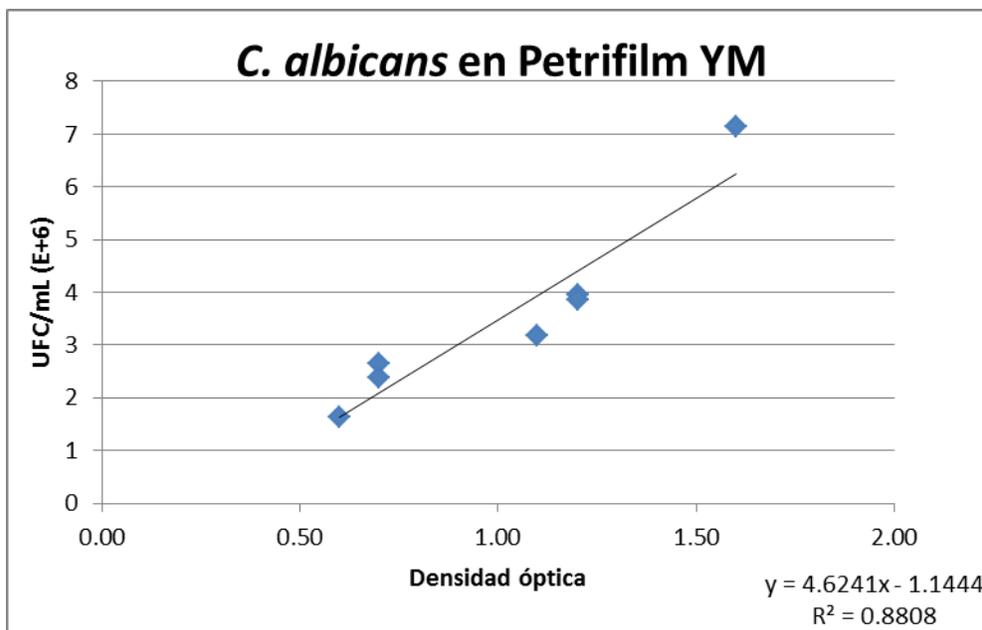
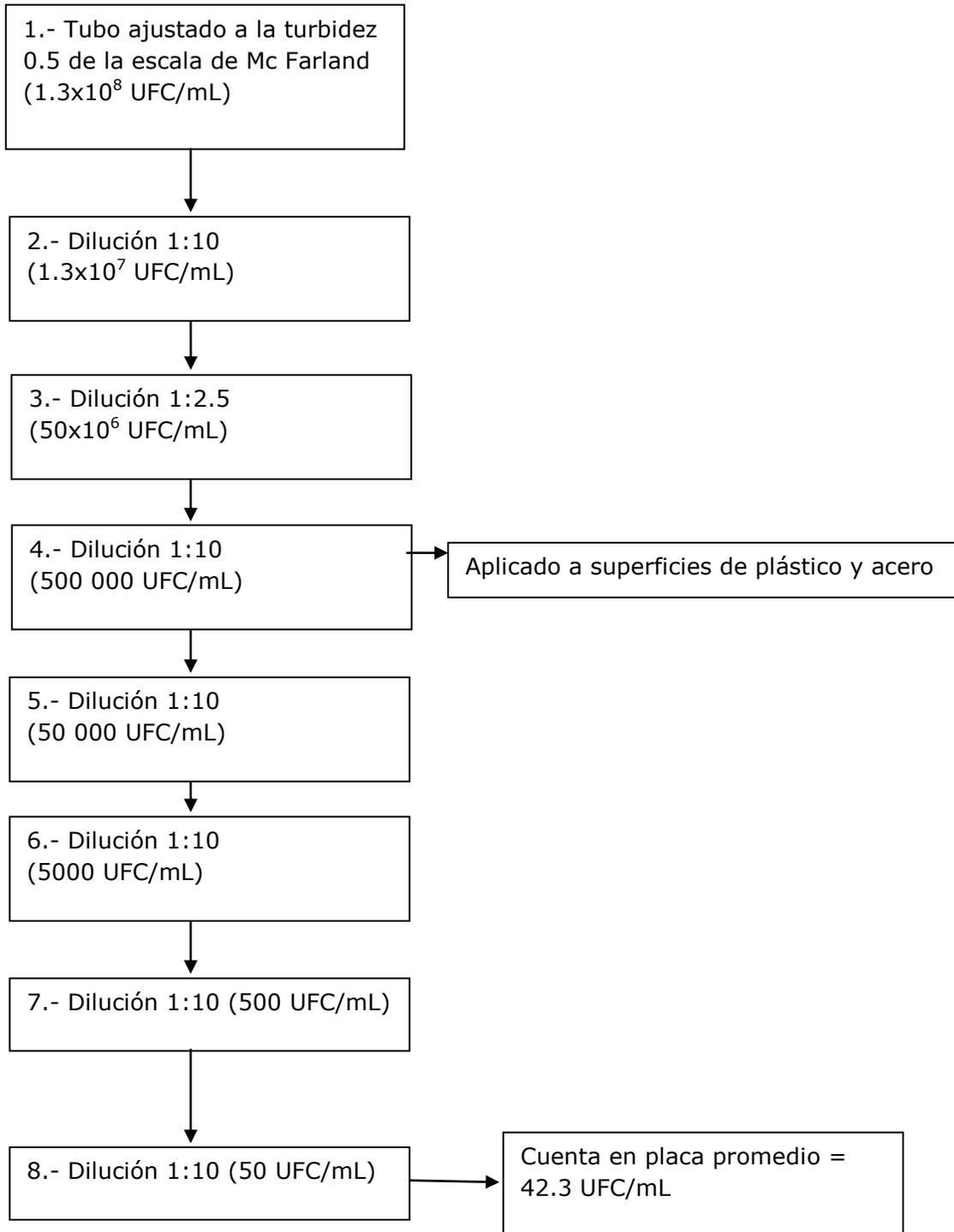


Figura A-7 Curva de cuantificación de *C. albicans* en *Petrifilm*

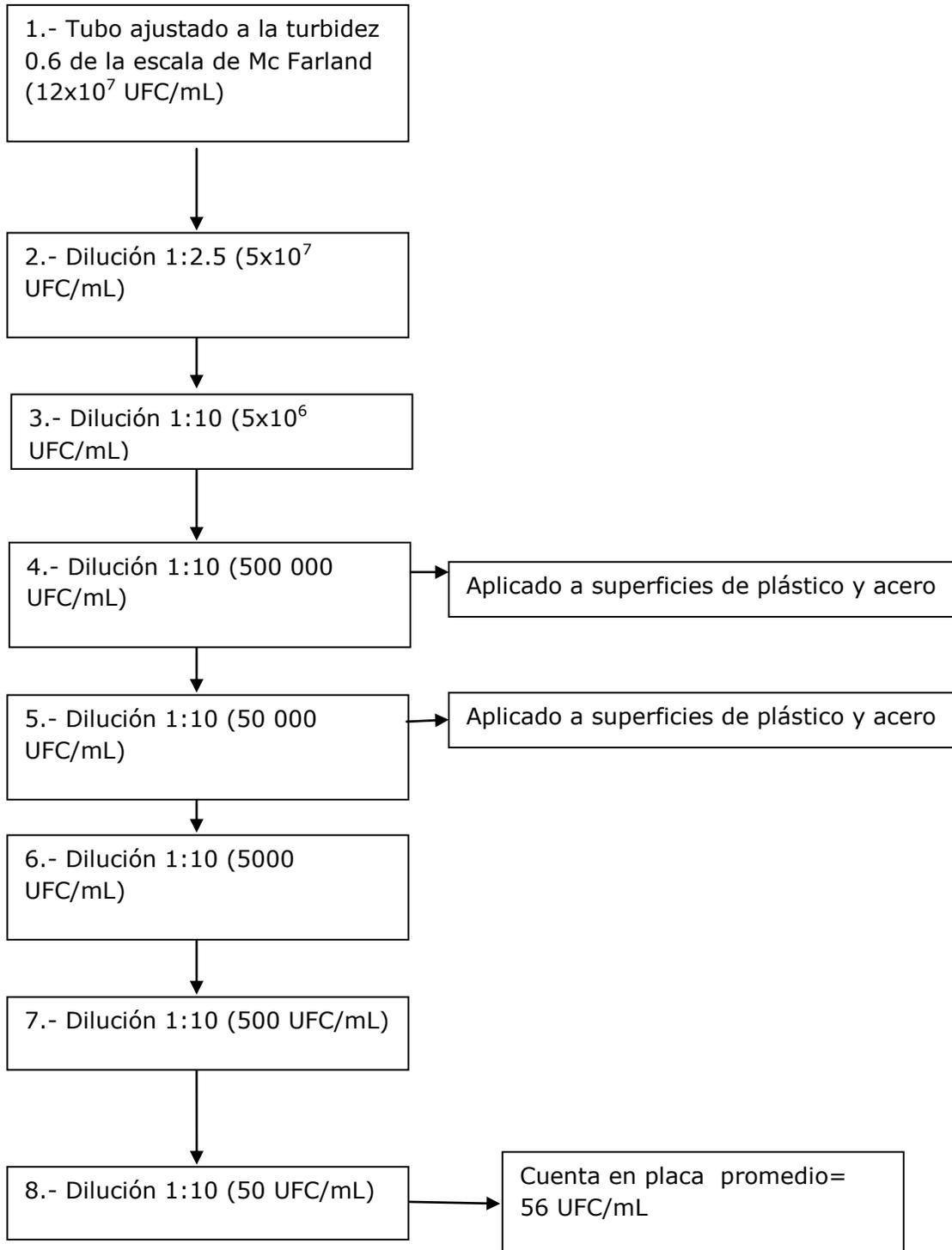
Como puede observarse, se obtiene prácticamente la misma correlación en ambos métodos de recuento y valores ligeramente más altos de cuentas microbianas en las placas *Petrifilm*TM, lo que nos indica que pueden usarse con buenos resultados.

B. PROCEDIMIENTOS PARA PREPARAR SOLUCIONES DE MICROORGANISMOS DE CONCENTRACIÓN CONOCIDA

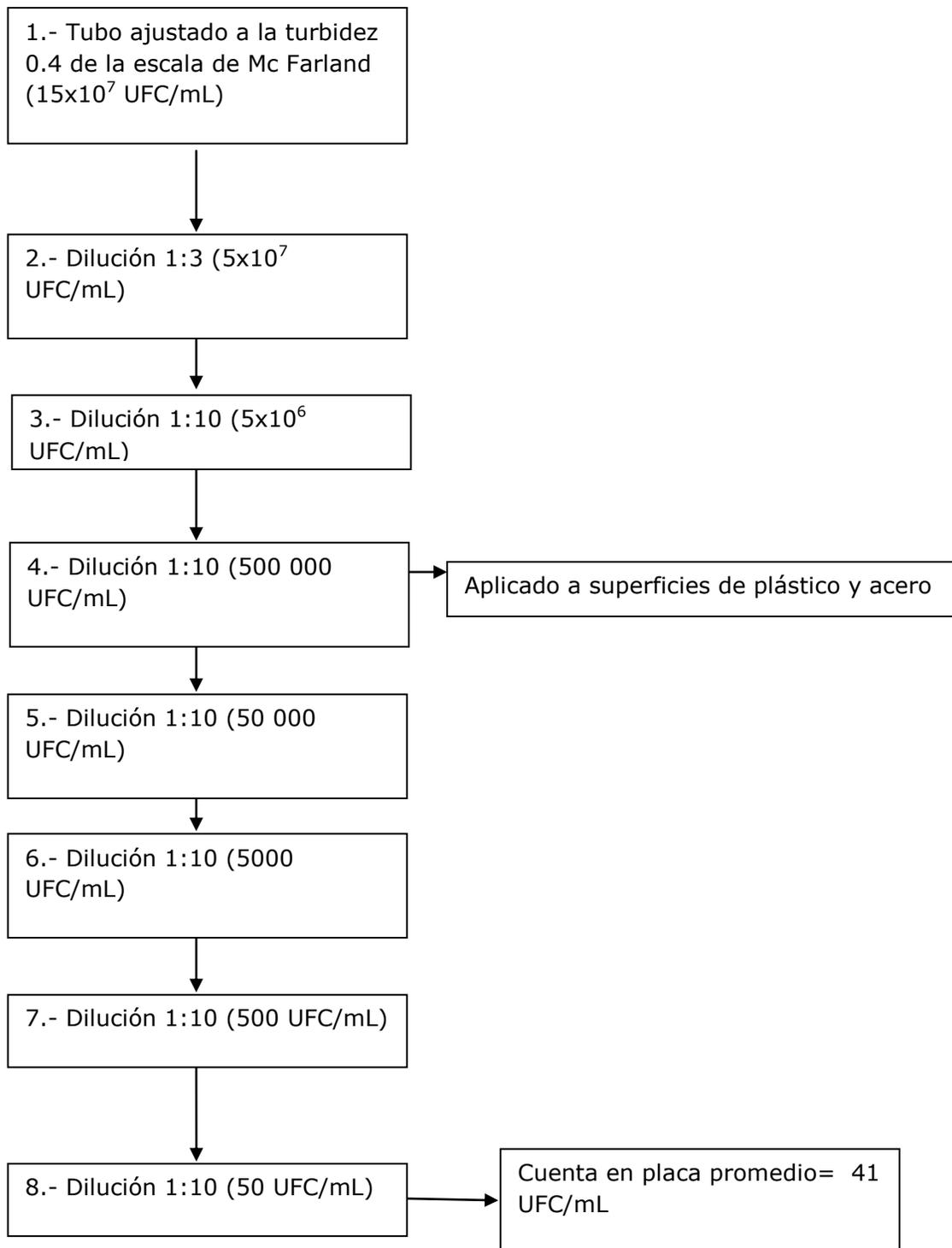
E. coli (Diluciones en SSI)



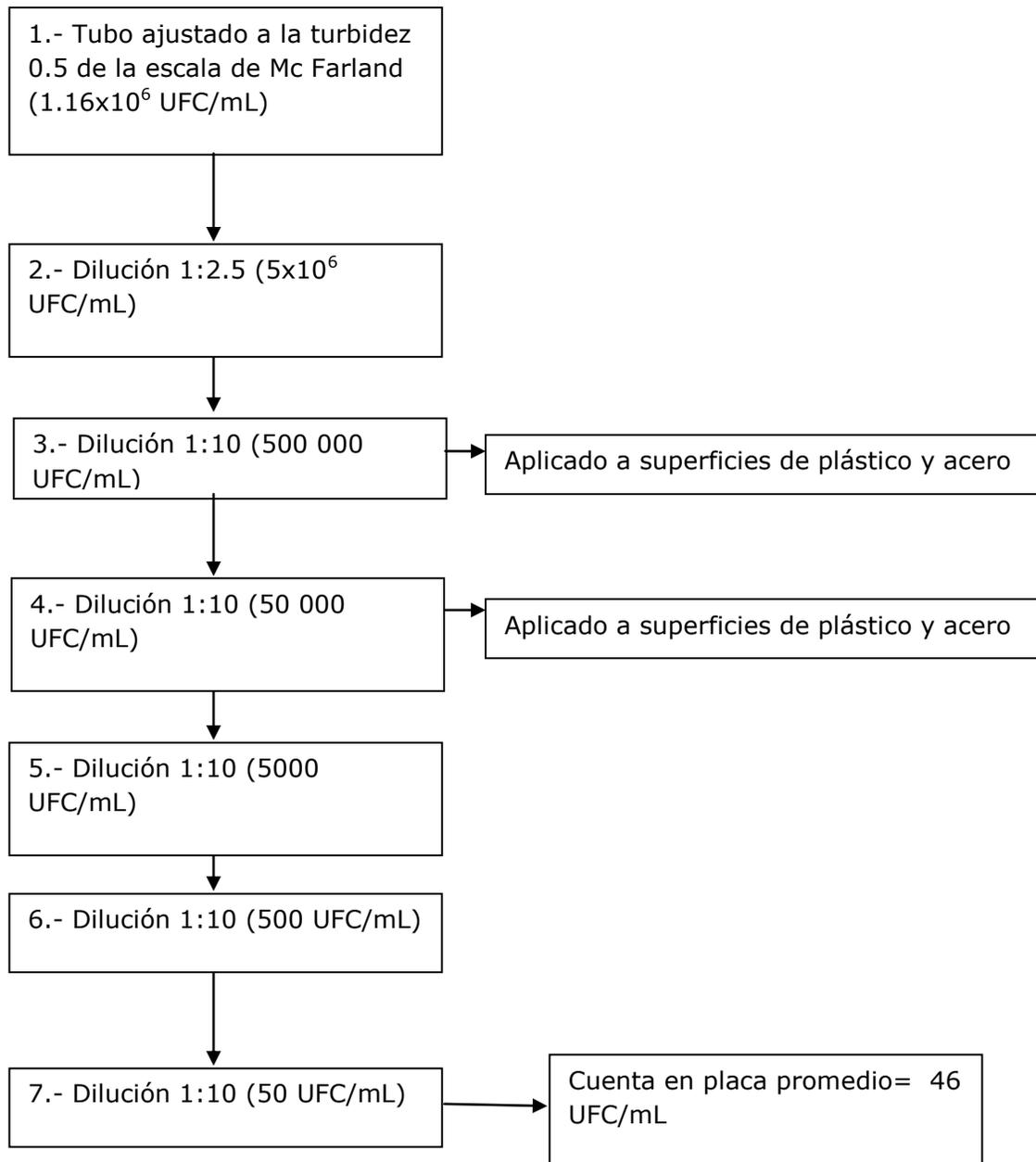
Salmonella typhi (diluciones en SSI; sólo para contar, la última dilución se hizo en caldo lactosado, lo que permite cultivarla en 3M™ Petrifilm™ AC)



Listeria monocytogenes (diluciones en SSI y sólo para contar, la última dilución se hizo en extracto de levadura al 0.1%)



Candida albicans (Se utilizó SSI como diluyente)



C. PROCEDIMIENTO DEL HISOPADO, ILUSTRADO CON EL SISTEMA 3M™ Clean Trace™

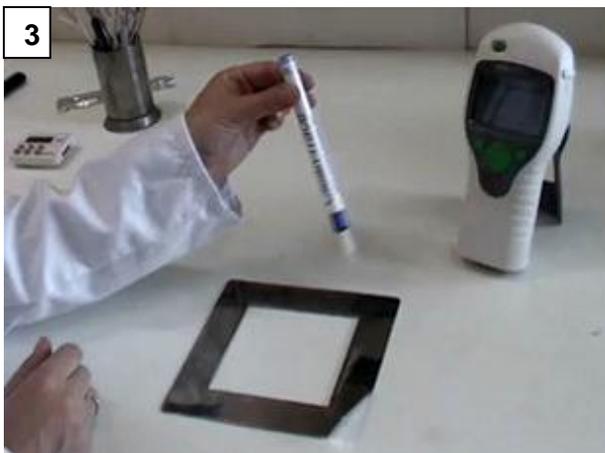


Se muestrea una superficie de 10x10 cm con el hisopo, mediante 10 trazos en sentido vertical y 10 trazos en sentido horizontal girando el hisopo, y cuidando no tocar con la mano la parte blanca del hisopo, ya que es común tener ATP en las manos.



Después de muestrear y antes de activarlo, el hisopo es estable hasta por 30 minutos

Para activarlo, se aprieta el émbolo y así entran en contacto los reactivos y el ATP colectado en el hisopo.



Se agita lateralmente 5 veces en el caso del 3M™ Clean Trace™ y durante 5 seg para el BioControl™ Lightning MVP.



Inmediatamente después de activado y agitado, se introduce el hisopo al sistema.



Se toma la lectura, obteniendo los resultados en 10 segundos para ambos sistemas; esto permite determinar el estado higiénico de la superficie, de acuerdo a la recomendación de cada sistema.

Fuente: 3M, 2011.

Sistema *BioControl™ Lightning MVP* (Mismo procedimiento que para el sistema *3M™ Clean Trace™*).



Fuente: *BioControl™*, 2005

BIBLIOGRAFÍA

Adams, M. R. y M.O. Moss. 1997. Microbiología de los Alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

Amaro L.M., 2011. Higiene, Inspección y Control de los Alimentos. Historia, presente y futuro. Facultad de Veterinaria Universidad de Córdoba. España. Disponible en línea a través de <http://www.uco.es/nutybro/docencia/higiene/>

Barreto, A., C. Sedrés, C. Ricardo y L. Ortiz. 2000. Categorías enteropatógenas de *Escherichia coli* en alimentos. Universidad de Camagüey. *Revista producción animal*. 12, jul 2000. Disponible en línea: <http://www.reduc.edu.cu/147/00/19ALIM~1.pdf>

Barros, P. y A. Bravo. 2001 ¿Cómo funciona?, Capítulo 16. Fotomultiplicador. Disponible en línea a través de: <http://www.librosmaravillosos.com/>

Biocontrol™. 2003. Manual técnico del sistema Lightning™.mvp, versión 2.00

Biocontrol™. 2005. Sistema Lightning™.mvp. Disponible en línea a través de: <http://www.biocontrolsys.com/products/mvp.html>

Bioenergética y metabolismo. UAM. Disponible en línea: www.uam.es/personal_pdi/ciencias/ibonilla/biologia/ZeroYear/5.Metabolismo.PPT

Box, Hunter y Hunter. 2001. Estadística para investigadores. Introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos. Editorial Reverté, México.

Botija, P. 2011. El fotomultiplicador. Temas de Física general y avanzada. Blog disponible en línea: <http://pedro-botija.blogspot.com/2011/04/el-fotomultiplicador.html>

Brown, T., E. Le May, B. Bursten y J. Burdge. 2004. Química. La ciencia central. 9ª Edición, Editorial Pearson Educación, México.

Caballero, T. 2008. Temas de higiene de los alimentos. Editorial Ciencias Médicas. La Habana Cuba.

Cabeza H. E. 2000. Estandarización de una curva inversa de crecimiento bacteriano por método turbidimétrico (Patrón Mc Farland) y recuento en placa. Manual de prácticas de microbiología predictiva. Universidad de Pamplona, Colombia.

Castiblanco, S. A. 2008. Verificación comparativa por método de bioluminiscencia y método tradicional de la limpieza y desinfección en una industria cosmética. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

Catalán, R. 2006. Programas de pre-requisito para la aplicación de haccp. Base fundamental para la inocuidad alimentaria. Módulo GMP/SSOP. Larae.org. Red de Alimentación Escolar para América Latina y el Caribe. Disponible en línea a través de:

http://www.larae.org/home/contenido/Ferias_cursos_otros/Seminario_01/doc/Programa%20de%20pre-requisito%20Luz%20Catalan.ppt

Ceja, V. I. 2003. Implementación de un Método Rápido (bioluminiscencia) para la aprobación Microbiológica de Productos de Cuidado Oral. Tesis de licenciatura de Químico-Farmacéutico Biólogo. FES Cuautitlán, UNAM. México.

Ciesliar, G. 2003. Reproducción y técnicas de siembra. Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires, Argentina. Disponible en línea a través de: http://www.oocities.org/ar/vetterworld/microbiologia/cuest_u5.htm

Chollet, R. et. al. 2008. Rapid detection and enumeration of contaminants by atp bioluminescence using the Milliflex® rapid microbiology detection and enumeration system Millipore SAS 39 Route Industrielle de la Hardt, 67120 Molsheim, France.

Coenzima.com. Adenosina Trifosfato (ATP). Disponible en línea a través de:

http://www.coenzima.com/adenosina_trifosfato_atp

Comisión Federal para protección Contra Riesgos Sanitarios. 2010. Secretaría de Salud. Gobierno Federal. Estados Unidos Mexicanos. <http://www.cofepris.gob.mx/>

Costamagna S. y Voluntarios. 2007. Parásitos y parasitosis. Las parasitosis.com.ar. Erradicando parásitos de guarderías y escuelas con amor y conocimiento. Voluntariado Universitario. Argentina. Disponible en línea a través de:

<http://lasparasitosis.com.ar/index.php?option=com.content&task=view&id=26&Itemid=1>

Davidson, C.A., C.J. Griffith, A.C. Peters & L.M. Fielding. 1999. Evaluation of two methods for monitoring surface cleanliness—ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing. *Luminescence. The Journal of Biological and Chemical Luminescence*. 14:33-38.

Distribuciones biotecnológicas. S.A. de C.V. Monitoreo de Proteínas y Alérgenos.

Disponible en línea a través de:

<http://www.distribucionesbiotecnologicas.com.mx/files/allertec.pdf>

Donlan, R.M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Dis.* 8, 9. Disponible en Internet <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/8/9/02-0063.htm>

Doyle, P. M., R. L. Beuchat, y J. T. 2000. Montville, Microbiología de los Alimentos: fundamentos y fronteras. Editorial Acriba, Zaragoza, España.

Dupont, 2009. Bioseguridad en la industria avícola. Una herramienta en las buenas prácticas de producción. Disponible en línea a través de: <http://www.amevea-ecuador.org/datos/Bioseguridad%20en%20la%20industria%20avicola-%20BPP.pdf>

Easter, M. 2003. Hygiene Monitoring in support of food safety-a review of methods and industry trends. Article published in the Society for Food Hygiene Technology UK. Hygiene International. Disponible en línea a través de: http://www.hygiene.net/docs/hygiene_monitoring_review_of_methods_and_trends.pdf

Elinox, 2011. *Aco Inoxidable*. Distribuidora de Acero Inoxidable. Brasil. Preguntas frecuentes. Disponible en línea a través de: <http://www.elinox.com.br/perguntas-frequentes/aspectos-quimicos>

FAO, 2002. Sistemas de calidad e inocuidad de los alimentos. Manual de capacitación sobre higiene de los alimentos y sobre el sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC). España. Disponible en línea a través de: <http://www.fao.org/DOCREP/005/W8088S/W8088S00.HTM>

FAO, 2003. Capítulo 1. Introducción a las micotoxinas. Manual sobre la aplicación del sistema de análisis de peligros y de puntos críticos de control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas. Roma Italia. Disponible en línea a través de: <http://www.fao.org/docrep/005/y1390s/y1390s00.htm#Contents>

Feldman, P., et al. 2000. Bioluminiscencia. Axonas. Buenos Aires. Argentina. Disponible en línea a través de: http://www.axonas.com.ar/backoffice/publicaciones/5_Bioluminiscencia.pdf

Filippini S, 2011. Estadística descriptiva gráficos exploratorios. Universidad Nacional de Luján, Buenos Aires. Argentina. Disponible en línea a través de: www.unlu.edu.ar/~estadistica/Estadistica_Descriptiva_Graficos_Exploratorios.ppt

Flores, L., F. Martinez y G. Casillas. 1999. Manual de Buenas prácticas de Higiene y Sanidad. Secretaría de Salud. México D.F. Disponible en línea a través de: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/sanidad.html>

Forsythe S. J. y P. R. Hayes. 2002. Higiene de los alimentos, microbiología y HACCP. 2ª Edición. Editorial Acribia. Zaragoza España.

FSIS. 2010. Sanitation Standard Operating Procedures. USDA (United States Department of Agriculture). USA. Disponible en línea a través de: http://www.fsis.usda.gov/pdf/ssop_module.pdf

Fuster, N. 2007. Importancia del control higiénico de las superficies alimentarias mediante técnicas rápidas y tradicionales para evitar y/o minimizar las contaminaciones cruzadas. Tesis. Universidad Autónoma de Barcelona. España.

Disponible en línea a través de:

<http://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=5664>

Garrahan, P. 1994. El ATP. Ciencia hoy. Argentina. pp 48-49 Disponible en línea a través de: www.cienciahoy.org.ar/hoy27/atp.htm

González, A. I. 2007. Prerrequisitos del sistema APPCC: Punto de partida hacia la seguridad alimentaria. Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Disponible en línea a través de: <http://www.madrimasd.org/blogs/alimentacion/2007/01/30/58358>

González, S. L. 2008. Verificación de la efectividad del programa de limpieza y desinfección en establecimientos de venta al detalle y *delicatessen* realizando pruebas microbiológicas y de bioluminiscencia de ATP. Programa de maestría en ciencia y tecnología de alimentos. Universidad de Puerto Rico. Recinto Universitario de Mayagüez. Disponible en línea a través de: <http://proquest.umi.com/pqdlink?Ver=1&Exp=10232016&FMT=7&DID=1559852641&RQT=309&attempt=1>

Green, T.A., S.M. Russell, & D.L. Fletcher. 1998. Effect of chemical sanitizing agents on ATP bioluminescence measurements. Department of Poultry Science, University of Georgia, Athens, GA 30602-2772, USA. Disponible en línea a través de: <http://lib.bioinfo.pl/paper:9713763>

Guzmán, A. D. 2007. Evaluación del programa de limpieza y desinfección de la mesa de despiece en una planta ampacadora de carnes frías en México D.F. por medio de pruebas de bioluminiscencia. FES Cuautitlán, UNAM.

Hansen, D., M. Hilgenhoer y W. Poop 2007. ATP bioluminescence –for kitchen hygiene and Cleaning control of surgical instruments. *International Journal of Infection Control*. Germany. Disponible en línea a través de: <http://www.ijic.info/article/viewPDFInterstitial/3036/2220>

Hernández, J. M., 2011. La "Máquina MORA", otra panacea alternativa. Proyecto La Ciencia y sus Demonios. Noticias científicas. Disponible en línea a través de: <http://cnho.wordpress.com/2011/01/14/la-%C2%ABmaquina-mora%C2%BB-otra-panacea-alternativa/>

Herranz, S. 2008. Métodos rápidos y automatización en Microbiología Alimentaria (I). Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET. Madrid, España. Disponible en línea a través de: <http://www.madrimasd.org/blogs/alimentacion/2008/01/31/83638>

Herranz, S. 2008. Microbiología en frutas y hortalizas. Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos Facultad de Veterinaria Universidad Complutense de Madrid. Blog disponible en línea a través de: <http://rodrigar468.blogspot.com/>

Hygiena™. 2006. ATP Hygiene Monitoring System Comparison Analysis. Rapid solutions for food safety. Disponible en línea a través de: <http://www.hygiene.net/>

Iañez, E. 2005. Sitio web para la consulta de Microbiología general. Licenciatura de Biología. Universidad de Granada, España. Disponible en línea a través de: <http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/index.htm>

ICMSF. 1991. El sistema de análisis de riesgos y puntos críticos. Su operación a las industrias de alimentos. Editorial Acirbia. Zaragoza España.

INA. 2007 Junio. Instituto Nacional de Alimentos. Higiene e inocuidad de los alimentos: Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento (POES). Gacetilla correspondiente a El Boletín del Inspector Bromatológico N° 9. Argentina. Disponible en línea a través de: http://www.anmat.gov.ar/webanmat/BoletinesBromatologicos/gacetilla_9_higiene.pdf

Johns, N. 1995. Higiene de los alimentos. Directrices para profesionales de hostelería, restauración y catering. Editorial Acirbia. Zaragoza España.

Katsuyama, M. 2005. Principles of food processing sanitation. 2ª Ed. Food processors institute. Washington D.C.

Lanavase, 2010. Determinación de parámetros de desempeño. Senasa. Costa Rica. Disponible en línea a través de: <http://www.senasa.go.cr/senasaweb/direccionlaboratorioresiduoscontaminantesalimentosRECAA.html>

La Rosa, R. 1998. Bioluminescence. Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*. **102**. Humana Press. New Jersey, USA.

Lehninger, A. 1995. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. Editorial Omega, Barcelona, España.

Lehninger, A. Nelson D., Cox M., 1993. Principios de bioquímica. 2ª Edición. Editorial Omega S.A. Barcelona, España.

Logan, C. 2010. What are the benefits of food safety?. Lance Armstrong Foundation Livestrong.com. Disponible en línea a través de: <http://www.livestrong.com/article/260903-what-are-the-benefits-of-food-safety/>

Lomelí, R. y O. Tamayo. 2007. Contaminación por detergentes. Eutroficación. Contaminación del agua. UNAM, CCH. Disponible en línea a través de: http://www.sagangea.org/hojared_AGUA/paginas/20agua.html

Madigan, Martinko, Parker. 2004. Brock. Biología de los microorganismos. 10ª Edición.. Pearson Prentice Hall, Madrid, España.

Mao, Yi. Apr 2011, Dynamics studies of luciferase using elastic network model: how the sequence distribution of luciferase determines its color. PEDS: Protein Engineering, Design & Selection.

Marriot, N. G. 2003. Principios de higiene alimentaria. Editorial Acribia Zaragoza España.

Metzler, E. D. 1981. Bioquímica. Las reacciones químicas en las células vivas. Editorial Omega. Barcelona España.

Mossel, A., B. Moreno y B. Struijk. 2003. Microbiología de los alimentos. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la integridad (inocuidad y calidad) microbiológica de los alimentos. 2ª Edición. Editorial Acribia. Zaragoza España.

Niwa, K. y Y. Ohmiya. 2004. Inhibitory effect of lipoic acid on firefly luciferase bioluminescence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **323**, 2: 625-629. Japan.

Organización Mundial de la Salud, FAO. 2005. "Medidas prácticas para promover la inocuidad de los alimentos". Conferencia Regional FAO/OMS sobre Inocuidad de los Alimentos para las Américas y el Caribe. Disponible en línea a través de: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/008/j7050s/j7050s00.pdf>

Phan, T. y T. Gormon. 1997. A chemically defined minimal medium for the optimal culture of *Listeria*. *International Journal of Food Microbiology*. **35**, 5: 91-95 Elsevier.

Sanz, J. L, Métodos en microbiología. Aislamiento y cultivo de microorganismos. Microbiología Ambiental. UAM, México. Disponible en línea a través de: <http://www2.cbm.uam.es/jlsanz/Docencia/archivos/02.pdf>

Secretaría de Salud. 1995. Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994, Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. Disponible en línea: <http://bibliotecas.salud.gob.mx/gsdl/collect/nomssa/index/assoc/HASH5b22.dir/doc.pdf>

Secretaría de Salud. 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-120-SSA1-1994 Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad en el proceso de alimentos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas. Disponible en línea: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/120ssa14.html>

Secretaría de Salud. 2009. Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios. Disponible en línea: <http://www.dof.gob.mx/documentos/3980/salud/salud.htm>

Shimomura, O. 2006. Bioluminescence. Chemical Principles and Methods. World Scientific Publishing. USA.

Simpson, W.J., J.L. Archibald y C.J. Giles. 2006. Protocol for assessing the sensitivity for hygiene test systems for live microorganisms and food residues. Cara Technology, UK.

Simpson, W.J., C.J. Giles. y H.A. Flockhart 2006. Repeatability for hygiene test systems in measurement of low levels of ATP. Cara Technology, UK.

Siragusa, G. R., W. J. Dorsa C. N. Cutter, L. J. Perino y M. Koohmaraie. 1996. Use of a newly developed rapid microbial ATP bioluminescence assay to detect microbial contamination on poultry carcasses. *Journal Biolumin Chemilumin* Vol 11 pages 297-301. Disponible en línea a través de: <http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/54380530/1996110297.pdf>

Subbarao, G. V., T. Ishikawa, O. Ito, K. Nakahara, H. Y. Wang y W. L. Berry. 2006. Bioluminescence assay to detect nitrification inhibitors released from plant roots: a case study with *Brachiaria humidicola*. *Plant & Soil Journal*. **288**, 1-2: 101-112. Disponible en línea a través de: <http://www.springerlink.com/content/r435654g2r514044/>

Tecrom Group, Innovación tecnológica. Disponible en línea a través de: <http://www.tecrom.com/es/>

Universidad Pública de Navarra. 2008. Notas de microbiología de los alimentos. Grupo de investigación de genética y microbiología. Pamplona España, 2008. Disponible en línea a través de: <http://www.unavarra.es/genmic/microgral/indice-microgral.htm>

UGRJ. Unión Ganadera Regional de Jalisco, México, 2011. Introducción a las infestaciones parasitarias. Disponible en línea a través de: http://www.ugrj.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=465&Itemid=376

Universidad de Sevilla. 2011. Tema M9 Biocapas bacterianas. Microbiología oral. Disponible en línea a través de: <http://www.microcsalud.us.es/asignaturas/microbiologiaoral/temas/BLOQUE%20I.%20GENERALIDADES/>

Vega, R. G. 2011. Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos. Comisión de control analítico y ampliación de cobertura. Secretaría de Salud.

Velazco, F. D. 2011. Infecciones gastrointestinales. Introducción a la microbiología clínica. Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo . La Coruña. Danival org. Disponible en línea a través de: http://danival.org/600%20microbio/5000micro_dvf/micro_dvf.html

Velázquez, M. y J.M. Feirtag. 1997. Quenching and enhancement effects of ATP extractants, cleansers, and sanitizers on the detection of the ATP bioluminescence signal. Department of Food Science, University of Minnesota, USA.

Weimer, R. 2007. Estadística. 11ª Reimpresión. Grupo editorial Patria. México.

Wildbrett, G. 2000. Limpieza y desinfección en la industria alimentaria. Editorial Acribia. Zaragoza España.

Wilson, D.I. 2005. Challenges in Cleaning: Recent Developments and Future Prospects. *Heat Transfer Engineering*, **26**, 1:51-59.

Yurkanis, B. 2008. Química orgánica. 5ª Ed. Universidad de California. Santa Bárbara. Editorial Pearson Educación. México.

3M™. Catálogo de microbiología. Distribuciones Biotecnológicas. S.A. de C.V. México. Disponible en línea a través de: <http://www.distribucionesbiotecnologicas.com.mx/>

3M™. 2011. Clean Trace™ NG Luminometer. Disponible en línea a través de: http://solutions.3m.com/wps/portal/3M/en_US/Microbiology/FoodSafety/productinformation/productcatalog/?PC_7_RJH9U523003DC023S7P92O3O87_nid=994DWNJTD0beJ9C52DTHJWgl

3M™. 2005. Manual técnico del sistema de evaluación de higiene Biotrace™ UK.

3M™. 2008. Microbiology. Technical Bulletin. An overview of Rapid Hygiene Testing Using ATP Bioluminescence. EUA.

3M™. 2009. Seguridad Alimentaria. Sistemas para Higiene 3M™ Clean Trace™. España. Disponible en línea a través de: http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Clean_Trace.pdf