

CONTAMINACIÓN CRUZADA EN LAS INDUSTRIAS ALIMENTARIAS, APTITUD MICROBIANA PARA SOBREVIVIR

Dr. Julio César Lamela Pérez (jlamela@conaprole.com.uy)

Especialista en Microbiología, Especialista UNIT en Seguridad Alimentaria.

Introducción

La Inocuidad de Alimentos: De acuerdo con el Codex Alimentarius es la garantía de que un alimento no causará daño al consumidor cuando el mismo sea preparado o ingerido de acuerdo con el uso a que se destine. Los alimentos son la fuente principal de exposición a agentes patógenos, tanto químicos como biológicos y alergénicos. La pérdida de la inocuidad conlleva riesgos sustanciales para la salud de los consumidores y representa grandes cargas económicas para las diversas comunidades y naciones.

Es también una de las principales preocupaciones de quienes tenemos la responsabilidad, pública o privada, de cuidar y mantener mediante vigilancia constante, producción de alimentos sin riesgos para la salud del consumidor, tarea compartida con todas las organizaciones mundiales dedicadas al tema (FDA, USDA, EFSA, PAHO, OMS, CODEX ALIMENTARIUS, etc.).

Para ello se ha trabajado a lo largo de décadas, en la creación de sistemas de producción y control de alimentos que permita un status de higiene óptimo para el consumo seguro.

Se estima que cada año enferman por ingerir alimentos contaminados 600 millones de personas en el mundo, causando 420.000 muertes. Los niños menores de 5 años soportan un 40% de la carga atribuible a las enfermedades de transmisión alimentaria, que provocan cada año 125 000 defunciones en este grupo de edad (PAHO/OMS, 2018).

Qué controles usamos para ofrecer al consumidor alimentos “seguros”

1-Programa de prerrequisitos, Sistema APPCC

A nivel mundial los responsables de la Seguridad Alimentaria han creado a través de organizaciones gubernamentales y privadas, diferentes sistemas de control de los riesgos vinculados a la producción, tales como el **Programa de prerrequisitos, y el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC)** que permiten analizar riesgos considerados significativos y aplicar las medidas correctivas específicas con un concepto preventivo y sistemático dirigido a la prevención y control de peligros biológicos, químicos y físicos, por medio de anticipación y prevención, en lugar de inspección y pruebas en productos finales

Complementando esta actividad preventiva, se han desarrollado otros controles como son:

2-Planes de muestreo de producto terminado para la toma de decisión.

Herramienta importante de verificación de las buenas prácticas en general, son los planes de muestreo para liberación de producto final, cuyo objetivo principal es minimizar el riesgo de liberar al mercado productos que puedan haber tenido un desvío en las etapas anteriores de aseguramiento.

Considerando la calidad microbiológica, los muestreos de producto terminado constatan en gran medida el proceso productivo posterior a los PCC, en especial la contaminación cruzada o recontaminación, llevada a cabo en las líneas de almacenamiento y envasado posterior al PCC letal o cuando el producto queda expuesto al ambiente previo a su envasado primario.

Una de las recomendaciones para llevar a cabo un muestreo estadístico de los lotes de producción, entre otros, son las aportadas por organismos Internacionales como por ejemplo I.C.M.S.F. (International Commission on microbiological specifications for foods) y ha sido adoptado por la mayoría de los elaboradores y clientes.

Estos planes de muestreo, ofician principalmente como forma de verificar el cumplimiento de los sistemas de control preventivos de producción mediante detección y/o cuantificación de indicadores de higiene o Indicadores Índice patógenos.

CERTEZAS y DEBILIDADES

A pesar de este elaborado sistema de vigilancia, vemos casos en los que resultan insuficientes para determinar si un producto está 100% apto para su consumo, debido a 4 variables:

1. DEBILIDADES DEL PLAN DE MUESTREO

- Desvío en la probabilidad de muestreo
- Variabilidad por condición física de la matriz

2. RECONTAMINACIÓN

3. ADAPTABILIDAD MICROBIOLÓGICA - APTITUD PARA SOBREVIVIR A LOS PROCESOS DE CONTROL INDUSTRIAL

4. PERSONAL

1- ¿Qué debilidades puede tener un plan de muestreo?

1.1 Variabilidad en la probabilidad de muestreo

Las recomendaciones de muestreo de dos y tres clases (ejemplos clase 2: $n=5$ $c=0$, o clase 3: $n=5$ $c=2$ $m=100$ $M=1000$) se basan en los lineamientos dados por ICMSF basado en el riesgo biológico y su severidad y en la probabilidad de desarrollo o no en la matriz.

De acuerdo a ello, se hace muy difícil, hoy en día, liberar un producto con la certeza de que el plan de muestreo, por amplio que sea, va a definir la aptitud basado solo en la sensibilidad del método de muestreo, del análisis, de la probabilidad estadística de detección de un indicador o microorganismo patógeno .

1.2 Variabilidad por la condición física de la matriz.

Esta es otra variable, que debemos tener presente a la hora de la toma de muestra, ya que en matrices líquidas, la distribución microbiana siempre es homogénea, si se respetan factores como la agitación recomendada, y la toma de la/las alícuotas de muestras sean representativas.

A diferencia de esto, las matrices sólidas, pueden presentar una distribución no homogénea, presentando los puntos llamados HOT SPOTS, donde se pueden concentrar de forma muy desigual y a alta concentración los microorganismos, dejando muchos puntos (de muestreo) libres de ellos.

De esta manera, un plan de muestreo exigente puede aumentar la sensibilidad del método analítico y la probabilidad de detección, pero no será muy significativo en la medida que no logre captar adecuadamente la o las porciones de ensayo que tengan presente el patógeno.

Es claro que el muestreo, si bien es un elemento más de seguridad, necesita la certeza de una producción controlada desde el punto de vista de la higiene, ya que solo con muestreo de producto terminado, no es suficiente forma de asegurar un alimento inocuo.

Analizando la recomendación de muestreo donde se incrementa el n muestras según el riesgo de las dos variables más importantes, el riesgo en aumento de contaminación a partir del producto o el medioambiente, junto al incremento del riesgo basado en los microorganismos o sus toxinas tenemos los planes de muestreo divididos en 2 clases y en 15 casos diferentes según su evaluación.

Increasing Risk from Product or Environment			
Agent	Conditions That Decrease Risk	Conditions That Do Not Change Risk	Conditions That Increase Risk
Spoilage $n = 5$	Case 1 $c = 3$	Case 2 $c = 2$	Case 3 $c = 1$
Indicator $n = 5$	Case 4 $c = 3$	Case 5 $c = 2$	Case 6 $c = 1$
Moderate	Case 7 $n = 5, c = 2$	Case 8 $n = 5, c = 1$	Case 9 $n = 10, c = 1$
Serious $c = 0$	Case 10 $n = 5$	Case 11 $n = 10$	Case 12 $n = 20$
Severe $c = 0$	Case 13 $n = 15$	Case 14 $n = 30$	Case 15 $n = 60$

$n =$ number of samples per lot; $c =$ maximum number of samples allowed between m and M

ICMSF 2002

Tiene una característica, es finito, presenta como muestreo más exigente, $n=60$ de, por ejemplo, 25 grs = 1500 grs, en muchos casos, debe ser representativo de un lote conformado por toneladas de producto.

Esto reafirma la necesidad, al igual que el Sistema APPCC, de requerir el aseguramiento de los Prerrequisitos eficientemente instrumentados.

"Ningún plan de muestreo puede asegurar que todos los elementos de un lote sean conformes. A pesar de ello, estos planes de muestreo son útiles para lograr una calidad aceptable" Codex Alimentarius CAC/GL 50/2004.

Si bien se han tomado y se toman todos los recaudos para una producción de alimentos segura (Prerrequisitos, planes de muestreo exigentes, etc.) no se ha logrado minimizar el crecimiento de brotes alimentarios en el mundo, con las repercusiones sanitarias y económicas que ello tiene.

2- RECONTAMINACIÓN

Existen debilidades que involucran el binomio "contaminación ambiental / adaptabilidad microbiana.

Cómo actuamos sobre éstos:

Control eficiente de la contaminación ambiental e incorporar en las evaluaciones del riesgo la probabilidad de ocurrencia de la recontaminación post procesos biocida de forma más exhaustiva.

Desarrollar e incorporar aún más la investigación científica de todas las variables microbiológicas, funcionales, metabólicas, estructurales y moleculares, que posibiliten una mejor evaluación del riesgo en los equipos A.P.P.C.C., debido al constante cambio del comportamiento adaptativo microbiano.

En el 2005, la I.A.F.P. (International Association for Food Protection) organizó el Simposio Europeo de Seguridad alimentaria, en Praga, encuentro de importantes microbiólogos y especialistas en Seguridad alimentaria, donde el tema insignia del encuentro fue: Problemas de Recontaminación en las Industrias Alimentarias

En este encuentro, se destacó la importancia de la inclusión de la recontaminación ambiental en la discusión de los nuevos lineamientos de control.

Existe una clara evidencia de que dos de los más importantes microorganismos causantes de ETAs en la casuística mundial, tales como *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes*, en los procesos Industriales donde el PCC se basa en tratamiento térmico, se deben en su gran mayoría, a recontaminación ambiental, esto abarca desde un biofilm en las líneas de envasado, hasta la contaminación a partir de superficies de contacto en dosificadores o a partir de zonas contiguas.

Información de la Organización Mundial de la Salud, en un relevamiento Europeo de brotes realizado, indica que el 25% de los mismos, fueron trazados a eventos de recontaminación.

Es evidente que en las producciones donde predomina la manufactura, fraccionado, exposición mayor al ambiente de los productos, recontaminación a partir de utensilios, mesadas y manos de operarios tienen el mayor porcentaje, no así las grandes industrias, donde el principal elemento de riesgo es el biofilm generado por deficiente GHP.

Existen 3 variables importantes como rutas u orígenes de recontaminación en procesos de manufactura:

- a- Materia prima no procesada
- b- mala higiene de superficies de contacto con alimentos
- c- Personal de manufactura, practicas no higiénicas

3- ADAPTABILIDAD MICROBIOLÓGICA - APTITUD PARA SOBREVIVIR A LOS PROCESOS DE CONTROL INDUSTRIAL

Microbiología Industrial

Las bacterias, son los microorganismos más frecuentemente aislados en eventos relacionados a Enfermedades Transmitidas por Alimentos, y esto lo logran, sorteando todos los mecanismos de su control. Lo logran mediante un gran poder de adaptabilidad basado en varios mecanismos metabólicos, estructurales y moleculares, para los cuales, no todos se tienen en cuenta a nivel de los procesos Industriales.

Estos se utilizan y/o expresan ante la adversidad medioambiental, permitiéndoles la sobrevida en el ambiente productivo y/o en la matriz alimentaria.

Ciertas condiciones ambientales adversas para las bacterias, intrínsecas de la matriz o extrínsecas del medio ambiente, tales como disponibilidad de agua libre (aw) concentración de hidrogeniones, pH, tenor de Oxígeno, potencial Redox, osmolaridad, temperatura, concentración de ácidos y álcalis, desinfectantes y otros, nos han servido durante muchos años como fundamento para definir en cada uno de los rangos de desarrollo óptimo para cada grupo microbiano, los llamados "parámetros de seguridad".

En temas de Inocuidad y salud Publica, los outliers, los percentiles 5 y 95, importan, sobre todo hablando de Morbimortalidad de seres humanos.

Con el desarrollo de la biología molecular, y la inclusión en aumento de herramientas diagnósticas, junto a la interacción con el conocimiento académico y de investigación, se han detectado infinidad de mecanismos por el cual las bacterias, ante una presión de selección impuesta por diferentes noxas externas, desarrolla defensas y escudos adaptativos a través de: cambios estructurales, cambios metabólicos, cambios moleculares, ya sean mutaciones propias o defensas adquiridas mediante transferencia genética entre cepas de la misma clona o clonas relacionadas filogenéticamente.

Se puede establecer estadísticamente los rangos de crecimiento y desarrollo óptimo de grupos bacterianos, lo que no se puede, es subestimar la capacidad de adaptación de los microorganismos, resultando en brotes alimentarios que ocurren en matrices consideradas "seguras" o imposibles de desarrollar o transportar microorganismos patógenos.

Es así como se han detectado brotes alimentarios ocasionados por *Escherichia coli* O157 H7, causante de Síndrome Urémico hemolítico con Sidra en el año 2003, con pH de 2.8 a 3.0, casos de Salmonelosis ocasionados por productos desecados con 0.2% de aw, casos de Listeriosis en cremas heladas congeladas entre otros.

Si bien en estos dos últimos casos no hay generación ni duplicación bacteriana, encontramos una permanencia por meses o años en estado de dormancia hasta que se produce la rehidratación de la matriz contaminada, o el cambio de condición atmosférica, como la temperatura, o nutricional, y con ello bastó con su hidratación y salida de situación de stress, para el despliegue de todo su arsenal patogénico y virulento en poco tiempo.

Por estas razones, es esencial, conocer los mecanismos y atributos microbianos implicados, así como conocer su poder patogénico, su dosis infectiva, debemos "prevenir" y manejar mucho más eficientemente todas las

prácticas y procedimientos que eviten la permanencia de microorganismos patógenos en el entorno de producción.

Otros elementos a tener en cuenta a la hora de un análisis de riesgo, son las dosis infectivas y si se trata de un patógeno primario o secundario. El patógeno primario posee todo el arsenal de virulencia y es capaz de ocasionar enfermedad en pacientes incluso inmuno competentes a muy bajas dosis, 10 a 100 Ufc/g (*Salmonella* spp., *E. coli* verotoxigenicas, *Shigella dysenteriae*, etc.), los patógenos secundarios, necesitan una concentración en la matriz, en algunos casos mayor a 1.000.000 Ufc/g para generar 1 a 3 ug de enterotoxina en el alimento y así producir enfermedades (*Staphylococcus aureus* fagotipo II o *Bacillus cereus*, por ejemplo).

Estos últimos, poseen un riesgo extra, poder formar toxinas en procesos intermedios de la cadena (almacenamiento de producto y/o formación de Biofilm) y por ser éstas termoresistentes, sortear el PCC y generar contaminación de los alimentos y brotes alimentarios, sin haber contado una sola colonia en el producto final de esos microorganismos.

Microorganismos & ambiente

Las bacterias, microscópicas, pueden y seguro están, en aquellos lugares del ambiente de menor tránsito y de mayor contenido de nutrientes para la sobrevida: Agua y materia orgánica fuente de C, N, y P, y otros.

El diseño, el layout, los equipos, todo debe tener, fácil acceso a la limpieza y remoción, para establecer un buen sistema de saneamiento e higiene.



it”

“if you can't see it and you can't reach it, you can't clean, inspect or sample

Esto requiere equipos multidisciplinarios, por ejemplo a la hora de la compra de equipamientos o de diseño de salas de proceso, incluyendo el conocimiento microbiológico junto a Ingenieros y responsables de Seguridad Alimentaria.

En un ambiente de producción con indicadores de microorganismos patógenos presentes de forma crónica, tales como *Salmonella spp* L y/o *Listeria spp.*, es muy probable que se detecten resultados positivos, pero también es muy probable se estén liberando falsos negativos al mercado, los cuales no fueron detectados por los screening analíticos debido entre otras cosas a la probabilidad de muestreo que señalábamos con anterioridad, no detectando los patógenos en la porción de ensayo estudiada.

Atributos microbianos que se deben de tener en cuenta en los análisis de riesgo de producto y ambientales:

Estructuras con implicancia en la sobrevida y/o colonización ambiental:

Las bacterias, presentan dos grandes grupos de elementos de patogenicidad, estudiados muy bien en medicina humana, que tienen que ver con aquellos atributos que le confieren la posibilidad de evadir la respuesta inmunitaria del huésped, agrupadas bajo el término EVASINAS, y aquellas que le permiten internalizarse y generar enfermedad en el huésped, llamadas AGRESINAS.

Muchas de éstas, las utilizamos en Microbiología Industrial, para realizar diagnóstico de laboratorio, como para realizar un correcto análisis del riesgo.

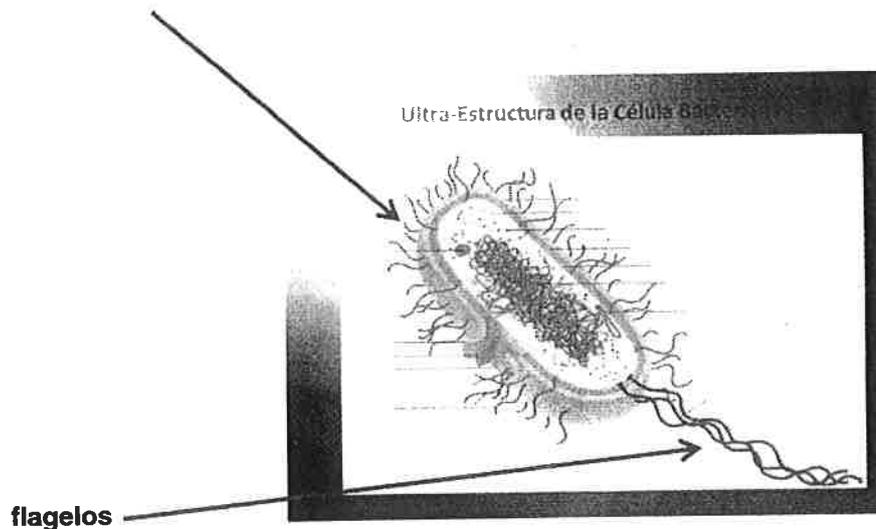
Algunos Ejemplos:

EVASINAS	AGRESINAS
<p>Enzimas / proteínas promotoras de formación de fibrina: clumping factor, Proteína A, exotoxinas (coagulasa libre).</p> <p>Polisacáridos capsulares</p> <p>Cambios en la pared (PBP)</p>	<p>Fosfolipasas</p> <p>Proteasas</p> <p>Hemolisina</p> <p>DNAasas</p> <p>Adhesinas, fimbrias</p>

ATRIBUTOS QUE FAVORECEN CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

Apéndices superficiales: Flagelos y Fimbrias (adhesinas)

Adhesinas



Flagelos: Estructuras proteínicas helicoidales que se extienden a la superficie externa, que poseen algunos grupos bacterianos, confiriendo movilidad a las mismas, provocando la dispersión de las mismas en ambiente, a través de un movimiento Browniano, en ambientes con grandes colecciones de agua en las superficies de piso y equipos favoreciendo la difusión de las mismas.

Fimbrias, adhesinas y Pilis:

También de estructura proteínica, más delgadas y cubren toda la superficie de las bacterias, no confieren movilidad, sino participan en los mecanismos de adherencia, tan importantes en la conformación de los biofilm como en superficies de contacto a material inerte con restos orgánicos, sobre todo glucídicos, tal como ralladuras o soldaduras de acero inoxidable sin terminación sanitaria, de superficie rugosa.

Esta unión, si se da en material 100% inerte, se produce por factores tales como: Fuerzas de van der Waals, reacciones hidrofóbicas, etc.)

La adherencia es lo que para algunas contaminaciones de las líneas de producción, sobre todo producidas por Gram negativos, es la responsable de fracasos de higiene, ya que son frecuentes, las limpiezas de equipos que no cuentan con un diseño sanitario, lavados por arrastre dado su poca

accesibilidad, que permita el lavado energético de piezas y superficies internas como lo es con la remoción mecánica de estas colonias bacterianas.

Los microorganismos Gram positivos también presentan filamentos que de una forma u otra colaboran en la adherencia microbiana.

TABLA 1. Principales adhesinas de diversos microorganismos

Microorganismo	Adhesina
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ácido teicoico MSCRAMM FnBPA Cna ClfA Ebps Proteína adherencia extracelular Bap
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AtIE Ácido teicoico MSCRAMM Fbe (SdrG) Embp SSP-1 y SSP-2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pili tipo IV CupA, B y C Flagelo
<i>Escherichia coli</i>	Fimbria tipo 1 Curli Flagelo

MSCRAMM: *Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules.*

Staphylococcus aureus por ejemplo, entre otros factores de unión, tienen unas adhesinas para formar el slime (biofilms más delgado y débil generado por la mayoría de los Gram positivos) conformando el complejo de adhesinas de proteínas llamado MSCRAMM (*Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*).

Cuando hablamos de estos factores de adherencia, en general, nos referimos a patógenos que hacen de este atributo, su forma de resistir los efectos mecánicos de arrastre y se instalan, como es en el caso del huésped, para poder actuar con otros mecanismos patogénicos que poseen.

Salmonella spp., y *Escherichia coli*, dentro de los Gram negativos, así como *Listeria monocytogenes*, dentro de los Gram positivos, han sido los más estudiados en la academia como actores importantes de contaminaciones Industriales.

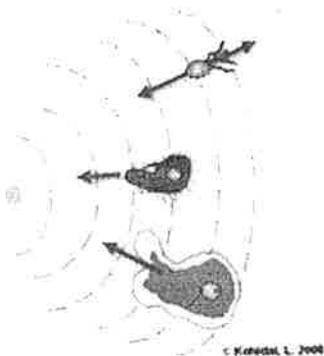
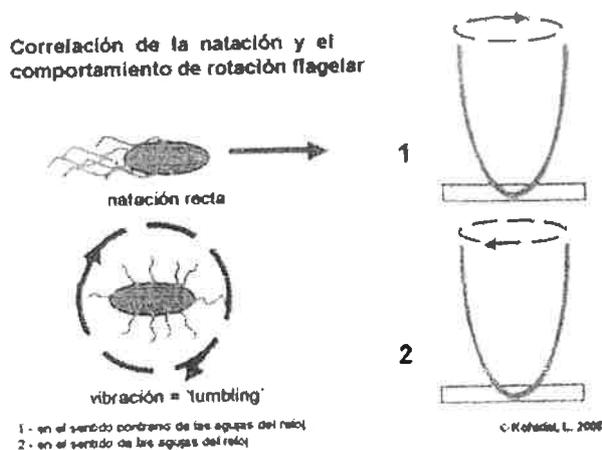
Investigaciones han confirmado la habilidad de *Salmonella spp.* para colonizar diferentes superficies de contacto inertes formando biofilm y constituyendo el principal reservorio o nicho desde donde se produce la principal fuente de contaminación de alimentos. (Bonafonte et al, 2000, Hood & Zottola 1997, Joseph, Otta & Karunasag 2001).

Quimiotaxis

La quimiotaxis es un fenómeno químico que presentan ciertas bacterias que cuentan con flagelos de movimiento, y por gradientes de concentración, se mueven hacia un lado u otro dependiendo si es en búsqueda de compuesto orgánico, como glucosa, o evadiendo de desinfectantes u otros productos químicos como forma de sobrevivir.

La movilidad requiere de una señal de transducción recibida por receptores de membrana que identifiquen gradientes químicos, llamados "methyl accepting chemotaxis proteins" (proteínas quimiotácticas que aceptan grupos metilo) (MCPs).

Correlación de la natación y el comportamiento de rotación flagelar



Nota: El atributo de la quimiotaxis hace que debamos tenerlo presente a la hora de los procesos de limpieza y enjuague, ya que ambientes con mucho depósito de agua en las superficies, permiten la difusión y extensión de los microorganismos móviles en el ambiente y/o equipos de envasado.

Polisacáridos capsulares

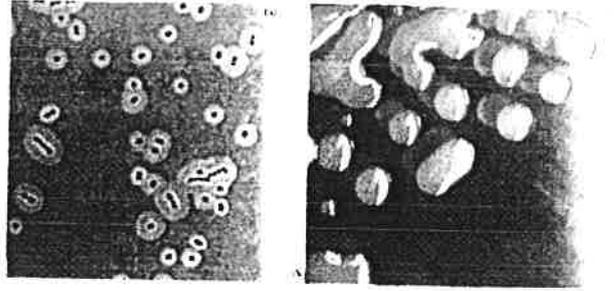
Otro de los atributos microbianos, es la formación de polímeros, polisacáridos conformando un verdadero escudo de protección, junto a otros componentes, como mureína, y alginato.

Existen también cápsulas de polipéptidos y proteínas, además de carbohidratos que si bien forman parte de las llamadas "Evasinas" precisamente para evadir el sistema inmunitario y celular del huésped, en el ambiente, colabora y mucho en la protección externa, junto con la mureína segregada por algunas especies, en la conformación de Biofilm, evadiendo el accionar de detergentes y desinfectantes.

El apoyo del laboratorio de alimentos cuando se dan contaminaciones en líneas de producto, puede predecir la existencia de un Biofilm cuando observa en el material contaminado abundante desarrollo de colonias mucosas, elemento de adhesión y resistencia a desinfectantes.

El estudio de las contaminaciones de producto, en subprocesos mediante hisopados o a partir de producto terminado, es de gran ayuda haciendo diagnósticos fenotípicos y bioquímicos de flora predominante, determinando Género o especie, el origen de la contaminación, si tiene la facultad de esporular o no, de forma cápsula o no, etc.

Características fenotípicas macroscópicas y microscópicas de bacterias con cápsula:



Adhesión y formación de Polisacáridos, son dos de los atributos más importantes en la génesis de los Biofilm, principal causa de contaminación en ambiente y líneas de producción industrial.

Biofilm

Se ha demostrado formación de Biofilm en superficies inertes, en acero inoxidable (Kusumaningun et al, 2003) y en gomas y poliuretano (Chia, Goulter, 2009).

Existen situaciones favorecedoras de formación de biofilm en las caras internas de líneas de producción tales como:

a-Superficies rugosas (juntas, soldaduras no pulidas, plásticos o ductos corroídos).

b-Sistemas de lavado CIP:

c-Importante un diseño en línea sin la generación de fondos de saco o zonas de estancamiento.

d-trayectos cortos de lavado, no lineales por muchos metros, ya que la velocidad de flujo del detergente o removedor de suciedad es 0 m/s contra la pared, se debe lograr flujo turbulento en toda la línea, para genere una mayor eficiencia de remoción y penetren los detergentes y desinfectantes.

A partir de un nicho, se produce una constante transferencia de microorganismos de éste al ambiente, se puede observar, en un estudio en playa de faena porcina, que si bien el primer desprendimiento de bacterias es importante cuando comienza la producción, existe un efecto dilución, aunque cada vez en menor cantidad, se mantiene la constante contaminación del patógeno al producto.

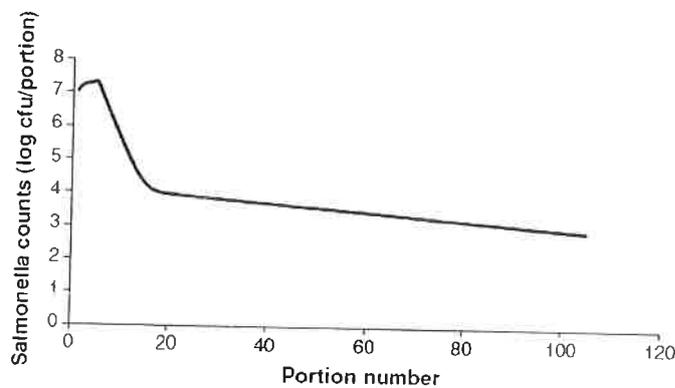
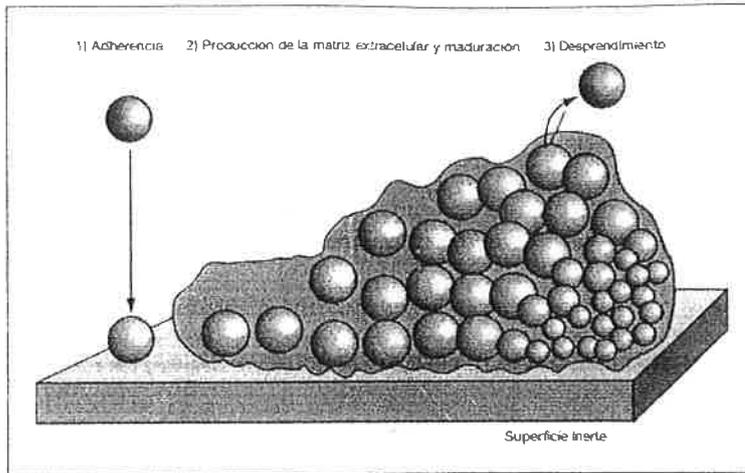


Fig. 1. Transfer model 5 parameters of *Salmonella* Typhimurium DT104 during grinding of pork slices.

Esquema simplificado de los pasos de un Biofilm para adherir, crecer y contaminar



Fuente: Jordi Vilaa, Alex Soriano y José Mens

Biofilm es un complejo ecosistema microbiano, formado por una o varias especies de microorganismos inmersos en una matriz extracelular y productos orgánicos dentro de sus componentes básicos, dependiendo del ambiente y del tipo de proceso industrial que se desarrolle, así como de las colonias que lo colonicen.

Según la composición bacteriana, puede tener muchas especies involucradas, ventaja que promueve una fuerte adhesión a la superficie, o una débil adhesión, por microorganismos con una escasa o ausente presencia de fimbrias.

Los biofilms con mayor variedad de especies en su matriz, logran formas de resistencia mayor a ciertos desinfectantes, como a los amonios cuaternarios u otros biocidas (Meyer 2005)

La microbiota de cada biofilm, y su desarrollo y permanencia, estará condicionada por aquellos microorganismos que tenga las características de resistencia desarrollo nutricional y atmosférico donde se forme el mismo, dependiendo de sus necesidades atmosféricas (tenor de O₂, aerobiosis o anaerobiosis, temperaturas de desarrollo), donde predominarán microorganismos psicrótrofos, mesófilos, termófilos, etc, según las condiciones ambientales de la matriz.

Si bien hay estudios de cada uno de los microorganismos que preocupan a elaboradores por su alta incidencia en brotes alimentarios (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp, patotipos de *Escherichia coli* y *Staphylococcus coagulasa* positivo, entre otros, daremos el ejemplo de *Listeria monocytogenes*, por su importancia en morbimortalidad mundial.

Listeria monocytogenes:

Los Biofilms formados por éste microorganismo está compuesto mayormente por ácido teicoico sumado a polisacáridos extracelulares y proteínas. Posee un gran poder de adhesión mediado por fimbrias, y flagelos lo que le permite extenderse en las superficies, dado su movilidad.

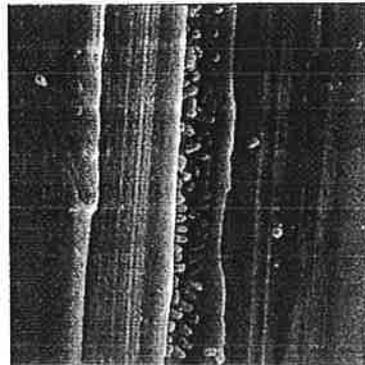
Es un microorganismo psicrótrofo, con gran poder de duplicación en temperaturas de refrigeración, a 7° C puede llegar a multiplicarse por 5 generaciones, de acuerdo a modelos de simulación de desarrollo microbiológico, y éste poder, sumado a la adhesión, puede ser un importante colonizador en tanques de almacenamiento.

Además, una característica que lo hace perdurar por más tiempo en un biofilm, sobre todo en la matriz profunda, es ser un microorganismos microaerófilo, desarrolla con tensiones de Oxígeno bajas.

El Biofilm le confiere resistencia a tratamientos superiores a 60°C, lo que lo hace más difícil erradicar con sistemas de lavado CIP.

Posee una batería de genes que codifican para la movilidad (fliQ, FliA, fli1, MotA) además de otros reguladores de éstos, y el movimiento desplegado por éste, es una condición que favorece la formación del biofilm, por la difusión en superficies de contacto y suelos (Alonso et al 2014).

Listeria monocytogenes adherida a ralladura de superficie de acero inoxidable



3.1 Esporulación

Existen Géneros bacterianos, tales como *Bacillus spp.* y *Clostridium spp.* que poseen la facultad de formar esporas, formas metabólicamente inertes que posibilitan a este grupo de bacterias una forma de resistencia a condiciones adversas de vida

Este mecanismo, puede generar contaminaciones de producto terminado por ser muchas de las esporas resistentes a las temperaturas de tratamiento que constituyen los PCC.

En este último caso, es importante conocer la calidad de las materias primas así como realizar estudios de cinética bacteriana que contemple la destrucción de dichas esporas.

Dentro de los patógenos conocidos, tenemos por parte de las bacterias aerobias mesófilas del Género *Bacillus* spp., a *Bacillus cereus*, enterotoxigénico, y dentro de los bacilos Gram negativos anaerobios, del Género *Clostridium*: *C. perfringens*, y *C. botulinum*, entre otros, como principales causantes de brotes en la casuística mundial.

3.2 Mecanismos Moleculares de Resistencia.

Reseña de herramientas moleculares adaptativas

3.2.1 Resistencia al ácido. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes, posee una serie de mecanismos que le permiten adaptarse y contrarrestar los tratamientos de ambiente con ácidos, así como permanencia en alimentos ácidos con pH menores a 5. Un mecanismo empleado por *L. monocytogenes* para la supervivencia a pH bajo es la respuesta adaptativa de tolerancia al ácido (ATR) en la que un corto período de adaptación a un pH no letal induce cambios metabólicos que permiten al organismo sobrevivir a un pH bajo.

La superación de las condiciones ácidas por *L. monocytogenes* implica una variedad de respuestas regulatorias, como por ejemplo los componentes del regulón σ (sigma B), los cambios en la fluidez de la membrana, la bomba de protones F₀F₁-ATPasa y al menos 2 sistemas enzimáticos que regulan la concentración interna de iones de hidrógeno (glutamato decarboxilasa y arginina deaminasa).

No está claro si estos mecanismos ejercen sus efectos protectores por separado o en conjunto, pero es probable que estos mecanismos se complementen.

Existen estudios que indican que el sistema glutamato decarboxilasa puede proteger a *L. monocytogenes* cuando el organismo está presente en jugos ácidos, yogurt, aderezos para ensaladas, mayonesa y atmósferas de CO₂ modificadas. El sistema glutamato decarboxilasa también tiene un papel en la protección de *L. monocytogenes* contra el ambiente ácido del estómago (Smith JL, Liu Y, Paolo GC. Can.J. Microbiol. Mar 2013).

El sistema Sigma B, en *Listeria monocytogenes*, está formado por subunidades de ARN polimerasa responsables de promover sitios de secuencias particulares de DNA.

Este promotor reconocido por la polimerasa se activa en situaciones que se pierde la homeostasis intracelular basal, generando mecanismos adaptativos como respuesta, ya sea a stress oxidativo, ambiente ácido o carencia de fuente de carbono (Nurcay Kocaman et al., 2016).

Este es un tema no menor y preocupante, porque la presión de selección que determina un tratamiento con ácido (cítrico, aspártico, etc.) a concentraciones subletales (provocado por uso a menor concentración a la indicada, o ambientes con grandes acúmulos de agua en las superficies), tiene un efecto doblemente negativo, ya que *Listeria monocytogenes* generará los mecanismos de sobrevivencia, perdurará más en el tiempo en ambientes de producción con el riesgo potencial de contaminación cruzada, sino que de ocurrir un brote, algunas de éstas cepas, poseerán un nuevo mecanismo de virulencia, la resistencia al ácido, esta clona será ácido resistente y sorteará uno de los principales mecanismos de defensa que tiene el organismo de los seres humanos para evitar la colonización de bacterias patógenas, que es, después de la lisozima salival, el jugo gástrico con bajo pH.

3.2.2 Osmotolerancia (bajo aw)

Existen en algunas especies, diferentes mecanismos genéticos, en general transferibles a través de plásmidos, que regulan la osmolaridad interna de los microorganismos para poder resistir condiciones adversas medioambientales o propias de la matriz, como es el bajo tenor de agua disponible para el desarrollo y/o la sobrevivencia microbiana.

Algunas clonas bacterianas responden a la osmolalidad elevada mediante la acumulación de moléculas de bajo peso molecular, conocidas como solutos compatibles u Osmolitos (debido a su compatibilidad con la fisiología normal de las células a altas concentraciones internas).

Un ejemplo es el patógeno neonatal *Cronobacter sakazakii*, es osmotolerante y sobrevive en ambientes y productos desecados como por ejemplo las fórmulas infantiles para lactantes, cuya actividad de agua (aw) es de 0.2 - inhóspita para la mayoría de los microorganismos.

Existen varios trabajos publicados de *Conobacter spp.* que estudian estos aspectos, como por ejemplo el publicado por A. Feeney, C. Johnston, R. Govender, J.O'Mahony, A. Coffey, y R.D Sleator, analizando el genoma de *C. sakazakii* BAA-894 que reveló siete copias del sistema de captación de osmolitos ProP. Cuyo componente principal es la Prolina.

Este uso de moléculas pequeñas para imitar estructuralmente solutos compatibles, podría ser una alternativa viable a los antibióticos para el control de este patógeno en alimentos de alto riesgo como la fórmula infantil en polvo.

Otros trabajos realizados, en este caso con *Listeria monocytogenes*, demuestran su capacidad para sobrevivir e incluso proliferar bajo una variedad de condiciones ambientales hostiles, particularmente osmolaridad elevada (10% de NaCl) y temperatura reducida (-0.1 ° C) Según los autores del trabajo, esta adaptación resulta, al menos en parte, de la acumulación de similares moléculas de bajo peso, o solutos compatibles, debido a su compatibilidad con procesos celulares vitales a altas concentraciones internas, tales como betaína, carnitina y prolina.

Otro trabajo, demostró bajo el efecto del proceso de salmuera en productos lácteos con *Listeria monocytogenes*, la presencia de proteínas de adaptación al stress osmótico (Nurcay Kocaman, 2016).

También existen otras estrategias de *Listeria monocytogenes*, desarrollando sistemas de transporte transmembrana, para incorporar en su citoplasma Glicina, Betaina y Cisteina, incorporación ésta importante en el desarrollo de *Listeria monocytogenes* bajo el stress osmótico.

Estos sistemas actúan mediante bombas de eflujo transmembrana

4- PERSONAL OPERATIVO DE PRIMERA LÍNEA

Primer día de clase en el Instituto de Normas Técnicas, hace 20 años me dijeron:

“La calidad la hace la gente”

Si bien existen protocolos, sistemas de operaciones, manuales, Normas, registros de las evidencias de todas las acciones tomadas por los funcionarios, depende de ellos su ejecución.

No es un tema menor, considero es “él tema” que debe preocupar a las Organizaciones, y se debe trabajar todos los días en el el involucramiento del personal, solamente generando sentimiento de pertenencia, capacitando al personal, motivando e involucrado en las acciones de mejora, se puede generar un producto de calidad excelente e inocuo.

Referencias:

- **CODEX ALIMENTARIUS. Principio generales de la higiene de los alimentos** CAC/RCP 1-1969
- **International Association for Food Production – “Recontamination Issues in Food Industries”** - European Symposium on Food Safety- Prague. Czech Republic 2005
- **The importance of recontamination as a cause of incidents – Status vs Affairs** Jean Louis Cordier, Quality & Safety Nestlé Nutrition Operations. Vevey, Switzerland IAFP 2005
- **Principles of microbiological testing: Statistical basis of testing: Statistical basis of sampling.** M. Cole, 2005.
- **Microorganisms in foods 8.** International Commission on Microbiological Specifications for foods.
- **Microbiological sampling plans – Statistical aspects,** S. Dahms , Berlin , Germany
- **Overview : Recontamination Events in the Food Industry** – Jenny Scott, Vice President – Food Safety Program – Food Products Association , Washington , DC - IAFP 2005
- **Routes and Sources of recontamination in Operational Practice** – R. B. Tompkin , Food Safety Consultant, USA and L. Gram , Danish Institute for Fisheries Research , Denmark IAFP 2005
- **Risk Ranking Across Recontaminations Vectors in RTE Food Factories.** John Holand and Debra Smith, Food Hygiene Department, Campden & Cholewood Food Research Association. UK- IAFP 2005
- **Review: Recontamination as a source of Pathogens in processed Foods-** M.W.Reij , ED Den Aantrekker . ILSI Europe Risk Analysis in Microbiology Task Force. Netherlands mayo 2003
- **Cross-contamination and recontamination by Salmonella in foods : A review** Elena Carrasco, Andrés Morales – Rueda, Rosa maría García – Gimeno Department of Food Science and Technology , University of Cordoba, Spain
- **Bacterial Contamination in the Environmental of Food Factories Processing Ready – to-Eat Fresh Vegetables.** Ken Ichi Kaneko, Hideki Hsayashidani, Koki Takahashi , Yasuo Shiraki- Department of Veterinay Medicine, Faculty of Agriculture . Tokyo Japan.
- **Microbial Ecology of Foods.** Factors Affecting Life and Death of Microorganism. International Commission on Microbiological Specification for Foods.
- **Diagnostic Microbiology.** Fifth Edition. E. Koneman, S. Allen, W. Janda, Paul C. Schreckenberger
- **The Importance of Hygienic Zoning to Prevent Product Contamination.**
 1. Grocery Manufacturers Association. 2010. Facility Design Checklist.
 2. European Hygienic Engineering & Design Group. Hygienic Design Principles for Food Factories (VDMA Verlag, 2014)
- **Standard Methods for the examinations of Dairy Products.** 17th Ed. Michael Wehr. PHD Joseph F. Frank, PHD
- **Microorganisms in Food – Chapter 3- Verifications of Process Control**
- **Chapter 4- Verifications of Environmental Control.**
- **Chapter 5: Corrective Actions to Reestablish Control.** HACCP. GHP
- **International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) Volumen 8.**

- **Compendium of methods for the Microbiological Examinations of Foods-** Fourth edition American Public Health Associations
- **Microbial Technology. Microbial Process.** Pepper & Prlman – Academic Press
- **Desinfections, Sterilizations and Preservations.** Seymour S. Block
- **All over the Map.** A 10-years Review of State Outbreaks reporting. Center for science in the public Interest USA (1998 al 2007).
- **Handbook of Hygiene Control in the food industries.** H.L.M. Lelieved, M. A. Mostert and J. Holah. CRC New York .USA / Woodhead Publishing Limited, Cambridge England
- **Control of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Food. Guidance for Industry – Draft Guidance** .US Department of Health and Human services. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. January 2017
- **Biofilms in the food Industry: Health Aspects and Control methods.** Serena Gallé, Coral García Gutierrez, Elisa Miguelez, Claudio Villar y Felipe Lombó. Research Group BIONUC (Biotechnology of Nutraceuticals and Bioactive Compounds) Mayo 2018
- **Role of *Listeria monocytogenes* sigma(B) in survival of lethal acidic conditions and in the acquired acid tolerance response.**
- Ferreira A, Sue D, O`Byrne, Boor KJ.
- **How does *Listeria monocytogenes* combat acid conditions?** Smith JL. Liu Y, Paolo GC. Can.J. Microbiol. Mar 2013
- **Analysis of the role of the *Cronobacter sakazakii* ProP homologues in osmotolerance** PUBMED Audrey Feeney, Christopher D Johnston, Rodney Govender, Jim O`Mahony, Aidan Coffey and Roy D Sleator
- **A Postgenomic Appraisal of Osmotolerance in *Listeria monocytogenes***
- Roy D. Sleator, Cormac G. M. Gahan, Colin Hill – **Applied and Environmental Microbiology** 2003
- **Review “Stress responses of *Listeria monocytogenes*”** Nurcay Kocaman Department of food hygiene and technology. Ankara .Turkey 2016
- **Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach**, Second Edition By Abigail A. Salyers and Dixie D. Whitt Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 2001.
- **Identification of Components of the Sigma B Regulon in *Listeria monocytogenes* That Contribute to Acid and Salt Tolerance.** F. Karatzas, K. Matlawska, A. Boyd, M. Wiedmann, J. Boor, and P. O`Byne.