

**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Facultat de Veterinària**

**Departament de Ciència animal i dels aliments**

**2005**

**Desarrollo y aplicación de sensores para evaluar la  
contaminación microbiológica de superficies domésticas  
españolas y de la efectividad desinfectante *in situ* de productos  
limpiadores comerciales.**

Tesis que presenta el licenciado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

**Fabián González Rivas**

Para optar al Grado de Doctor

## **Dedico este trabajo**

A todo aquel que le interese y pueda sacar algún provecho del esfuerzo y resultados que contiene.

## **Agradezco:**

Quiero agradecer muy especialmente a mi director, el Dr. José Juan Rodríguez Jerez, por toda la dedicación que ha mostrado tanto para la elaboración de este trabajo como para mi formación como investigador.

A Bibi por compartir tantas alegrías y penas conmigo.

A Manoli, porque siempre ha tenido una buena solución para mis dudas.

A Dolores, mi gran aliada en los momentos en los que el material escaseaba más que la comida en la posguerra y con la que he compartido tantas horas de radio.

A la radio, que tanto me ha acompañado, entretenido y enseñado durante los largos ratos de trabajo en el laboratorio, sin la cual el trabajo dejaría de ser un placer para convertirse en una condena.

A todos mis compañeros, con los que tantas horas de laboratorio y despacho he compartido y que siempre han hecho más llevadero el trabajo.

A Alberto por acompañarme en la vida.

Y por supuesto, a mis padres, por ser quien son y por todo el apoyo tanto moral como económico que han otorgado para mi formación como persona y especialmente para la realización de este trabajo.

**JOSÉ JUAN RODRÍGUEZ JEREZ**, PROFESOR TITULAR DEL  
DEPARTAMENTO DE CIENCIA ANIMAL Y DE LOS ALIMENTOS,  
FACULTAD DE VETERINARIA, DE LA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE BARCELONA.

INFORMAN:

Que la Tesis Doctoral titulada: “**Desarrollo y aplicación de sensores para evaluar la contaminación microbiológica de superficies domésticas españolas y de la efectividad desinfectante *in situ* de productos limpiadores comerciales.**”, de la que es autor FABIÁN GONZÁLEZ RIVAS, ha sido realizada bajo mi dirección durante los años 2000 a 2004 y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en

Bellaterra, a 25 de Enero de 2004

José Juan Rodríguez Jerez.

---

<b>1.- INTRODUCCIÓN</b> .....	7
<b>2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	9
2.1.- Grupos bacterianos .....	9
2.2.- Biofilms .....	12
2.2.1.- Formación de Biofilms .....	12
2.2.1.1.- Factores que afectan a la unión microbiológica a superficies inertes .....	13
2.2.1.2.- Propiedades de las superficies de contacto .....	14
2.2.1.3.- Propiedades adhesivas de las superficies de las células bacterianas .....	15
2.2.2.- Evolución y maduración del biofilm .....	16
2.2.3.- Patógenos, alterantes y biofilms .....	17
2.2.3.1.- <i>Listeria monocytogenes</i> .....	19
2.2.3.2.- <i>Salmonella spp.</i> .....	19
2.2.3.3.- <i>Escherichia coli</i> .....	21
2.2.3.4.- <i>Pseudomonas spp.</i> .....	21
2.2.3.5.- <i>Bacillus spp.</i> .....	22
2.2.3.6.- <i>Campylobacter</i> .....	22
2.2.3.7.- <i>Staphylococcus aureus</i> .....	22
2.3.- Procedimientos de higiene aplicables en el hogar y su efectividad .....	23
2.3.1.- El consumidor y la seguridad alimentaria .....	24
2.3.2.- Limpieza y desinfección como método de garantizar la seguridad alimentaria .....	26
2.3.3.- Limpieza e higiene .....	30
2.3.4.- Desinfectantes químicos e higiene .....	31
2.3.5.- El secado de superficies como forma de descontaminación .....	33
2.3.6.- Limpieza y desinfección regular como método de evitar la aparición de biofilms .....	35
2.4.- Superficies de contacto con las manos y alimentos .....	35
2.4.1.- Procedimientos de higiene para superficies de manos y alimentos .....	37
2.4.1.1.- Limpieza y desinfección combinando detergente y desinfectante .....	38
2.5.- Estudios para determinar la eficacia de la higienización de superficies .....	38
2.5.1.- Tablas de cortar .....	40
2.6.- Reservorios / Diseminadores: utensilios de limpieza domésticos .....	44
2.6.1.- Procedimientos de higiene para los utensilios de limpieza .....	46
2.6.2.- Estudios en el ámbito doméstico para evaluar la efectividad de los procedimientos de higiene para prevenir la contaminación cruzada vía telas de limpieza .....	47
2.7.- Zonas reservorio .....	48
2.7.1.- Estudios de laboratorio y en el hogar para medir la efectividad de los procedimientos de higiene en el lavabo .....	50
2.7.1.1.- Toma de muestras .....	51
2.8.- Suelos, paredes y otras superficies del hogar .....	51
2.9.- Detergentes y desinfectantes .....	53
2.9.1.- Detergentes .....	53
2.9.2.- Desinfectantes .....	53
2.10.- Objetivos .....	56

---

<b>3.- MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	57
3.1.- Sensores .....	57
3.2.- Preparación de los sensores .....	57
3.3.- Distribución .....	59
3.4.- Codificación de los discos .....	60
3.5.- Medios de cultivo .....	61
3.5.1.- VRBG “Violet Red Bile Glucose” .....	61
3.5.1.1.- Fórmula en gramos / litro .....	62
3.5.1.2.- Principio .....	62
3.5.1.3.- Preparación .....	62
3.5.2.- Baird-Parker con RPF .....	62
3.5.2.1.- Fórmula en gramos / litro .....	63
3.5.2.2.- Principio .....	63
3.5.2.3.- Preparación .....	64
3.6.- Recuentos .....	64
3.7.- Estadística y aislamiento .....	66
3.8.- Metodología de aislamiento .....	67
3.8.1.- Enterobacterias .....	67
3.8.2.- Bacterias crecidas en medio de cultivo Baird-Parker .....	68
3.8.3.- Biofilms .....	69
3.9.- Identificación (Mini-Api) .....	70
3.10.- Limpiadores .....	71
3.11.- Diseño estadístico .....	73
<b>4.- RESULTADOS</b> .....	74
4.1.- Recuento de microorganismos en viviendas .....	74
4.2.- Identificación y comparación de frecuencias de los microorganismos aislados en las viviendas .....	90
4.3.- Estudio de efectividad de desinfectantes .....	101
<b>5.- DISCUSIÓN</b> .....	117
5.1.- Estudio casas .....	117
5.2.- Identificaciones .....	122
5.3.- Estudio desinfectantes .....	127
<b>6.- CONCLUSIONES</b> .....	133
<b>7.- PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS</b> .....	137
<b>8.- BIBLIOGRAFÍA</b> .....	144
<b>9.- RESUMEN TESIS</b> .....	189

## 1. INTRODUCCIÓN.

La enfermedad resultante de un brote alimentario (definida como “una enfermedad de naturaleza infecciosa o tóxica causada por el consumo de alimentos o agua (Anónimo, 2001 b)) se ha convertido en uno de los mayores problemas de salud pública en el mundo actual (Jermini, 1999; Motarjemi y Kaferstein, 1997).

Es de temer que durante los primeros decenios del siglo XXI aumenten los casos de enfermedades de transmisión alimentaria, en parte debido a cambios ambientales y demográficos, entre los que cabe incluir desde cambios climáticos, hasta la disminución de las reservas de agua dulce, pasando por las modificaciones de los sistemas microbianos y otros ecosistemas o el envejecimiento poblacional. (Käferstein y Abdussalam, 1999).

Las infecciones e intoxicaciones de origen alimentario figuran en destacado lugar entre las nuevas enfermedades e infecciones descubiertas en los últimos decenios. Comprenden, en particular, la campylobacteriosis, las infecciones por *Cyclosporidium*, *Cyclospora* y *E. coli* enterohemorrágica, y la listeriosis. Existen además nuevas cepas de *Vibrio cholerae* y cepas farmacorresistentes de varios agentes patógenos entéricos, en particular *Salmonella* y, posiblemente, *Helicobacter pylori*. Así mismo, cabe prever que en este siglo aparecerán nuevas enfermedades de origen alimentario. (Käferstein y Abdussalam, 1999).

Los organismos patógenos y no patógenos se introducen continuamente en el hogar por personas, alimentos, agua, animales de compañía, insectos y a veces por el aire (Bloomfield, 2001).

Se estima que 130 millones de Europeos (Anónimo, 2000 b), 76 millones de americanos (Mead y cols., 1999) y 4.2 millones de australianos (Anónimo, 1999 b) sean afectados de episodios de toxiinfecciones alimentarias y enfermedades asociadas a alimentos anualmente.

Las enfermedades alimentarias han re-emergido en los Estados Unidos como una de las principales preocupaciones en la salud pública. Según estimaciones, alrededor de 76 millones de casos, 325.000 de hospitalizaciones y 5000 muertes ocurren durante un año en los Estados Unidos debido a los alimentos (Mead y cols., 1999). En 1998, en los Estados Unidos, se estimó que 76 millones de personas sufrieron una toxiinfección alimentaria (Anónimo, 2000 a).

La gente tiende a asociar un mayor riesgo con situaciones y circunstancias que controlan otros, como comer en restaurantes, más que situaciones donde ellos pueden controlar como preparar comida en casa (Yeung y Morris, 2001), a pesar de que los estudios observacionales sugieren que un número sustancial de consumidores frecuentemente tienen conductas de riesgo a la hora de preparar alimentos (Redmond y Griffith, 2003). Y aunque según Zhao y cols. (1998) la proporción actual de toxiinfecciones alimentarias originadas en casa es sospechosa de ser mucho mayor de lo que se tiene registrado. Diversos estudios señalan que en casa se producen más toxiinfecciones que en el total de las otras fuentes de toxiinfección (Hilton y Austin, 2000; Anónimo, 1998 a).

Estudios del Reino Unido, Holanda, España e Italia sugieren que entre el 50-80% de las infecciones por *Salmonella* y *Campylobacter* se producen en el hogar (Sheard, 1986; Hoogengboom-Verdegaal y Postema, 1990; Scuderi y cols., 1996).

La importancia del hogar como punto de origen para las toxiinfecciones alimentarias ha propiciado estudios para evaluar aspectos de la contaminación bacteriana en el entorno doméstico. Así, se ha estudiado, la persistencia de microorganismos, presencia y densidad de patógenos y la potencial extensión de contaminantes microbianos desde los alimentos contaminados (Griffith, 2001).

Además, una cantidad considerable de alimentos se preparan y manipulan en el entorno doméstico. Por tanto, según Kaferstein (1997), la investigación y la educación entorno al riesgo que supone la manipulación insegura de alimentos es un elemento esencial en la prevención de las toxiinfecciones alimentarias.

Deberían evaluarse el conocimiento de la frecuencia de aparición de patógenos y potenciales patógenos en reservorios, diseminadores y superficies de contacto de manos y alimentos, junto con el potencial de transmisión entre el hogar los riesgos de exposición pueden (Bloomfield, 2003).

En el desarrollo de una higiene efectiva en el hogar, el estudio cuantitativo de las bacterias presente en las manos y otras superficies permite evaluar los riesgos de las bacterias residuales y la eficacia de diferentes procesos de limpieza y limpieza y desinfección para ser estudiados y comparados (Cogan y cols., 2002).

Esta información podría ser utilizada para diseñar procedimientos de higiene efectivos que impliquen limpieza y desinfección de manera adecuada en esas áreas con la finalidad de reducir los riesgos de contaminación cruzada (Bloomfield, 2003).

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.**

### **2.1. Grupos bacterianos.**

Según Scott y Bloomfield (1993) una superficie que supere el recuento de  $10^2$  ufc/cm<sup>2</sup> tiene una contaminación elevada, ya sean únicamente bacterias de origen entérico o con otras bacterias potencialmente patógenas. Sin embargo Ak y cols. (1994), en otro estudio, consideraron como elevados los recuentos que superaban  $3.9 \cdot 10^2$  ufc/cm<sup>2</sup> de mesófilos aerobios.

La evaluación microbiológica de las áreas seleccionadas de cocinas y de las manos de los manipuladores se sugirió como una herramienta para obtener información adicional de cara a reducir las intoxicaciones alimentarias (Tebbutt, 1991 a; Tebbutt y Soutwell, 1989).

Además, se ha observado que los consumidores descuidan su papel en la prevención de toxiinfecciones alimentarias (Anónimo b, 2001). Así, la mayoría de los consumidores fallan al reconocer el riesgo y los mecanismos del crecimiento bacteriano y la contaminación asociada con las toxiinfecciones alimentarias. (Kaferstein, 1997; Anónimo b, 2001).

Por otra parte, el recuento de enterobacterias supone la monitorización de la calidad del procesado de alimentos, donde su elevado número se relaciona con problemas de higiene y seguridad (Mossel, 1975; Mossel y cols., 1979). Su detección, en elevado número, indica un inadecuado procesado o una recontaminación después del procesado (Mossel, 1978).

Scott y cols. (1982) encontraron que las enterobacterias se hallaban muy frecuentemente en lugares húmedos donde solían estar en números muy elevados y eran el grupo predominante.

La familia *Enterobacteriaceae* es importante en la industria de la alimentación porque incluye (Zeitoun y cols., 1994):

- i) Patógenos intestinales.
- ii) Los más importantes indicadores de higiene, higienización y seguridad alimentaria.
- iii) Algunos de los más importantes agentes alterantes de alimentos.

Según Mossel y cols. (1995) el recuento de un grupo bacteriano más amplio, como es el de las enterobacterias sería más interesante que el de los coliformes, que es más limitado y proporcionaría una mejor evaluación del producto. Por ejemplo, especies como *Salmonella* o *Yersinia*, la mayoría de

las cuales son incapaces de fermentar la lactosa, quedarían excluidas con un análisis estándar de coliformes pero serían detectadas con uno de enterobacterias.

Los estudios microbiológicos en las cocinas domésticas han encontrado contaminación significativa con una variedad de contaminantes bacterianos, incluido coliformes fecales, *Escherichia coli*, *Campylobacter* y *Salmonella* (Josephson y cols., 1997).

Rusin y cols. (1998) encontraron que el entorno de la cocina estaba mucho más contaminado con coliformes fecales y totales que el lavabo, lo que sugiere la extensión del riesgo en el hogar es sumamente mayor en esta zona.

Otro grupo a tener en cuenta es el de las pseudomonadáceas, que, al igual que las enterobacterias, no sobreviven bien en ausencia de humedad. Sin embargo, en los hogares se han encontrado estos organismos con más frecuencia en sitios secos que en húmedos. Esto podría reflejar su naturaleza oportunista, que les permite colonizar sitios de muy difícil crecimiento para otras Gram negativas (Scott y cols., 1982).

Se debe tener en cuenta que un pequeño número de microorganismos tipo *E. coli* o *S. aureus* pueden proliferar y tornarse peligrosos si llegan a un alimento (Scott y cols., 1982).

Según Roels y cols. (1997) la presencia de estas bacterias entéricas en el fregadero lavamanos y en el tirador de la nevera y congelador indica un riesgo potencial de contaminación del material de alimentación si los manipuladores son portadores o están infectados con patógenos entéricos.

## **2.2. Biofilms.**

### **2.2.1. Formación de biofilms.**

La adhesión de bacterias patógenas a superficies que contactan con alimentos supone un serio riesgo para la salud. La formación de biofilms y el subsiguiente desprendimiento de los mismos sobre alimentos, puede suponer una importante fuente de contaminación en alimentos y provocar importantes brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (Frank y Koffi, 1990).

Para una unión irreversible entre la célula y la superficie es necesario un tiempo de contacto mínimo (Chmielewski y Frank, 2003). Si bien por lo general, el espacio temporal para el desarrollo de un biofilm es corto y varía en función de la temperatura, disponibilidad de nutrientes y presencia de antibióticos (Holah, 1995). En este sentido, varios estudios indican que las uniones irreversibles llevan de 20 minutos a 4 horas a una temperatura de entre 4 y 20°C. (Gilbert y cols., 1991).

Las adhesiones se dan rápidamente, Mittelman (1998) encontró que a menudo se producen entre 5 a 30 segundos. Si bien Stopforth y cols. (2002) sugieren que debe haber un número límite de células adheridas a la superficie. Probablemente esta limitación se deba al resultado de una interacción:

- i) Disponibilidad de nutrientes.
- ii) Tiempo de incubación.
- iii) Temperatura de incubación.

Las adhesiones se dan en dos fases; una primera reversible, seguida de una segunda irreversible (Marshall y cols., 1971; Mittelman, 1998). La etapa reversible es una unión débil de la bacteria con el sustrato. En ella actúan fuerzas de Van der Waals y fuerzas electrostáticas e interacciones hidrofóbicas. Durante la unión reversible, las bacterias siguen mostrando

movimientos brownianos y se pueden eliminar de manera sencilla con una suave limpieza (Mittelman, 1998). La unión irreversible resulta del anclaje de los apéndices celulares y/o de la producción de polímeros extracelulares (Sutherland, 1983).

Carpentier y Cerf (1993) observaron que las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) proporcionan protección a los habitantes del biofilm mediante la concentración de nutrientes, previniendo el acceso de biocidas, secuestrando metales y toxinas y previniendo la desecación.

Además muchos desinfectantes se inactivan con facilidad en presencia de materia orgánica, por ello la existencia de suciedad y biofilm puede significar la reducción de su efectividad (Chmielewski y Frank, 2003).

#### **2.2.1.1. Factores que afectan a la unión microbiológica a superficies inertes.**

El tipo de sustrato influye en las características de la unión. Las bacterias tienden a unirse al cristal (superficie hidrofílica) uniformemente en una monocapa, mientras que en las hidrofóbicas como el nylon o la lata tienden a unirse en grupos (McEldowney y Fletcher, 1987).

Una limpieza inadecuada de las superficies promueve la acumulación de suciedad y, en presencia de agua, contribuye al desarrollo de los biofilms bacterianos que pueden contener microorganismos patógenos (Boulangé-Peterman y cols., 1993). En la mayoría de los casos, las bacterias se unen más a las superficies hidrofílicas que a las hidrofóbicas, pero las diferencias en las uniones no tienen necesariamente un significado práctico (Blackman y Frank, 1996).

Como ya se ha comentado, la temperatura también es un factor determinante a la hora de la adhesión (Mittelman, 1998). Así, temperaturas altas de crecimiento se asocian con el incremento de adhesividad (Smoot y

Pierson, 1998), posiblemente debido a la producción de proteínas de estrés térmico asociadas con la superficie celular.

Por ello, las estructuras que protusionan desde la membrana celular como los lipopolisacáridos (LPS), adhesinas y otras proteínas y ácidos lipoteicoicos, pueden desempeñar papeles importantes en la adhesión microbiana (Chmielewski y Frank, 2003). Esto puede ser debido, entre otros, a que las sustancias poliméricas extracelulares también se producen en respuesta a la unión y al estímulo ambiental, como presión osmótica, pH, temperatura y falta de nutrientes (Davey y O'Toole, 2000).

#### **2.2.1.2. Propiedades de las superficies de contacto.**

Stevens y Holah (1993) demostraron que las bacterias estaban retenidas en las imperfecciones de las superficies. Por ello las superficies más dañadas retenían mayor número de bacterias.

El acero inoxidable se usa frecuentemente como material de cocina porque es resistente a los golpes, a la corrosión, dura mucho tiempo y es de sencilla fabricación, además de ser estable, inerte y de fácil limpieza (Boyd y cols., 2001). A escala microscópica se observa como el acero presenta diminutas oquedades que no se ven macroscópicamente (Frank y Chmielewski, 2001), lo cual permite una mayor retención bacteriana por el incremento del número de lugares de adhesión. Boyd y cols. (2001) demostraron que los niveles de higiene de las superficies de contacto pueden verse disminuidos con el uso, ya que puede provocar que la superficie se deteriore y los defectos de la superficie pueden actuar como sitios de retención de microorganismos y materia orgánica. Además, una vez allí, algunos microorganismos en los biofilms catalizan reacciones químicas y biológicas, causando corrosión del metal (Mittelman, 1998).

Además, las superficies rugosas acumulan suciedad y son de más difícil limpieza que las lisas. En consecuencia, los defectos de las superficies proporcionan protección a la suciedad y los microorganismos (Boulangé-

Peterman, 1996; Boulange-Peterman y cols., 1997; Bower y cols., 1996; Mafu y cols., 1990), lo que hace que las bacterias supervivientes puedan volver a multiplicarse y formar un biofilm.

### **2.2.1.3. Propiedades adhesivas de las superficies de las células bacterianas.**

Las bacterias tienen una carga negativa neta en la superficie y normalmente se comportan como partículas hidrófobas, pero el grado de hidrofobicidad puede cambiar según la fase de crecimiento. La hidrofobicidad generalmente decrece según se incrementa la tasa de crecimiento (Boulange-Peterman, 1996; y cols., 1997).

Las propiedades de la superficie celular como los flagelos, pili, proteínas de adhesión y cápsulas también influyen en la adhesión (Kumar y Anand, 1998).

Los pili actúan como un velcro para anclar las bacterias a algunas superficies (Pratt y Kolter, 1998) y también actúan como quimiorreceptores, dirigiendo a las células a sitios específicos. La pérdida de esos apéndices celulares cambia las propiedades de superficie, lo que puede provocar una menor capacidad de adhesión (Gilbert y cols., 1991; Heilmann y cols., 1996).

Bower y cols. (1996) encontraron que las esporas se adhieren mejor a las superficies de contacto de los alimentos que las células vegetativas debido al grado de hidrofobicidad de su superficie.

La composición de las sustancias poliméricas extracelulares del biofilm no se conoce, pero es como una mezcla de polímeros. Así, las sustancias poliméricas extracelulares del biofilm de una pseudomonádacea unida a acero contiene galactosa, glucosa, rhamnosa y ácido urónico (Lindberg y cols., 2001).

### 2.2.2. Evolución y maduración del biofilm.

La secuencia de unión de diferentes especies bacterianas influye en la composición del biofilm resultante. La población inicial que se une puede cambiar las propiedades de la superficie así las que vienen después se pueden adherir vía asociación célula a célula. En algunos casos, la unión de unas segundas especies puede incrementar la estabilidad de la población del biofilm (McEldowney y Fletcher, 1987).

En este sentido Hood y Zottola (1997 b) demostraron que *Listeria monocytogenes* era más propensa a adherirse al acero en presencia de *Pseudomonas fragi*.

Si las condiciones son adecuadas para un crecimiento suficiente del biofilm, por naturaleza, desarrollará una estructura organizada. A este proceso se le llama maduración. Un biofilm maduro puede consistir en una simple capa de células, en un polímero extracelular poroso o en una multicapa de microcolonias sueltas o empaquetadas por las sustancias poliméricas extracelulares. Lawrence y cols. (1991) observaron la redistribución espacial, después de la formación de microcolonias, para producir una estructura de biofilm maduro, mediante microscopía láser confocal.

Algunos de los factores que afectan al desarrollo del biofilm, incluido las propiedades de la superficie y de la interfase, son (Chmielewski y Frank, 2003):

- i) La disponibilidad de nutrientes.
- ii) La composición de la comunidad microbiana.
- iii) La disponibilidad de agua.
- iv) La interacción interespecífica.
- v) El transporte celular.

A medida que madura el biofilm, se adapta a los nutrientes, oxígeno y cambios poblacionales y forma microcolonias discretas separadas por

canales de agua. La densidad estructural de la matriz se incrementa en el núcleo mientras que las capas superiores permanecen porosas (Bishop, 1997). Las bacterias metabólicamente más activas permanecen en la superficie de las capas de la matriz del biofilm, cerca de los canales de agua (Zhang, y Bishop, 1994). Los canales de agua permiten la dispersión y el intercambio de sustancias orgánicas, cationes metálicos y metabolitos. Los nutrientes se atrapan y concentran en la matriz del biofilm y se mueven por ésta por difusión (Bryers, 1987; Davey y O'Toole, 2000).

Las capas de un biofilm se pueden despegar, separar y romper. Cuando el biofilm madura, engruesa, creando unas condiciones anaeróbicas en el interior. Bryers (1987) sugirió que las condiciones anaeróbicas dan lugar a un incremento del ácido y acumulación de gas insoluble, que debilita la estructura del biofilm, causando la separación de las capas poliméricas de la superficie que los soporta.

### **2.2.3. Patógenos, alterantes y biofilms.**

Los resultados de diversos estudios han demostrado que las células adsorbidas a las superficies muestran resistencias mayores a los agentes antimicrobianos y a los efectos de condiciones medioambientales adversas. (Anwar y cols., 1992; Costerton y cols., 1994).

De Beer y cols. (1994) observaron que el hipoclorito sódico podía no penetrar completamente en un biofilm mixto de *Pseudomona-Klebsiella* (400 µm de grueso) después de 1 hora de exposición. Propusieron que el propio biofilm era capaz de inactivar el hipoclorito sódico.

A pesar de los programas convencionales de limpieza, las bacterias adheridas pueden sobrevivir y proliferar en las superficies de los equipos que procesan alimentos (Austin y Bergeron, 1995).

Stopforth y cols. (2002) comprobaron que las bacterias adheridas son mucho más resistentes a los desinfectantes que las que se hallan en suspensión.

Según estos investigadores *Listeria monocytogenes*, o cualquier otro tipo de célula microbiana, adherida a una superficie, es más resistente a los desinfectantes que las mismas células creciendo en suspensión.

Esta resistencia observada se ha atribuido al “escudo microbiano” que confieren los biofilms formados por diferentes especies de microorganismos y a la gran producción de sustancias extracelulares de carácter polimérico, también conocidas como glicocalyx (Anwar y cols., 1992).

Un procedimiento de limpieza efectiva debe romper o disolver la matriz de sustancias poliméricas extracelulares asociada al biofilm, para permitir que los agentes higienizantes tengan acceso a las células viables (Chmielewski y Frank, 2003).

La eliminación de las células adheridas, de manera irreversible, es difícil y requiere de la aplicación de tratamientos físicos agresivos (cepillado o raspado) o provocar roturas con tratamientos químicos mediante la aplicación de enzimas, detergentes, surfactantes, sanitizantes y/o calor (Bower y cols., 1996; Sinda y Carballo, 2000; Schwach y Zottola, 1984; Wirtanen y cols., 1996 y Gibson y cols., 1999).

Wirtanen y cols. (1996) descubrieron que la limpieza con álcalis y especialmente con quelantes como el EDTA, eran más efectivos que la limpieza con ácidos para eliminar biofilms.

Ronner y Wong (1993) encontraron que el hipoclorito sódico y los desinfectantes aniónicos eran mejores para eliminar las sustancias poliméricas extracelulares excretadas por *Listeria* y *Salmonella* en acero inoxidable que los compuestos de amonio cuaternario (QAC) y el yodo.

Los biofilms formados por varias especies diferentes son más gruesos y estables frente al estrés ambiental que los biofilms monoespecíficos. La estabilización de los biofilms mixtos posiblemente se deba a la producción

de diferentes sustancias poliméricas extracelulares resultantes de la actividad microbiana (Kumar y Anand, 1998).

#### **2.2.3.1. *Listeria monocytogenes.***

*Listeria monocytogenes* es un patógeno con capacidad para proliferar en entornos fríos y húmedos que son ideales para la formación de biofilms. *Listeria* forma biofilms en cultivos puros y puede sobrevivir y crecer en biofilms multiespecíficos (Blackman y Frank, 1996; Mafu y cols., 1990).

Las mujeres embarazadas tienen una serie de riesgos en el entorno del hogar. *Listeria monocytogenes* está habitualmente en el entorno doméstico y se puede encontrar fuera de la cocina particularmente en áreas húmedas (Manafi, 2003).

Lunden y cols. (2000) demostraron que la cepa más frecuente de *Listeria monocytogenes* (cepa 1/2c) encontrada en las plantas de procesamiento de alimentos tenía facilidad de adhesión y requería sólo un corto periodo de tiempo de contacto para la unión. Este microorganismo utiliza flagelos, pilis y proteínas de membrana para iniciar la adhesión (Davey y O'Toole, 2000; Vatanyoopaisarn y cols., 2000).

Herald y Zottola, (1988) y Hood y Zottola, (1997 b), observaron que, *Listeria spp.* y *Yersinia spp.* muestran mayor adhesión cuando están en la fase de mayor actividad metabólica, mientras que cuando el biofilm envejece se torna más resistente frente al hipoclorito sódico (Lee y Frank, 1991).

#### **2.2.3.2. *Salmonella spp.***

Comprende un grupo muy complejo de enterobacterias productoras de enfermedades en el hombre y animales. Son bacilos, Gram negativos, generalmente móviles por flagelos peritricos, no esporulados ni capsulados y anaerobios facultativos (Hernández y Dubón, 1992).

Normalmente se considera que la dosis infectiva mínima para *Salmonella* puede ser superior a  $10^6$ , pero puede llegar a ser tan sólo de 10-100 células (Greenwood y Hooper, 1983; Scheil y cols., 1998).

Históricamente los mayores brotes de toxiinfección asociados a los hogares están causados por *Salmonella* (Anónimo, 2000b). *Salmonella enteritidis* es la mayor causante de salmonelosis en Europa y en España (Anónimo, 2001) y en Estados Unidos (Olsen y cols., 2000) en los últimos 5 años.

Varios estudios (Helke y Wong, 1994; Jones y Bradshaw, 1997; Joseph y cols., 2001) han demostrado que *Salmonella* se puede adherir y formar biofilms en superficies que se encuentran en plantas de procesado de alimentos y que incluyen plástico, cemento y acero. Esta propiedad de *Salmonella* se debe a que posee estructuras de superficie, como la SEF17 *fimbriae*, que le facilitan la adhesión a las superficies inanimadas (Austin y cols., 1998), dando a las células una capacidad de resistencia frente a fuerzas mecánicas.

La presencia de animales de compañía significa un elevado riesgo de infección en la casa, sobre todo en la cocina y en el lavabo. Incluso si los animales están sanos, suelen actuar como portadores de *Salmonella*, y otros patógenos. Los perros pueden ser una fuente de *Salmonella*, especialmente para los niños de menor edad que están en contacto con ellos (Morse y cols., 1976; Wall y cols., 1996).

En un estudio de hogares en los que había habido casos de *Salmonella* (Wilson y cols., 1998), este organismo fue aislado en el 6% de los trapos y bayetas del hogar. Esto demuestra el potencial de supervivencia de *Salmonella* en el ambiente y sugiere la posibilidad que el organismo pueda crecer y sobrevivir en los trapos de cocina.

### **2.2.3.3. *Escherichia coli***

Este tipo de bacteria puede causar muy diversas enfermedades. Diversas cepas de *E. coli* pueden causar: diarrea, disentería, septicemia, neumonía y meningitis (Stiles, 2000).

*E. coli* utiliza flagelos, pilis y proteínas de membrana para iniciar la adhesión (Davey y O'Toole, 2000; Vatanyoopaisarn y cols., 2000). Además cuando ya está unida a la superficie pierde sus flagelos e incrementa la producción de sustancias poliméricas extracelulares (Davey y O'Toole, 2000).

### **2.2.3.4. *Pseudomonas spp.***

Las pseudomonas son microorganismos alterantes ubicuos. Se encuentran en ambientes de procesado de alimentos incluidos desagües, suelos, verduras, superficie de las carnes y en ácidos débiles de uso común (Brocklehurst y cols., 1987; Criado y cols., 1994; Hood y Zottola, 1997a; Piette y Idziak, 1991).

*Pseudomonas spp.* produce grandes cantidades de sustancias poliméricas extracelulares y se puede adherir y formar biofilms sobre superficies de acero inoxidable (Barnes y cols., 1999). Al igual que *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* pierde sus flagelos e incrementa la producción de sustancias poliméricas extracelulares cuando está unida a la superficie (Davey y O'Toole, 2000).

*Pseudomonas spp.* dentro de los biofilms pueden coexistir con *Listeria*, *Salmonella* y otros patógenos (Bagge y cols., 2001; Fatemi y Frank, 1999; Jeong y Frank, 1994) formando biofilms multiespecíficos mucho más estables y resistentes (McEldowney y Fletcher, 1987).

#### **2.2.3.5. *Bacillus spp.***

*Bacillus* sobrevive en procesos de calor y se acumula en las tuberías y en las juntas de los entornos de procesado (Jeong y Frank, 1994).

Si los fluidos calientes fluyen continuamente sobre una superficie durante más de 16 horas, *Bacillus* y otras bacterias termorresistentes pueden formar un biofilm (Frank, 2000).

La intoxicación alimentaria por *Bacillus cereus* se presenta después de la ingestión de alimentos en los que ha crecido el organismo y formado su(s) toxina(s) (Anónimo, 1996).

#### **2.2.3.6. *Campylobacter spp.***

Aunque *Campylobacter* no se multiplica en alimentos, su dosis infectiva mínima es muy pequeña (Robinson, 1981), es menor que la de cualquier otro patógeno. Además, la investigación experimental ha sugerido que *Campylobacter* puede tener un mayor potencial de diseminación durante la manipulación de alimentos por parte del consumidor que otros patógenos (Redmond y cols., 2002) lo que incrementa el riesgo de contaminación cruzada.

Se ha determinado a *Campylobacter* como responsable de la mayoría de casos de toxiinfección alimentaria en Inglaterra, en Gales y en Estados Unidos (Rodríguez y cols., 2001) en los últimos años. En España el 40% de las gastroenteritis tratadas en hospitales entre 1993 y 1998 fueron atribuidas a este microorganismo (Anónimo, 2001 b).

#### **2.2.3.7. *Staphylococcus aureus:***

Es la especie tipo del género *Staphylococcus*, que se presenta en forma de cocos Gram positivos y catalasa positivos (Anónimo, 1996). Estando entre los mayores patógenos Gram positivos *S. aureus* se encuentra

habitualmente en diferentes áreas de las cocinas domésticas, especialmente en zonas secas (Kusumaningrum y cols., 2003).

*Staphylococcus aureus* es un importante patógeno alimentario, y la intoxicación estafilocócica es una de las causas más prevalentes de gastroenteritis en el mundo (Jablonsky y Bohach, 1997). Proviene de alimentos crudos, equipos o manipuladores y puede pasar a otros alimentos por contaminación cruzada, si bien necesita crecer hasta alcanzar concentraciones de  $10^5$  ufc/g para producir la toxina y provocar la enfermedad. Muchas toxiinfecciones son provocadas por contaminación cruzada posterior con un alimento en el que se dan las condiciones para su proliferación (Bergdoll, 1989).

Se estima que cada año, en Estados Unidos, *Staphylococcus aureus* provoca aproximadamente 185.000 casos de intoxicación, 1750 hospitalizaciones y dos muertes (Mead y cols., 1999). En España esta bacteria fue la segunda causante de toxiinfecciones después de *Salmonella spp.* entre los años 1993-1998, con un total de 228 casos registrados en éste periodo (Anónimo, 2001).

Los tiempos de supervivencia de *Staphylococcus aureus* se ven incrementados con bajas temperaturas, altos pH y bajos niveles de aniones de lactato o de nitrato (Whiting, 1996).

### **2.3. Procedimientos de higiene aplicables en el hogar y su efectividad.**

La implementación de una apropiada higiene puede virtualmente eliminar el riesgo de transmisión de patógenos alimentarios (Kerslake, 1995).

Las prácticas higiénicas en el hogar incluyen las categorías de higiene personal, higiene en los alimentos y higiene ambiental o de superficies (Scott, 1999).

La contaminación cruzada vía equipos contaminados y pobre higiene personal, durante la preparación de alimento, contribuye a la transmisión de los patógenos alimentarios (Olsen y cols., 2000; Kassa y cols., 2001). Después de la preparación de alimentos crudos contaminados, los patógenos son rápidamente dispersados a las superficies de contacto y a los utensilios de limpieza (Cogan y cols., 1999; de Boer y Hahné, 1990).

El agua potable es la base de todos los sistemas de limpieza en húmedo y supone el método más barato de transporte para aclarar y dispersar la suciedad. El agua tiene el poder disolvente para eliminar compuestos iónicos solubles (ej. Sal y azúcares) y ayuda a emulsificar grasas a temperaturas por encima de su punto de fusión, si bien, el agua usada sola tiene una pobre capacidad para transportar agentes no iónicos (Holah, 1995). Por ejemplo, el material orgánico adsorbido en el entorno del fregadero requiere un régimen de limpieza efectiva, aplicando calor, acción mecánica y/o desinfección química (Tierney y cols., 2003).

Las evaluaciones sensoriales son usadas como procesos de control para corregir inmediatamente pequeños problemas en la higienización, mientras que las pruebas microbiológicas deben realizarse para asegurarse que se cumplen los requisitos higiénicos (Holah, 1995). No se puede correlacionar semicuantitativamente el recuento de bacterias entéricas con la inspección visual (Kassa y cols., 2001).

### **2.3.1. El consumidor y la seguridad alimentaria.**

La manera en que los consumidores manipulan los alimentos en la cocina afecta al riesgo de la multiplicación de microorganismos, contaminación cruzada con otros productos y la destrucción de patógenos mediante correctos métodos de cocinado. Los patógenos alimentarios, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Listeria spp.* y *Escherichia coli* O157:H7 están asociados con un grupo de alimentos crudos que son regularmente preparados en el entorno doméstico y la transmisión en el hogar parece por tanto inevitable (Jones, 1998).

En la revisión de Redmond y Griffith (2003) sobre manipulación de alimentos en el hogar, se señala que, en general, los encuestados consideran que ellos mismos implementan adecuados procedimientos de seguridad alimentaria y parecen comprender la importancia de la aplicación de dichos procedimientos. Sin embargo, los mismos encuestados desconocen que las prácticas inseguras pueden suponer un riesgo de contaminación cruzada durante la preparación casera de los alimentos.

Según Anderson y cols. (2000) prácticamente todos los consumidores de Estados Unidos consideran el consumo de lechuga mojada con gotas de exudado de pollo crudo como un comportamiento de riesgo. Observaciones de la preparación de alimentos muestran que el 98% de esos mismos consumidores provocan contaminaciones cruzadas de alimentos listos para su consumo con carne o huevos crudos.

Los resultados de varios estudios muestran que alrededor del 75% de los consumidores fallan en los conocimientos de la contaminación cruzada y los principios asociados con esta (Anónimo, 2002 b; Anónimo, 2002 c). Además, los resultados de diferentes estudios muestran que del 80% al 90% de los consumidores comenten errores al no usar partes separadas de la cocina para la preparación de alimentos crudos y cocinados (Anderson y cols., 2000; Griffith, 1999; Worsfold, 1994). Y si a esto le añadimos que los resultados obtenidos por Redmond y cols. (2000) indican que sigue prevaleciendo un mal entendimiento de la necesidad de uso de utensilios diferentes o correctamente limpiados, para la preparación de pollo crudo y alimentos listos para su consumo; se puede concluir, por tanto, que el conocimiento sobre seguridad alimentaria por parte del consumidor no se correlaciona con las prácticas seguras de preparación de alimentos en el hogar (Albrecht, 1995; Altekruise, 1996; Williamson y cols., 1992).

Según Fein y cols. (1995) la no asociación por parte de los consumidores de la manipulación en el hogar de alimentos y toxiinfecciones alimentarias, es

un serio impedimento para convencerles de que cambien sus hábitos de manipulación.

Las medidas de seguridad tomadas por los consumidores desempeñan un papel crítico en la prevención de toxiinfecciones alimentarias, porque constituyen el paso final en la preparación del alimento (Zhang, 1999). La manipulación segura de alimentos por parte del consumidor en la cocina doméstica se considera “la última línea de defensa” (Gilbert, 1983).

Mejorar la manipulación de alimentos por parte del consumidor supone reducir el riesgo y las incidencias de brotes alimentarios (Redmond y Griffith, 2003). No en vano, en España, se producen tantas toxiinfecciones en el hogar como en el resto de los lugares de restauración juntos (Anónimo, 2001 b).

Los resultados de Kassa y cols. (2001) demuestran que tener personal con formación en higiene puede ser de gran importancia a la hora de reducir el riesgo de toxiinfecciones alimentarias.

### **2.3.2. Limpieza y desinfección como método de garantizar la seguridad alimentaria.**

La limpieza es importantísima como una parte de las dos fases que comprende el programa de higienización (limpieza y desinfección). Un programa de higienización correcto requiere conocimiento de la naturaleza de la suciedad que se debe eliminar. Los residuos se pueden caracterizar por su composición química (ej. Carbohidratos, grasa o proteína) (Holah, 1995).

Limpieza significa la eliminación mecánica de la suciedad de un área determinada. Como demuestra Kusumaningrum y cols. (2003), en la limpieza, además, los microorganismos son movilizados de las superficies. Mientras que la función de la desinfección es matar a los microorganismos contaminantes y prevenir la incidencia de una enfermedad (Tamási, 1995).

McEldowney y Fletcher (1988) demostraron que donde los tratamientos de limpieza permiten la desorción de las bacterias hay subsecuentemente un potencial riesgo de contaminación de otras superficies. Zottola y Sasahara (1994) recomendaron que, con el fin de minimizar la dispersión microbiana, se deberían seguir dos pasos, limpieza e higienización. Los agentes limpiadores generalmente incluyen componentes que mojan y penetran en la suciedad, lo que facilita su movilización. La actividad de los desinfectantes es más eficiente después de haberse retirado la materia orgánica de la superficie, ya que establecen un mayor contacto con los microorganismos adheridos a la misma.

Jay y cols. (1999) encontraron que al menos la mitad de los hogares estudiados no usa un detergente o un limpiador para limpiar las superficies de la cocina. Así mismo, las investigaciones llevadas a cabo por Jay y cols. (1999) y Tierney y cols. (2003) indican que el escaso uso de los desinfectantes se correlaciona con altos recuentos microbiológicos.

Los efectos químicos de los productos de la limpieza y desinfección incrementan linealmente con la temperatura en aproximadamente el doble cada 10°C de aumento. Para suciedad grasa, se pueden utilizar temperaturas superiores a su punto de fusión para emulsificar esos depósitos y ayudar a eliminarlos (Holah, 1995).

Por ello, el descubrimiento de bacterias entéricas en las supuestamente limpias y desinfectadas superficies de contacto con alimentos, indica una inadecuada e infrecuente limpieza y desinfección de las mismas, entre otras causas, por la utilización de desinfectantes o temperaturas de aplicación del agua de aclarado inadecuadas (Kassa y cols., 2001).

Además, una incorrecta desinfección permite el crecimiento de biofilms en los entornos de procesado, lo que proporciona una mayor oportunidad para la contaminación microbiana al producto procesado. Esto incrementa el riesgo de reducir la vida comercial y de transmisión de enfermedades (Frank y Koffi, 1990; McCarthy, 1992; Ronner y Wong, 1993).

La *U.S. Environmental Protection Agency* (Anónimo, 1997 a) recomienda la implementación de unas adecuadas prácticas de manipulación de alimentos para prevenir casos de enfermedades alimentarias.

La intervención en el momento adecuado y en el punto debido es fundamental a la hora de prevenir enfermedades transmitidas por alimentos (Cogan y cols., 2002).

Por todo ello, se puede concluir, que la aplicación de unos buenos procedimientos de higiene en el hogar puede reducir el impacto de los trastornos provocados por enfermedades infecciosas (Anónimo, 2002 a).

Como indican Griffith y Worsfold (1994) la cocina no sirve exclusivamente como espacio dedicado a la preparación de alimentos sino que en ocasiones sirve también de lavandería, como zona de trabajo e incluso como dormitorio de los animales de compañía.

Las investigaciones epidemiológicas han demostrado que una higiene insuficiente en los hogares ha hecho crecer los peligros para la salud. Con la finalidad de poder recomendar maneras de romper las cadenas de transmisión de enfermedades, sería necesario investigar cuáles son los vías de contaminación cruzada (Borneff y cols., 1988 a).

*Salmonella spp.* se encuentra en el 30% y *Campylobacter spp.* en torno al 90% de los pollos que se venden al por menor en Inglaterra (Anónimo, 1997 b) y probablemente en otros países. Las canales de pollos frescos pueden contener en torno  $10^5$  *Campylobacter* por canal y un menor número de *Salmonella* (Cason y cols., 1997). Por tanto ésta puede ser una vía de infección importante de *Salmonella* y *Campylobacter*.

Durante la preparación de pollos contaminados en las cocinas domésticas, se produce una distribución significativa de la contaminación a manos, ropas y superficies de contacto con manos y alimentos (Cogan y cols., 1999).

Por ello, los riesgos microbiológicos asociados con la contaminación de los alimentos listos para su consumo, preparados con utensilios sucios, previamente usados para la preparación de carne cruda o aves, son considerados altos o muy altos (Redmond y cols., 2001).

Una elevada proporción de gastroenteritis se producen en el ámbito doméstico debido a una contaminación cruzada entre la cocina y el lavabo, a un mal cocinado de los alimentos o a un almacenamiento inadecuado (Scott y cols., 1984), además de equipos contaminados y pobre higiene personal (Olsen, 2000).

La preparación de alimentos crudos y cocinados en la misma área de trabajo de una cocina, incrementa el riesgo de contaminación cruzada (Redmond y Griffith, 2003). Así, durante la preparación de alimentos contaminados de forma natural, los patógenos potenciales se esparcen frecuentemente por las manos y las superficies de contacto con alimentos, lo que da una gran importancia a la contaminación cruzada, como factor desencadenante de muchos casos de toxiinfección alimentaria (Roberts, 1990). Redmond y Griffith (2003), en la misma línea, atribuyen un riesgo potencial al fallo de usar diferentes utensilios, (cuchillos y tablas de picar) para la preparación de pollo crudo y alimentos listos para su consumo.

Una investigación llevada a cabo por Bradford y cols. (1997) demostró la facilidad con la que organismos transferidos pueden crecer en alimentos listos para su consumo conservados a temperatura ambiente, lo que incrementa el riesgo de toxiinfección alimentaria. Es más, según Knabel (1995) y Cogan y cols. (1999) los alimentos que se mantienen durante gran tiempo a temperaturas templadas están frecuentemente implicados en brotes de toxiinfecciones alimentarias dada la capacidad de los patógenos bacterianos para multiplicarse rápidamente, hasta niveles peligrosos. Brocklehurst y cols. (1987) y Hedberg y cols. (1992) han descrito brotes de listeriosis y salmonelosis provocados por una contaminación del producto después del procesado.

La aplicación de un desinfectante efectivo sobre las superficies de contacto, después de la preparación de alimentos, tiene un impacto significativo en la reducción de contaminación cruzada desde los alimentos en la cocina para *Salmonella* y *Campylobacter* (Cogan y cols., 1999).

Como mejor sistema preventivo para la dispersión de microorganismos y la contaminación cruzada con alimentos listos para su consumo se sugiere una adecuada limpieza y desinfección de la cocina (Kusumaningrum y cols., 2003).

### **2.3.3. Limpieza e higiene.**

Varios estudios han mostrado que la limpieza, utilizando jabón y agua, puede que no sea eficaz en la descontaminación del entorno (Scott y cols., 1984; Scott y Bloomfield, 1993). Si bien hay estudios que muestran que la limpieza en base a detergente se puede considerar suficiente para producir una limpieza higiénica de la superficie (Anónimo, 2002 a).

La importancia del aclarado fue demostrada por Scott y Bloomfield (1990 a) quienes mostraron que cuando las superficies sucias se limpiaban sólo con jabón y agua, sólo se conseguía esparcir las bacterias residuales entre las superficies y la bayeta que a su vez las esparcía a otras superficies.

Mediante la combinación de una limpieza a base de detergente con un aclarado, se consigue una reducción significativa en cuanto a riesgo microbiano, si bien, y aunque esta técnica ha sido muy efectiva en superficies contaminadas con *Campylobacter*, la contaminación residual con *Salmonella* se continúa detectando entre el 5-10% de las superficies, con recuentos superiores a 100 ufc (Cogan y cols., 2002).

Según Scott y cols. (1984) la limpieza exclusivamente con detergente y agua caliente es insuficiente para prevenir la transferencia de contaminación, vía superficies, desde un alimento hasta otro, por tanto es necesario un procedimiento de descontaminación más efectivo.

#### **2.3.4. Desinfectantes químicos e higiene.**

Los “British standards 5283” y la “European Hygienic Engineering & Design Group” (EHEDG) (Anónimo, 2004) definen la desinfección como la destrucción de los organismos peligrosos (pero no las esporas) hasta niveles aceptables para el propósito definido.

Si las superficies no se limpian y desinfectan adecuadamente, pueden ser fuente de patógenos (Kassa y cols., 2001). Por tanto, la aplicación del desinfectante es esencial para inactivar los microorganismos que quedan en la superficie después de la limpieza (Dunsmore y Thomson, 1981).

Las propiedades, tanto físicas como químicas, de los desinfectantes pueden limitar su elección para una aplicación en particular. No sería adecuado, por ejemplo, utilizar hidróxido sódico en superficies que contuvieran estaño, zinc o aluminio, ya que la solución corroería los materiales. Tampoco sería adecuado usar ácido clorhídrico en acero o hierro por los mismos motivos. No se deben utilizar agentes oxidativos en presencia de sustancias reductoras que neutralizarían su efecto. Algunas actividades frente a superficies pueden resultar interesantes en algunos casos, pero no en otros. Las propiedades adicionales (manchar, toxicidad, etc.) también se deben tener en cuenta ya que pueden convertir el producto en inadecuado (Jeffrey, 1995).

Los productos empleados para alcanzar la higienización de una superficie, deben tener una rápida acción microbicida contra bacterias, virus u hongos patógenos, bajo las condiciones apropiadas de su uso habitual (presencia de suciedad, temperatura, agua dura, etc.). Aunque los estándares de suspensión y pruebas de superficie se utilizan para establecer que un producto da el perfil de actividad (espectro de acción, tasa de letalidad, etc.) estos no dan indicación de la efectividad bajo condiciones de uso. Más particularmente estas pruebas no dan indicación del logaritmo de reducción alcanzado por la aplicación de los productos de limpieza o desinfección

combinados con la acción mecánica y aclarado, por ejemplo, la manera en que son utilizados en el hogar (Anónimo, 2002 a).

El IFH (International Scientific Forum on Home Hygiene) reconoce que la eficacia de los procesos de limpieza y desinfección pueden verse comprometidos si el desinfectante no se usa en la dilución y de la manera correcta (Anónimo, 2002 a).

La elección del desinfectante se debe basar, además, en si puede o no puede haber presencia de carga orgánica asociada con el biofilm. Así, todos los desinfectantes aprobados funcionan bien en los biofilms sin carga orgánica asociada (Chmielewski y Frank, 2003).

La limpieza y desinfección de superficies de trabajo en el hogar y en la industria alimentaria son procesos clave en materia de seguridad. No obstante, ni los productos empleados ni la metodología utilizada ofrecen siempre buenos resultados. Esto puede ser debido a la aparición de fenómenos de resistencia y adaptación que facilitan la supervivencia de microorganismos (Rodríguez, 2003).

Tras un tratamiento continuado suele apreciarse que las superficies no sólo no se desinfectan bien, sino que en ocasiones se da un incremento del número de bacterias (Rodríguez, 2003).

Los estudios de laboratorio han mostrado que la adaptación a los desinfectantes puede ocurrir cuando los microorganismos se ven expuestos a concentraciones subletales (Lunden y cols., 2003). En nuestro país la preocupación se centra en *Legionella pneumophila*, aunque desde el punto de vista alimentario no debe dejarse de lado *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y cualquiera de las enterobacterias patógenas (Rodríguez, 2003).

El poder desinfectante de un producto difiere entre cepas adaptadas y persistentes en las superficies con respecto a las no adaptadas. Esta

situación es especialmente evidente en el caso de *Listeria monocytogenes* en relación con los amonios cuaternarios y las alquilaminas terciarias.

Estudios recientes han demostrado que tras una exposición subletal de 2 horas, la concentración necesaria para destruir a este tipo de bacteria se incrementa en 3 veces (Rodríguez, 2003).

Una posible solución a los fenómenos adaptativos es la rotación entre distintos desinfectantes. En esencia, esta práctica conlleva que, cada cierto tiempo, dependiendo el tipo de contaminación y la extensión de la misma, se cambia el tipo de desinfectante creando un ciclo con dos, y preferiblemente con tres, productos de desinfección diferentes (Rodríguez, 2003).

La única recomendación posible es un buen empleo de los desinfectantes, a concentraciones adecuadas y en las condiciones que indique el fabricante. En este sentido, es igualmente recomendable no diluir excesivamente los productos químicos y dejarlos actuar el tiempo necesario (Rodríguez, 2003).

Los resultados de Cogan y cols. (1999) y Cogan y cols. (2002) sugieren que para alcanzar niveles satisfactorios de higiene en una situación, como manipular comida cruda en la cocina doméstica, donde un fallo higiénico acarrea un riesgo elevado con consecuencias serias, puede ser aconsejable el uso de un desinfectante químico.

### **2.3.5. El secado de superficies como forma de descontaminación.**

Varios estudios, entre ellos los de Lowbury y Fox (1953), Petit y Lowbury (1968), Rathmachers y Borneff (1977), McEldowney y Fletcher (1988) y Hirai (1991) demostraron que el secado de superficies tiene un importante efecto bactericida, aunque la efectividad del proceso depende de la naturaleza del organismo, el tiempo de secado y las condiciones de temperatura, suciedad, humedad, etc. Un ejemplo de ello es *S. aureus*, quien tiene tendencia a formar agregados de unas cuantas células, lo que puede proporcionar alguna protección a las células más internas frente a la deshidratación y la

limpieza (Tebbutt, 1991 b). Posiblemente debido a esta estructura grupal, 15 minutos de aire secante no reducen significativamente los recuentos de *S. aureus* de las superficies, lo que corrobora su tolerancia frente a las condiciones secas (Kusumaningrum y cols., 2003).

El breve periodo que dura la desinfección proporcionada por los desinfectantes fenólicos y el hipoclorito, se podría deber a una recontaminación de las superficies limpiadas o quizás debido a que los sitios húmedos, como fregaderos y ropa húmeda, propicien la multiplicación de la flora residual que no haya sido destruida en el proceso de desinfección (Scott y cols., 1984).

La supervivencia y proliferación de esos microorganismos se ve favorecida si la superficie está sucia y húmeda (Frank y Chemielewski, 1997; Scott y Bloomfield, 1990 b). El proceso de secado se cree que es de importancia crítica para maximizar la reducción de las bacterias (Blackmore, 1989; Montville y cols., 2002).

Humphrey y cols. (1994) estudiaron la supervivencia de *Salmonella enteritidis* en superficies de formica después de batir huevos contaminados artificialmente en un cuenco. Cogan y cols. (1999) observaron la supervivencia de *Salmonella spp.* y *Campylobacter spp.* por encima de 3 horas en superficies de contacto con alimentos y manos en la cocina doméstica, después de la preparación de pollo fresco contaminado.

De este modo, aunque el secado es un proceso importante para mantener las superficies en un estado higiénico, no puede ser considerado como un proceso para alcanzar la limpieza *per se* (Anónimo, 2002 a).

### **2.3.6. Limpieza y desinfección regular como método de evitar la aparición de biofilms.**

La frecuencia de uso del agente de limpieza en la cocina influye en el nivel de microorganismos (Tierney y cols., 2003). Se ha reconocido que la posibilidad de un microorganismo para provocar una enfermedad, no depende sólo del tipo de microorganismo, sino también de su número (Lipson, 1976). Josephson y cols. (1997) concluyeron que el uso casual o irregular de los limpiadores desinfectantes no es apto para reducir el riesgo de patógenos en las superficies de la cocina.

La presencia de nutrientes, depósitos de residuos de alimentos y el estrés provocado por acciones de limpieza, higienización o tratamientos de procesado, influirán en la estructura del biofilm (Chmielewski y Frank, 2003).

Una vez se permite la formación del biofilm, la limpieza de la superficie se vuelve más difícil por la presencia de las sustancias poliméricas extracelulares adherentes (Chmielewski y Frank, 2003).

### **2.4. Superficies de contacto con las manos y alimentos.**

Los organismos patógenos que llegan al hogar mediante un producto contaminado, como agua o alimentos crudos, un manipulador portador, animales de compañía, etc., pueden ser diseminados a las manos y a las superficies del entorno en un número significativo, ya sea por contacto directo, por los fluidos o excreciones corporales o vía aerosoles. Esos patógenos pueden persistir en las superficies del entorno por periodos significativos de tiempo y ser transferidos a otras superficies (incluido las manos) en número suficiente para representar un riesgo de infección (Anónimo, 2002 a).

Un estudio llevado a cabo sobre las infecciones de *Escherichia coli* O157:H7, a partir de hamburguesas preparadas en casa, implicaba una falta

de higiene de las superficies y de las manos como, factores desencadenantes significativos (Mead y cols., 1999).

Aunque la dosis infectiva para los patógenos entéricos como *Salmonella* es generalmente elevada (por encima de  $10^6$  células viables), a temperatura ambiente un pequeño número de células se puede multiplicar hasta alcanzar una gran cantidad en unas pocas horas. La transferencia de bacterias, hongos o virus por el hogar, vía manos y superficies de contacto con alimentos, incrementa el riesgo de exposición de los miembros de la familia. Los procedimientos de higiene que reducen el riesgo de contaminación cruzada son, de este modo, importantes para esas superficies (Anónimo, 2002 a).

El papel de las manos en la transmisión de enfermedades está bien definido (Emery, 1990), y la transmisión de patógenos vía manos contaminadas se ha considerado la mayor ruta de infección en casos de intoxicación alimentaria. El lavado de manos (fregado y aclarado con agua y jabón) y su secado posterior se ha demostrado que es una manera efectiva para eliminar los microorganismos contaminantes y de reducir las toxiinfecciones alimentarias (Guzewich y Ross, 1999).

Los datos objetivos, tras una encuesta, han indicado un profundo desconocimiento de la necesidad de lavarse las manos y de secárselas durante la preparación de comida por razones de higiene (Redmond y cols., 2001). Incluso fueron notables las percepciones erróneas sobre el correcto lavado y secado de manos (Redmond y Griffith, 2003). No utilizar jabón durante el lavado de manos se considera un lavado de manos inadecuado e insuficiente (Kassa y cols., 2001).

### **2.4.1. Procedimientos de higiene para superficies de manos y alimentos.**

Si los manipuladores no se lavan las manos con agua y jabón después de ir al baño o tocar alimentos crudos, como vegetales o carne, sus manos pueden estar contaminadas con bacterias entéricas y esa puede ser la razón de la presencia de estas bacterias en el fregadero, lavamanos y en la nevera o congelador en más del 50% de los establecimientos estudiados (Kassa y cols., 2001).

Así, en un estudio reciente, después de la preparación de la comida con un pollo contaminado, pero antes de la limpieza, un 40% y un 63,3% de las manos y superficies de contacto con alimentos estaban contaminadas con *Salmonella* y *Campylobacter* respectivamente (Cogan y cols., 2002).

Una manera adecuada de lavarse las manos y secárselas incluye el uso de agua caliente con jabón y un posterior proceso de aclarado, seguido de la utilización de una toalla, limpia y que no haya sido utilizada previamente, o toalla de papel desechable, para el secado (Griffith y cols., 1999).

Griffith y cols. (2001) estudiaron el lavado de las manos después de la manipulación de comida cruda y antes de tocar alimentos listos para su consumo. Mostraron que aún teniendo el conocimiento de una actitud positiva, y la intención de hacer un correcto lavado de manos, ningún participante llevo a cabo un lavado adecuado de manos antes de manipular alimentos listos para su consumo o después de manipular alimentos crudos.

Pero no sólo los alimentos crudos o la falta de higiene son las causas de unas manos contaminadas. Si el lavamanos y los tiradores de los congeladores y refrigeradores no se limpian y desinfectan adecuadamente cada cierto tiempo, pueden dar lugar a la recontaminación de las manos de los manipuladores con el consiguiente riesgo (Kassa y cols., 2001).

#### **2.4.1.1. Limpieza y desinfección combinando detergente y desinfectante.**

Según el IFH (Anónimo, 2002 a) los desinfectantes se inactivan en mayor o menor medida por la presencia de suciedad. Por ello, las superficies deben limpiarse antes de la aplicación del desinfectante. Esto es particularmente importante para las superficies muy contaminadas, por ejemplo, las que están en contacto con alimentos.

La mezcla de hipoclorito y detergente en agua caliente provoca una reducción significativa en el número de puntos contaminados, en relación a los encontrados contaminados después del uso de detergente y agua sin desinfectante (Cogan y cols., 1999).

Un estudio limitado al entorno del catering mostró que no había diferencias, aparentemente significativas, entre el nivel de seguridad higiénica alcanzada en diversas superficies de contacto con alimentos, utilizando un producto que combinaba detergente y desinfectante (desinfectante a base de cloro activo o amonio cuaternario) y el grado obtenido por la limpieza y desinfección realizada en dos pasos (Stekelenburg y Harlog, 1999).

#### **2.5. Estudios para determinar la eficacia de la higienización de superficies.**

Se ha estudiado la efectividad de los desinfectantes en pruebas de laboratorio e *in situ*, pero una vez se establece la efectividad bajo condiciones de uso, rara vez se ha intentado comparar esos resultados con los obtenidos en las pruebas de laboratorio. En una proporción significativa de situaciones prácticas, las superficies facilitaban la adhesión y/o desarrollo de biofilms. La resistencia de los biofilms naturales a los biocidas puede ser muy diferente a los preparados en laboratorio (Brown y Gilbert, 1993; Bloomfield, 1995). Además, la efectividad de los higienizantes químicos se ve limitada, cuando se utiliza en el hogar, por la presencia de suciedad y agua dura (Gibson y cols., 1999; Kim y Frank, 1995).

Dos estudios comparativos de Bloomfield y cols. (1991) y (1993) en los que estudiaron el intervalo de desinfección logrado por los productos más comúnmente utilizados en el Reino Unido, utilizando las normas Europeas para pruebas de suspensión y de superficies, indicaron que la mayoría de los productos, a las concentraciones de uso recomendadas, producían una reducción superior a 5 Log en el recuento de microorganismos viables (indicado por la no presencia de supervivientes) en 5 minutos de exposición. Pero las mismas concentraciones de algunos de los productos producían una reducción de sólo 2-4 Log cuando se probaban contra los mismos microorganismos en superficies secas.

Bessems (1998) demostró que, en una prueba en suspensión, se necesitaba una concentración 9.2 veces mayor de solución de hipoclorito para alcanzar una reducción de 5 logaritmos de *S. aureus* bajo condiciones sucias, frente a la necesaria para condiciones limpias.

Scott y cols. (1984) demostraron que, antes de la limpieza, sólo 1 de cada 5 áreas de contacto con manos y alimentos seleccionados podían ser considerados como higiénicos ( $<10$  ufc/25cm<sup>2</sup>). Mientras que la mitad (56-63%) de los sitios y de las superficies se consideraron contaminados ( $>120$  ufc/25cm<sup>2</sup>). Después de una limpieza utilizando detergente, la proporción de superficies contaminadas se vio incrementada al 68% del total de superficies. Después de la aplicación de hipoclorito (en concentración de uso de 6000 ppm) sólo el 7% de las superficies permanecían contaminados. Con desinfectante fenólico la ocurrencia de contaminación se reducía al 36%. La desinfección con hipoclorito y con desinfectante fenólico incrementó el porcentaje de áreas consideradas como higiénicos al 76% y 38% respectivamente.

Borneff y cols. (1988 a) demostraron que, durante la preparación de una comida, las bacterias que provenían de la carne picada contaminada eran esparcidas sobre todos los utensilios y zonas de trabajo. El muestreo de superficies mostraba que el 60% del equipamiento de la cocina, que

presentaban dificultad para limpiarse, seguían contaminadas después de la limpieza convencional sin uso de desinfectante, mientras que el 40% seguían contaminadas después de la aplicación de peróxido de hidrógeno y el 23% después de la aplicación de hipoclorito sódico.

Los estudios llevados a cabo por Scott y cols. (1984) observaron que, aunque los productos fuesen eficaces en reducir la contaminación microbiana, los efectos eran relativamente cortos en el tiempo. Entre 90 minutos y 3 horas después, la mayoría de las superficies volvían a estar relativamente contaminadas. Esto era probablemente debido a su reutilización o, en el caso de las bayetas húmedas, al crecimiento de los supervivientes residuales no destruidos en el proceso de higienización. En un estudio adicional sobre los efectos de la aplicación diaria de desinfectante durante un periodo de 3 días, no se encontró evidencia de ningún efecto sustancial o acumulativo en términos de frecuencia sobre la cantidad de superficies catalogados como higiénicos.

Por ello Holah (1995) admite que niveles relativamente altos de microorganismos no alterantes y no patógenos en las superficies se pueden tolerar, pero la presencia de patógenos alimentarios como *Salmonella spp.* o *Listeria spp.* son inaceptables.

### **2.5.1. Tablas de cortar.**

Las tablas de cortar deben considerarse como un caso especial, por su potencial de transmitir contaminación desde los alimentos crudos hacia los cocinados y las potencialmente serias consecuencias de no alcanzar un nivel mínimo de higiene (Anónimo, 2002 a).

El exudado procedente de la carne cruda que queda en las superficies de trabajo, puede transmitir agentes infecciosos a otros alimentos, pudiendo ser peligroso si no se cocinan antes de ser comidos. Algunas bacterias se pueden incluso multiplicar desde que llegan a la superficie hasta que contaminan otro alimento (Ak y cols., 1994 a).

Las bacterias que más preocupación suscitan, en cuanto a la contaminación cruzada en las tablas de cortar de las cocinas, son principalmente de origen animal, responsables de importantes enfermedades en el hombre. Estas son conocidas como zoonosis, al ser transmitidas por alimentos. Además las bacterias responsables se pueden multiplicar a temperatura ambiente o incluso inferior. *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.* cumplen esos requisitos. *Campylobacter jejuni* puede también ser un contaminante pero no se suele multiplicar a temperatura ambiente con suficiente rapidez. *Campylobacter jejuni* y *Salmonella spp.* se han aislado, mediante escobillado, de tablas de cortar donde se ha cortado carne cruda (de Boer y Hahné, 1990). Sólo el 20% de ellas se pueden considerar poco contaminadas antes de la limpieza (menos de 10 ufc/25cm<sup>2</sup>) (Scott y cols., 1984).

Acuff y cols. (1986) contaminaron superficies de tablas de cortar de plástico y de madera con *Campylobacter jejuni*. Una de cada tipo fue lavada manualmente con agua a 45°C y detergente de lavaplatos y la otra, con un lavaplatos automático doméstico. *Campylobacter jejuni* sólo se detectó en el escobillado de la tabla de madera lavada a mano.

De este modo, el material de la tabla también parece tener importancia. Gilbert y Watson (1971) inocularon tablas de cortar de madera y plástico presionando carne de vacuno sobre ellas. La limpieza mediante inmersión en agua templada (45-50°C), conteniendo un detergente aniónico, eliminó más flora de la superficie del plástico que en la de la madera. Los resultados obtenidos para plástico, con irregularidades fruto del uso, muestran que la eliminación de esa flora se da en menor grado que en las tablas de plástico nuevo pero en mayor medida que en la madera. Sin embargo, Ak y cols. (1994) demostraron que, aunque las tablas de cortar nuevas de madera y plástico se descontaminaban fácilmente, las usadas, especialmente las de plástico, se limpiaban con más dificultad.

Un estudio llevado a cabo por Zhao y cols. (1998) demostró que las superficies de las tablas de cortar estaban más contaminadas después de cortar y manipular aves, artificialmente contaminadas con *Enterobacter aerogenes*, lo que podía provocar contaminación cruzada con vegetales preparados después en la misma tabla contaminada.

Así, al analizar, en tiempo real, muestras de ensaladas vegetales preparadas con tablas de picar y cuchillos sin lavar o mal lavados, que previamente habían sido usados para pollo crudo, estos estaban contaminados con *Campylobacter* y/o *Salmonella* procedentes del pollo crudo, en el 81% de los casos (Redmond y cols., 2002).

Debido a que las tablas de cortar de madera son porosas se ha supuesto que se limpian y desinfectan con mayor dificultad que las de plástico. El *Department of Health and Human Services* del *U.S. Department of Agriculture. Food and Drug Administration* (Anónimo, 2001 a) recomiendan encarecidamente que los consumidores usen en las cocinas tablas de plástico, no de madera. Sin embargo Ak y cols. (1994 a) indica que la madera tiene algún tipo de efecto antibacteriano que no se ha encontrado en el plástico. Así, los experimentos llevados a cabo por Ak y cols. (1994 b) muestran que la madera permite una menor multiplicación bacteriana que el plástico después de su contaminación.

Ak y cols. (1994 a) descubrieron que las recuperaciones, a partir de madera, eran significativamente menores que en plástico durante la primera hora, incluso cuando se inocularon por encima de  $10^6$  ufc. Cuando se repitió el experimento con las tablas de cortar cubiertas, con el fin de protegerlas del flujo de aire, se observó un incremento para las tablas de cortar de plástico de *Listeria monocytogenes*, mientras que se volvió a observar un descenso para las de madera. Por otra parte, el secado puede tener una influencia mínima en las tablas de madera ya que el inóculo es rápidamente absorbido.

En estos estudios preliminares, se encontraron dificultades inesperadas a la hora de recuperar bacterias de las superficies de madera, indistintamente de

la especie de origen y de si ésta era nueva o estaba usada. Estos resultados coinciden con los mostrados por Kampelmacher y cols. (1971) y Ruosch (1981) quienes necesitaron métodos destructivos para recuperar las bacterias inoculadas en las superficies, ya que estas se habían introducido en la madera. Sin embargo, las bacterias inoculadas en tablas de plástico fueron recuperadas de manera sencilla desde la superficie, independientemente del tipo de polímero y de si las tablas eran nuevas o estaban usadas. Quizás por este motivo, los análisis de laboratorio habitualmente pueden tender a infravalorar la contaminación de las tablas de madera. Sin embargo, los resultados del estudio de Ak y cols. (1994 a) evidencian una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las tablas de polietileno y las de madera. Estas reducen significativamente el número de microorganismos, mientras que las de plástico permiten su multiplicación. Además, las tablas de madera usadas se pueden limpiar con facilidad después de untarse con grasa de pollo, mientras que las de polietileno (que estaban dañadas por la acción del cuchillo) presentaban dificultades serias de limpieza incluso cuando no se aplicaba la grasa de pollo.

La aparente acción antibacteriana de la madera, común a todas las especies probadas, y poco afectada por el uso previo continúa sin explicación. Si bien (Ak y cols., 1994 a) sugerían que las bacterias no se destruyen instantáneamente durante su absorción a la madera. Estos datos parecen sugerir que el riesgo de contaminación cruzada será mínimo si las bacterias no se pueden recuperar con los medios de cultivo utilizados en esos estudios.

Con un esfuerzo de limpieza razonable, las tablas de cortar de madera se pueden usar de forma segura en las cocinas de los hogares y no son un utensilio susceptible de crear riesgos indebidos de contaminación cruzada en alimentos (Ak y cols., 1994 a), a pesar de lo cual, las tablas de este material se han contraindicado al menos durante 20 años (Ak y cols., 1994 b). Los resultados de estos autores no apoyan lo que se dice tan frecuentemente, en cuanto a que las tablas de plástico son más higiénicas que las de madera.

## **2.6. Reservorios / Diseminadores: utensilios de limpieza domésticos.**

Probablemente, la comida es la principal fuente de introducción de contaminación microbiológica en la cocina, pero el fregadero, los sifones de desagüe y alrededores, actúan como reservas donde las bacterias se pueden multiplicar. Cabe destacar que *Escherichia coli* se encontró en el 38.8% de los sifones y en el 17.8% de las superficies del fregadero. Además, estas zonas pueden actuar como diseminadores de contaminación en la cocina. Como diseminadores de contaminación también pueden actuar todas las prendas mojadas o los utensilios de limpieza mojados. Incluso, el aislamiento de enterobacterias en los alrededores de retrete sugiere que el agua que cae de la cisterna al retrete podría formar un aerosol dispersador de la contaminación (Scott y cols., 1982).

Una observación importante es que, durante la limpieza, los microorganismos son transferidos desde las superficies a las telas de limpieza y que pueden, potencialmente, provocar contaminación cruzada (Kusumaningrum y cols., 2003).

Usar correctamente bayetas, trapos y accesorios, como las esponjas, es importante, ya que desempeñan un papel importante en la higiene ayudando a desincrustar partículas de las superficies y pueden eliminar una proporción significativa de la suciedad y de los microorganismos presentes en esa superficie. Sin embargo, como frecuentemente permanecen húmedas durante largos periodos de tiempo y siempre retienen alguna suciedad residual, proporcionan a los microorganismos condiciones ideales para su multiplicación. Cuando se usan en muchas superficies consecutivamente, los trapos pueden recoger contaminación de una superficie y redepositarla en otra. Por la naturaleza de su función, representan un riesgo serio en términos de su capacidad para incrementar la exposición de los miembros de la familia a los microorganismos peligrosos. Los procedimientos de higiene aplicados a los trapos de cocina, de este modo, tienen un papel importante en la prevención de la diseminación de los microorganismos por las superficies en el hogar (Anónimo, 2002 a).

En el estudio de Scott y cols. (1984) se enfatiza especialmente en el peligro que pueden suponer los trapos, bayetas y otros utensilios mojados de limpieza. Aunque estos utensilios se sequen después de usar (cosa que no suele suceder) es necesario una efectiva descontaminación adecuada, antes y después de su uso, para evitar que sirvan como reservorio o como diseminadores de contaminación microbiana en la cocina, lavabo y baño.

Scott y Bloomfield (1990 b) investigaron a cerca de la efectividad de los procedimientos de higiene para la descontaminación de trapos y bayetas después de haber sido utilizados en el hogar. Los niveles de contaminación variaban desde  $10^2$  hasta  $10^6$  ufc/cm<sup>2</sup>. En los trapos y bayetas contaminadas Scott y Bloomfield (1990 b) encontraron que las bacterias se pueden multiplicar rápidamente, sobre todo a temperatura ambiente y particularmente cuando estos trapos y bayetas se guardan húmedos.

Kusumaningrum y cols. (2003) demostraron que los microorganismos son rápidamente dispersados de las esponjas de cocina a las superficies, con ratios de transferencia entre el 20 al 40%.

Además, cuando una persona enferma o portadora está en casa, la colada puede quedar contaminada y tiene el riesgo de transferirse en la lavadora (Manafi, 2003).

Por estos motivos Scott y Bloomfield (1993) sugieren que se podrían llevar a cabo significativas mejoras en la higiene de la cocina asegurándose que las bayetas contaminadas no son usadas para la preparación de comida. Los esfuerzos se deben centrar en prevenir la transferencia de bacterias de un lugar a otro, en vez de en conseguir una total eliminación de las bacterias de esos lugares (Scott y cols., 1984).

### 2.6.1. Procedimientos de higiene para los utensilios de limpieza.

Los resultados obtenidos por Scott y Bloomfield (1990 b) y Cogan y cols. (2002) mostraron que la limpieza con productos detergentes con aclarado, producía ninguna o una pequeña reducción en los niveles de contaminación, lo que indicaba que los microorganismos estaban fuertemente adheridos a las fibras del tejido. Por el contrario, el hipoclorito y los desinfectantes fenólicos producían una reducción significativa en la contaminación microbiana, si bien el hipoclorito conseguía mejores resultados que los fenólicos. Si además, las ropas contaminadas se almacenan en condiciones húmedas durante toda una noche, las células se adhieren aún con más fuerza. Para prendas almacenadas toda la noche, incluso donde se había lavado y aclarado, se encontró que el 40% de ellas estaban contaminadas con recuentos superiores a 100 ufc/cm<sup>2</sup> (Cogan y cols., 2002). Por ello, las telas guardadas durante toda la noche frente a otras lavadas inmediatamente después de ser utilizadas, la limpieza con detergente, con o sin aclarado, fue significativamente menos efectiva ( $p < 0.05$ ) para reducir tanto el recuento de totales como el de *Salmonella*, aunque la limpieza con aclarado produce una mayor reducción tanto el recuento de totales como el de *Salmonella* comparado con el método de lavado sin aclarado (Cogan y cols., 2002). Así, cuando los tejidos utilizados en la limpieza son reutilizables, después del primer uso y lavado, su efecto antibacteriano se ve muy mermado o incluso desaparece (Kusumaningrum y cols., 2003).

Cuando se elige la desinfección química para la reducción bacteriana en telas de limpieza, los desinfectantes se deben aplicar de manera correcta (Ej., correcta concentración y correcto tiempo de exposición). La actividad biocida de los desinfectantes, como el hipoclorito sódico, se ve alterada por factores externos. Por ejemplo, la materia orgánica del entorno interfiere con el cloro libre, lo que provoca un descenso en la efectividad del hipoclorito sódico, como se ha demostrado en las pruebas de suspensión en condiciones sucias, comparado con las pruebas en condiciones limpias (Kusumaningrum y cols., 2003). De igual modo en las telas, cuando la materia orgánica del entorno está presente, lo cual ocurre habitualmente en

las situaciones prácticas, la efectividad de un desinfectante será menor, requiriéndose mayores concentraciones (Kusumaningrum y cols., 2003).

Los resultados demuestran que el almacenamiento postdesinfección produce un crecimiento de los supervivientes residuales, incluso en algunos tejidos que estaban aparentemente estériles, inmediatamente después de la desinfección (Anónimo, 2002 a).

En cualquier caso, cuando los utensilios de limpieza están muy contaminados, ningún desinfectante puede ser considerado como satisfactorio (Anónimo, 2002 a).

Así, el IFH considera que, como rutina, todas las bayetas, trapos y esponjas no desechables se deben transformar en higiénicas con un procedimiento higiénico que incluya la limpieza y desinfección, ya sea por la acción del calor o de un desinfectante químico. Si las piezas de ropa han estado muy contaminadas, durante un largo periodo de tiempo, la desinfección sólo es posible conseguirla por la aplicación de calor durante un largo periodo de tiempo. En cualquier caso, las piezas de ropa deben secarse inmediatamente después de la descontaminación para almacenarse secas hasta el siguiente uso, con el fin de prevenir el recrecimiento de la contaminación residual (Anónimo, 2002 a).

#### **2.6.2. Estudios en el ámbito doméstico para evaluar la efectividad de los procedimientos de higiene para prevenir la contaminación cruzada vía telas de limpieza.**

La materia orgánica puede interferir con el hipoclorito o proteger a los microorganismos del contacto directo con los desinfectantes. Como se observó con el microscopio electrónico de barrido, las bacterias se encontraron en las telas de limpieza de los hogares cubiertas con materia orgánica del entorno (Kusumaningrum y cols., 2003).

El cloro libre (2 a 500 ppm) es activo frente a bacterias vegetativas, en entornos con baja materia orgánica (Bessemis, 1998). Sin embargo, a concentraciones de 500 ppm de hipoclorito, los niveles de *Salmonella enteritidis* y *S. aureus* no se redujeron de manera reseñable cuando las pruebas se hicieron sobre los utensilios de limpieza, incluso cuando no había materia orgánica interfiriendo. La estructura de los utensilios de limpieza (trapos, bayetas, etc.) puede ofrecer un microentorno protector donde la adhesión microbiana y el crecimiento se vean facilitados. Además, en trapos contaminados de manera natural en las casas, 2400 ppm de solución de hipoclorito (concentración recomendada por el fabricante) no produjeron una reducción total de la microflora de las telas aunque, en algunos casos, se pudo observar una reducción de más de 4 unidades logarítmicas (Kusumaningrum y cols., 2003).

Generalmente, los niveles de contaminación de las superficies cuando se limpiaban con detergente fueron superiores en el día 2 después de un uso prolongado de la bayeta. Por el contrario cuando se aplicaba amonio cuaternario sólo, dos de las 24 superficies mostraron un incremento del recuento después de la limpieza (Scott y Bloomfield, 1993).

Por todo ello, cuando bacterias como *S. aureus*, u otras bacterias oportunistas, tienen que ser eliminadas, se recomienda el uso de trapos y bayetas desechables impregnadas con desinfectante (Kusumaningrum y cols., 2003).

## **2.7. Zonas reservorio.**

Bloomfield y Scott (1997) destacaron el potencial de los lugares húmedos como reservorios de microorganismos, con el consecuente riesgo de diseminación de la contaminación. En la misma línea, Tierney y cols. (2003) concluyeron que el entorno del fregadero de la cocina es uno de los principales reservorios para los microorganismos en el entorno de la cocina doméstica.

Por ello, se ha manifestado preocupación en cuanto a que se pueda establecer una contaminación cruzada ente el fregadero y la vajilla (Meredith y cols., 2001).

Las juntas metal/metal o metal/plástico suelen ser lo suficientemente fuertes para prevenir la acumulación de residuos de productos, pero pueden permitir la entrada de microorganismos que pueden quedar protegidos de este modo frente a los programas de higienización (Holah, 1995).

En otro punto conflictivo, los sifones, Scott y cols. (1984), encontraron que aunque la desinfección era efectiva para reducir la contaminación microbiana comparada con la limpieza hecha con detergente exclusivamente, los efectos eran relativamente cortos. Cuando los sifones eran remuestreados 90 y 180 minutos después de la desinfección, la frecuencia de aparición de sitios contaminados volvía a niveles similares a los previos a la desinfección.

Los sitios del hogar, como las tazas del inodoro, los sifones, alcachofas de ducha, el lavadero de manos y el rebosadero de la bañera, se pueden convertir en reservorios de microorganismos, bien permanentemente o bien esporádicamente. Esto incluye bacterias oportunistas y patógenas. La presencia de humedad y ciertas cantidades de suciedad en esos sitios proporciona un sustrato ideal para albergar el crecimiento de una población de microorganismos. Las irregularidades en las superficies del fregadero o de las tazas del inodoro también pueden retener microorganismos (Anónimo, 2002 a).

Más allá del riesgo que se atribuye al lavabo, el IFH considera que, aunque el depósito de microgotas procedentes de la formación de un aerosol (que consecuentemente puede ser transferido a otras zonas del lavabo incluido superficies de contacto con las manos como el asiento del lavabo o el tirador de la cadena) puede suceder como resultado del vaciado de la cisterna, los resultados de la exposición a los patógenos procedentes de la taza del inodoro son relativamente bajos, en condiciones normales, en hogares donde las familias son sanas. Sin embargo donde los miembros de la familia

tienen diarreas fluidas, la transmisión de la infección vía esta ruta (rociando con el aerosol formado) puede ser incluso un riesgo real (Anónimo, 2002 a).

La desinfección rutinaria, así como la limpieza de los lavamanos, sifones, rebosaderos y desagües se considera la manera apropiada de prevenir el establecimiento de biofilms en esas zonas (Anónimo, 2002 a).

### **2.7.1. Estudios de laboratorio y en el hogar para medir la efectividad de los procedimientos de higiene en el lavabo.**

Muchos factores influyen en la eficacia de los desinfectantes, como por ejemplo la temperatura, pH, presencia de materia orgánica, composición de la superficie, lo que hace difícil predecir su eficacia (Sykes, 1967). Las pruebas de laboratorio son ciertamente útiles para evaluar la acción de los desinfectantes; pero no se las debe considerar como definitivas, sino como preliminares a las pruebas de campo (Tamási, 1995). Si bien las pruebas en condiciones de uso son difíciles y caras de llevar a cabo, para la mayoría de los desinfectantes la aprobación se consigue con los resultados de laboratorio. No obstante, para la comparación de los desinfectantes con las pruebas estandarizadas que están aceptadas internacionalmente, hay que hacer también las pruebas de campo para comprobar y verificar su actividad (Bloomfield y cols., 1994). No sólo se cuestionan los límites de fiabilidad de las pruebas realizadas en laboratorios, sino que plantea a la vez el problema más basto de cómo hacer la correlación entre una evaluación realizada en laboratorio y las condiciones sobre el terreno (Tamási, 1995).

La naturaleza e irregularidad del suelo hacen más difícil su desinfección que otras superficies. Por tanto si un método demuestra que el desinfectante ha sido efectivo en el suelo, las otras superficies probablemente se habrán desinfectado satisfactoriamente (Tamási, 1995).

### **2.7.1.1. Toma de muestras.**

No hay métodos estandarizados para recuperar microorganismos de las superficies (Ak y cols., 1994 b).

El momento de recoger las muestras es otro aspecto importante de la prueba. Las muestras para pruebas microbiológicas no se deben tomar de superficies húmedas. Por una parte, los desinfectantes pueden seguir actuando en una superficie húmeda y podría suceder que la actividad desinfectante no se hubiera alcanzado completamente. Por otra parte, los residuos de desinfectante en esa muestra podrían evitar el crecimiento de los microorganismos en el medio de cultivo. Neutralizar el desinfectante con un antagonista antes de tomar las muestras, en campo, no tiene sentido. Se debe permitir que se seque el suelo antes de tomar las muestras para cultivo (Tamási, 1995).

Uno de los mayores problemas es alcanzar una recuperación suficiente de supervivientes de las superficies (Bloomfield y cols., 1994).

### **2.8. Suelos, paredes y otras superficies del hogar.**

Para la mayor parte de los riesgos de exposición a patógenos, como resultado de la contaminación microbiana en suelos, adornos del hogar, etc., el peligro se considera muy bajo (Anónimo, 2002 a). Por ello Scott y cols. (1984) aseguran que en superficies secas, como paredes y suelos, no hay razones que justifiquen el uso de desinfectantes, con un buen detergente basta.

La excepción a esto es el crecimiento de moho que se considera como un riesgo real para la salud. Se considera que donde hay presencia de moho este debe ser eliminado usando agentes limpiadores, como detergentes que contengan hipoclorito sódico, lo que optimiza la separación del moho de las superficies (Anónimo, 2002 a).

Ayliffe y cols. (1966) demostraron que cerca del 90% de la contaminación del suelo podía ser eliminada con una limpieza a base de agua y jabón exclusivamente, pero la contaminación microbiana puede volver a niveles de antes de la limpieza en unas pocas horas. Estos mismos autores demostraron también que aunque la contaminación podía ser reducida en mayor grado por la acción de los desinfectantes, la recontaminación a niveles de prelimpieza/desinfección sucede en un corto periodo de tiempo.

La desinfección es una acción a realizar, además de la limpieza, y se recomienda también para paredes, suelos o superficies donde haya restos de materia orgánica. Esto puede resultar difícil cuando se mezcla con tejidos, en cuyo caso, la desinfección con vapor es la única solución. Si el material se considera especialmente infeccioso es aconsejable aplicar desinfectante al material contaminado antes de su limpieza, con el fin de proteger a la persona que hace la limpieza. El desinfectante debe entonces ser reaplicado a la superficie después de la limpieza (Cheesbrough y cols., 1997).

Los compuestos de amonio cuaternario son recomendados habitualmente para suelos, paredes y containers y para las superficies que pueden ser desinfectadas durante largos periodos de tiempo o que no requieren aclarado antes de producción de alimentos (superficies que no contactan con alimentos) (Giese, 1991).

Hay muy poca evidencia para indicar que la desinfección de suelos deba ser considerada en hogares donde haya niños pequeños, especialmente donde se encuentren animales de compañía (Anónimo, 2002 a). Si bien, estudios recientes de casas en las cuales hayan niños infectados con *Salmonella*, se sospecha que el entorno junto con los miembros de la familia y animales de compañía, sean factores de riesgo más significativos que los alimentos contaminados (Schutze y cols., 1999).

## **2.9. Detergentes y desinfectantes:**

### **2.9.1. Detergentes:**

Los surfactantes orgánicos (superficie-activos o agentes humectantes) están compuestos de una cadena larga no polar (hidrofóbica) y una cabeza polar (hidrofílica). Los surfactantes están clasificados como aniónicos, catiónicos o no iónicos, dependiendo de su carga iónica en solución. Aniónicos y no iónicos se utilizan más comúnmente que los surfactantes catiónicos. Las moléculas anfipolares ayudan a limpiar mediante la reducción de la tensión superficial del agua, de este modo incrementan la humectabilidad y emulsifican grasas (Holah, 1995).

### **2.9.2. Desinfectantes:**

En 1978 el Consejo de Europa puso en marcha una iniciativa para armonizar los métodos de prueba de desinfectantes para la higiene alimentaria (Bloomfield y Looney, 1992).

La prueba se modificó adecuadamente y fue publicada de nuevo en 1987 (Anónimo, 1987; 1988) como el método para la prueba de la actividad antimicrobiana del desinfectante para la higiene alimentaria.

En noviembre de 1989, el Comité Europeo CEN TC 216 estableció los parámetros para alcanzar la armonización de las pruebas microbiológicas para antisépticos y desinfectantes, no sólo para la higiene alimentaria, sino también para las prácticas de medicina, agricultura y veterinaria. Los borradores de las pruebas para el ensayo de productos bactericidas y fungicidas se cambiaron por el "European Suspension Test" (EST) de 1987 para la higiene alimentaria simplificado y se incluyó sólo *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *C. albicans* (y posiblemente *A. niger*) (Bloomfield y Looney, 1992).

En 1989 el comité europeo CEN TC 216 estableció la armonización para los métodos de prueba de desinfectantes y antisépticos usados en higiene

alimentaria, medicina, agricultura y prácticas veterinarias. El comité estableció que las pruebas debían comprender dos fases: fase 1 para establecer los estándares mínimos de actividad bactericida, fungicida y esporicida y fase dos que implica pruebas de laboratorio en suspensión y pruebas de superficie simulando condiciones de uso (Bloomfield y cols., 1991).

Para recomendar un desinfectante o antiséptico para un determinado uso, los productos deben ser sometidos a una prueba posterior que se hace en la fase 2 y que corresponde a pruebas de suspensión y en superficie. Estas pruebas se formulan de acuerdo al área al que se vaya a destinar el producto. Las pruebas de suspensión deben seguir el procedimientos de la fase 1, pero deben incluir nuevas cepas, productos diluyentes (agua de una dureza estandarizada), sólidos orgánicos (1% peso / volumen), tiempos de contacto (5, 30, 60 minutos) y temperaturas apropiadas para el uso (Bloomfield y cols., 1991).

La actividad bactericida de un producto deberá evaluarse utilizando los cuatro organismos de ensayo siguientes: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus hirae* (Anónimo, 1998 c).

Según Heinzl (1998) la susceptibilidad intrínseca (tolerancia) de los microorganismos a los agentes químicos varía dependiendo de las especies y de los agentes antimicrobianos.

Según la norma española (UNE-EN 1040) los requisitos que debe cumplir un desinfectante son los siguientes: Cuando el producto se somete al ensayo de acuerdo con el capítulo 5, deberá demostrar una reducción logarítmica al menos igual a 5 del número de células viables, cuando los organismos del ensayo son *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* en un máximo de 60 minutos (Anónimo, 1997 c). Sin embargo AOAC Internacional (Anónimo, 2000 c) dice que para que un desinfectante sea considerado

efectivo tiene que reducir el recuento microbiano en 5 Log después de exponer a dicha población al producto durante 30 segundos.

Además, para tratamiento de superficies inanimadas, Bloomfield y cols., (1991), proponen que el periodo de contacto sea de 5 a 60 minutos. Para la desinfección manual se pide una reducción de 3 Log durante 1 minuto.

La formica y el acero inoxidable han sido los materiales elegidos para las pruebas de superficie. Estas superficies permiten una gran variedad de aplicaciones prácticas y, probablemente debido a que son lisas e impermeables, generalmente se nombran como superficies que proporcionan una mayor consistencia en los resultados que algunos otros tipos de superficies (Werner y cols., 1977).

El hipoclorito sódico (concentración 10-14% peso / volumen de cloro libre) alcanzó la reducción mínima de 4.5-5 Log frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa* y una reducción de 4 frente a *C. albicans* (el mínimo requerido para la fase 1) en 5 ó 60 minutos. Sin embargo, este se vio inactivado en presencia de 1% de albúmina y fue necesaria una concentración de 2500 ppm, para alcanzar la actividad requerida por la prueba. Cuando la concentración de albúmina se redujo a 0.5% fue suficiente una concentración de 1000 ppm para conseguir una reducción de 4 Log frente a *S. aureus* (Bloomfield y cols., 1991).

En este estudio se observa como los desinfectantes fenólicos y el hipoclorito son mucho más efectivos a la hora de disminuir la carga microbiana que el detergente con agua caliente que apenas tiene efecto (Scott y cols., 1984).

Repetidas exposiciones al hipoclorito provocaron un incremento de la susceptibilidad de los microorganismos a este producto, principalmente debido a daño en la membrana. Después de la primera exposición al hipoclorito, con concentraciones de 650 ppm en medio "Brain Heart Infusion" durante 30 minutos, se observó daño en la membrana en más del 70% de la población. En la siguiente exposición se causó aún más daño, esta vez la

práctica totalidad de las células murieron (Kusumaningrum y cols., 2003). La integridad de la membrana es importante para la estructura de las proteínas y para la integridad del DNA (Booth, 2002).

Los amonios cuaternarios son desinfectantes surfactantes catiónicos que además tienen actividad limpiadora (McEldowney y Fletcher, 1987). Se suelen aplicar como jabón, lo que proporciona un contacto más largo en las superficies, como tuberías, paredes y techos. QAC es efectivo contra Gram positivos y Gram negativos, mohos y levaduras (Carsberg, 1996). No es corrosivo ni irritante y su actividad no se ve afectada por la carga orgánica.

### **2.10. Objetivos.**

Los objetivos del presente trabajo son:

- i) Conocer la magnitud y distribución de la contaminación microbiológica de las superficies más importantes de los hogares urbanos de España.
- ii) Identificar las especies microbiológicas que predominan en esas superficies. Especialmente las que se encuentran entre las enterobacterias y las del género *Staphylococcus*.
- iii) Estudiar la eficacia desinfectante en el hogar de algunos de los productos más utilizados en este ámbito.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS.**

#### **3.1. Sensores.**

Los sensores son unos discos de acero inoxidable de 2 centímetros de diámetro y 1 milímetro de grosor. Son ligeramente convexos, con una altura máxima, en el centro, de 1 milímetro.

Se adhieren a la superficie que se va a controlar mediante un pegamento. La ligera curvatura que presenta el sensor se utiliza por su parte cóncava para poner el adhesivo que lo unirá a la superficie de estudio. Por lo tanto, la cara convexa es la que queda expuesta al ambiente y la que realmente va a contener a los microorganismos que queden retenidos procedentes del entorno en el que esté colocado el sensor.

El sensor permanece en la localización que ha sido colocado durante un periodo que oscila entre una semana en el estudio de eficacia desinfectante y un mes en el de muestreo de la contaminación microbiológica de las superficies del hogar. En ese tiempo, al estar colocado ininterrumpidamente sobre una superficie determinada, se va a ensuciar, va a recibir la misma contaminación y se va a limpiar y desinfectar exactamente igual que la superficie que se pretende estudiar.

#### **3.2. Preparación de los sensores.**

Se parte de unos discos de acero inoxidable, comprados a una industria metalúrgica. Esos discos, dado que proceden directamente de la fábrica, tienen restos de suciedad y grasa, propios de este tipo de industria. Restos que deben ser completamente eliminados antes de su utilización.

Si la finalidad del sensor es mimetizar microbiológicamente la superficie que va a ser estudiada, este deberá estar completamente libre de cualquier tipo de

microorganismo en el momento de su colocación. Para lograrlo se realiza un proceso de limpieza y otro de desinfección antes de su colocación como sensor de superficie.

El proceso de limpieza consiste básicamente en la eliminación de la grasa y de restos de suciedad macroscópica de los discos que permitan después alcanzar una esterilización eficaz del disco. La limpieza se lleva a cabo de la siguiente manera:

- i) Inmersión de los discos en una solución acuosa de detergente marca “DINO-dis-Dipol” al 5% en agua durante 1 hora. Este es un detergente que contiene entre 20-30% de tensioactivos aniónicos. Durante la hora de inmersión se agitan los discos 2 veces con la mano. La mano debe estar siempre protegida por un guante de látex.
- ii) Enjuagado abundante con agua destilada hasta que esta salga prácticamente limpia. Se evita tocar los discos directamente con las manos.
- iii) Inmersión en baño con alcohol isopropílico (2-propanol) al 70% en agua, durante 15 minutos. Con este último paso se hace una desinfección parcial del disco y se favorece el secado de los mismos después del enjuagado.
- iv) Extensión de los discos sobre papel de filtro limpio para que completen el secado. En este paso y los sucesivos los discos se manipularán exclusivamente con pinzas limpias, si bien no es necesario que sean estériles.

Después del proceso de limpieza y una vez seco el disco se le adhiere el pegamento por la parte cóncava del disco. Este es el pegamento que permitirá posteriormente la unión del disco a la superficie. Una vez cada disco tiene su

adhesivo se introducen en bolsas especiales de esterilización, de diez en diez. Posteriormente se procede a su sellado con una selladora térmica, que funde el plástico de la bolsa y queda herméticamente cerrada al paso de microorganismos. Estas bolsas llevan un indicador de color que muestra si el tratamiento térmico recibido ha sido el esperado.

Finalmente se procede a su esterilización mediante el autoclavado a 121,5 °C durante 15 minutos. En este paso se eliminarán los microorganismos que aún después del proceso de limpieza y desinfección parcial, realizado hasta el momento, permanezcan en él.

### 3.3. Distribución.

Los sensores se colocaron en cinco puntos de doscientas cincuenta casas de cuatro grandes ciudades españolas. Las ciudades elegidas fueron Barcelona, Madrid, Bilbao y Sevilla ya que son ciudades representativas de la situación urbana española. De esta manera se puede evaluar cual es la situación actual de riesgo en los hogares de la España urbana en la que se dispone de poco tiempo de dedicación a la limpieza del hogar.

En cada uno de los puntos se colocaron dos sensores. Las cinco localizaciones fueron:

- i) **Desagüe de la bañera;** los sensores se colocaron justo al lado de la rejilla metálica que está en el desagüe.
- ii) **Pulsador de la cadena o retrete;** en los hogares que había pulsador los sensores se colocaron al lado de este, en cambio en aquellos en los que se accionaba el vaciado de la cisterna mediante una cadena o mecanismo diferente al pulsador, se colocaban los dos sensores en la superficie más cercana al mecanismo y

- se les comentaba a los habitantes del domicilio la necesidad de tocar el sensor como si fuese la cadena.
- iii) **Desagüe del fregadero de la cocina;** al igual que en la bañera los sensores se colocaron justo al lado de la rejilla metálica que está en el desagüe.
  - iv) **Tirador de la puerta del frigorífico;** en las neveras que tenían un tirador lo suficientemente ancho se colocó el tirador justo en la parte interior del mismo, allí donde contactan las manos. En las neveras en las que el tirador no mostraba una superficie suficientemente amplia los sensores se colocaron sobre la puerta a la altura en la que el tirador proyecta su sombra.
  - v) **Suelo de entrada al domicilio;** en este punto los sensores se colocaron sobre la zona en la que se suele pisar cuando uno entra de la calle, pero siempre fuera de la zona de batida de la puerta de entrada.

### 3.4. Codificación de los discos.

Debido al enorme número de discos distribuidos se procedió a marcar cada uno de los discos con su respectiva placa de Petri con una codificación sencilla pero inequívoca. Se construyó un código compuesto de tres números separados entre sí por barras inclinadas. Así pues se otorgó un número que iba del 1 al 250 para cada una de las casas que participaban en el estudio. En segundo lugar, detrás de la primera barra inclinada, iba un número comprendido entre el 1 y el 5 que correspondía a cada uno de los cinco puntos donde se situaban los discos dentro de la casa. Se describen a continuación a que punto corresponde cada uno de los cinco números:

Punto 1: Desagüe de la bañera.

Punto 2: Pulsador de la cadena o retrete.

Punto 3: Desagüe del fregadero de la cocina.

Punto 4: Tirador de la puerta del frigorífico.

Punto 5: Suelo de entrada.

Por último y detrás de la segunda barra inclinada se encuentra una cifra de carácter binario. El valor uno (1) se le asignan a los discos en los que se harán recuentos de enterobacterias y el valor dos (2) para los que se recontarán bacterias capaces de crecer en medio de cultivo Baird-Parker y reducir el telurito de potasio a 37°C en 24-48 horas y específicamente *Staphylococcus aureus*<sup>1</sup>.

### **3.5. Medios de cultivo.**

Una vez recuperados los sensores, se analizaban mediante recuento en placa. Se buscaron dos grupos de microorganismos. Enterobacterias y bacterias capaces de crecer en medio de cultivo Baird-Parker con RPF y reducir el telurito de potasio, con o sin formación de halo traslucido, en 48 horas a 37 °C  $\pm$  1 °C. Para ello se introducía el sensor en una placa de Petri a la que se le añadían 20 mililitros, aproximadamente, de un medio de cultivo selectivo y diferencial. Como para cada punto del hogar había dos sensores uno se cubría con “Violet Red Bile Glucose” (VRBG) (bioMérieux, Marcy L’Etoile, Francia), para el recuento de enterobacterias y el otro con Baird Parker con “Rabbit Plasma Fibrinogen” (RPF) (bioMérieux, Marcy L’Etoile, Francia).

#### **3.5.1. VRBG “Violet Red Bile Glucose”**

El sensor se introduce en otra placa de Petri en la que será vertido el medio de cultivo selectivo y diferencial para enterobacterias, VRBG.

---

<sup>1</sup> Todos los sensores son idénticos. El hecho que se analice un grupo bacteriano u otro sólo depende del medio de cultivo en el que se sumerja el sensor después del periodo de muestreo en la casa. Los sensores sumergidos en medio VRBG permitirán el crecimiento de enterobacterias mientras que los que se cubran con Baird-Parker permitirán el crecimiento de otro grupo bacteriano entre los que está *S.aureus*.

**3.5.1.1. Formula en gramos/litro:**

<b>Compuesto</b>	<b>g/L</b>
Peptona de carne	7
Extracto de levadura	3
Glucosa	10
Sales biliares	1,5
Cloruro sódico	5
Rojo neutro	0,03
Cristal violeta	0,002
Agar bacteriológico	13

**3.5.1.2. Principio:**

El medio contiene cristal violeta y sales biliares que inhiben el crecimiento de la flora acompañante Gram positiva. La presencia del rojo neutro permite que se forme un halo violeta al borde de las colonias debido a la acidificación provocada por el metabolismo de la glucosa y precipitación de las sales biliares. Las colonias de enterobacterias adquieren, en este medio, coloración violácea.

**3.5.1.3. Preparación:**

Se funde el contenido de la botella de 200 ml, al baño maría y se deja enfriar hasta 42-45 °C. Se vierte inmediatamente sobre la placa de Petri.

**3.5.2. Baird-Parker con RPF**

El otro sensor se introduce en una placa de Petri en la que será vertido el medio de cultivo, selectivo y diferencial, Baird Parker con RPF.

**3.5.2.1. Fórmula en gramos/litro:**

Compuesto	g/L
<b>R1</b>	
Peptona	10
Extracto de levadura	1
Extracto de carne	5
Cloruro de litio	5
Piruvato de sodio	10
Glicina	12
Agar	12,5
<b>R2</b>	
Fibrinógeno bovino	3,75
Plasma de conejo	25 (ml)
Inhibidor de tripsina	25 (mg)
Telurito de potasio	25 (mg)

**3.5.2.2. Principio:**

El agar Baird Parker con RPF (Rabbit Plasma Fibrinogen) está basado en la fórmula de Beckers (1984). Se utiliza para el recuento sin confirmación de los estafilococos coagulasa positivos en los productos alimentarios. Su fórmula corresponde a la descrita en las normas ISO/CD 6888-2 (1999) y NF V 08-057-2.

El medio Baird Parker contiene una base nutritiva rica tanto en glicina como en piruvato de sodio, que tiene como papel estimular el crecimiento de las cepas que han sufrido alteraciones ligadas al proceso de elaboración de los productos alimentarios. La selectividad frente a especies distintas a *Staphylococcus aureus* es aportada por el cloruro de litio y por el telurito de potasio, que provoca el viraje al negro de las colonias que lo reducen.

El suplemento RPF contiene plasma de conejo y fibrinógeno de buey que permiten poner en evidencia la actividad de la coagulasa y un inhibidor de la tripsina para evitar la fibrinólisis total o parcial de los halos formados en torno a las colonias coagulasa positivas.

### **3.5.2.3. Preparación:**

Se funde al baño maría el agar del frasco de R1 y se deja enfriar hasta los 45-47 °C. Al frasco R2 se le añaden 10 ml. de agua destilada estéril a 37 °C y se mezcla suavemente hasta la disolución completa. Se procede a vaciar el contenido de R2 en R1, se agita suavemente hasta su completa homogeneización y se utiliza inmediatamente.

### **3.6. Recuentos.**

Para llevar a cabo el recuento de microorganismos se procedió a la recuperación de los sensores colocados en los hogares. Debido a su gran cantidad ( $250 \times 5 \times 2 = 2500$ ) se mantuvieron en frío hasta el momento del análisis y recuento.

Para realizar el recuento se tomó cada uno de los dos sensores situados en cada uno de los cinco puntos del hogar y se procedió con el medio de cultivo, como se ha especificado en el apartado anterior.

Se hicieron recuentos para tres grupos diferentes de microorganismos; Enterobacterias, Bacterias capaces de crecer en medio de cultivo Baird-Parker con RPF y reducir el telurito de potasio en 48 horas a 37°C y *Staphylococcus aureus*.

*Staphylococcus aureus* se diferenciaba del resto por su capacidad proteolítica que producía un halo traslucido, característico en el medio de cultivo.

En cada placa de VRBG se hacían tres recuentos diferentes:

- i) **Enterobacterias:** Eran todas aquellas colonias bien diferenciadas que crecían en el medio tanto adheridas al disco como libres en él en 24 horas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- ii) **Enterobacterias adheridas:** Eran todas aquellas colonias bien diferenciadas que crecían en el medio adheridas al sensor en 24 horas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- iii) **Biofilm:** No se hacía más que un análisis cualitativo de presencia o ausencia. El biofilm se presentaba como una mancha uniforme de color rojo que crecía alrededor del sensor.

En cada placa de Baird Parker con RPF se hacían cuatro recuentos diferentes:

- i) **Bacterias RPF:** Eran todas aquellas colonias bien diferenciadas sin halo alrededor que crecían en el medio y reducían el telurito de potasio, tanto libres como adheridas al disco en 48 horas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- ii) **RPF adheridas:** Eran todas aquellas colonias bien diferenciadas sin halo que crecían en el medio y reducían el telurito de potasio, adheridas al sensor en 48 horas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- iii) ***Staphylococcus aureus*:** Eran todas aquellas colonias bien diferenciadas con halo traslucido alrededor que crecían en el medio en 48 horas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- iv) **Biofilm:** No se hacía más que un análisis cualitativo de presencia o ausencia. El biofilm se presentaba como una mancha uniforme de color negro que crecía alrededor del sensor.

### 3.7. Estadística y aislamiento.

Una vez recontadas todas las placas se procedió a la extracción de 1932 cepas para su identificación. Las cepas se aislaron manteniendo las proporciones de recuentos que habían proporcionado los diferentes puntos y los dos diferentes grupos con sus correspondientes subgrupos. Así, si para el punto uno de las casas había un recuento elevado de este se seleccionaban un mayor número de cepas que de otro donde la estadística dijera que el recuento era menor. De igual modo se hizo para aislar un 44% de Enterobacterias respecto a un 56% de colonias formadas en Baird-Parker.

No se aislaron de forma diferencial entre las casas, puesto que la estadística nos dijo que las diferencias entre casas no eran significativas para ninguno de los grupos. Se aislaron un mayor número en aquellas en que el recuento fuese superior.

Para el caso de las Enterobacterias sólo había dos grupos. El primero que se denominaba así y correspondía al recuento de todo lo que hubiese en la placa. El segundo de los grupos era "Enterobacterias Ad". A este grupo pertenecían aquellas que crecían adheridas al sensor en el medio VRBG. Por tanto a la hora de aislar las cepas para el primer grupo se podía tomar cualquier colonia que hubiese en la placa estuviese o no adherida. Para el segundo sólo se podían aislar las que habían crecido encima del sensor. De este grupo apenas se separaron 100 cepas ya que cuantitativamente era un grupo poco importante. Para su aislamiento se siguió prácticamente la misma metodología que para los biofilms.

Para Baird-Parker con RPF se hicieron tres grupos:

- i) RPF.
- ii) RPFAd.
- iii) *S. aureus*.

RPF representaba absolutamente todo lo que hubiera en la placa, estuviese o no adherido al sensor y fuese o no *S. aureus*. “RPF Ad” eran todas las colonias que no fuesen *S. aureus* y estuviesen adheridas al disco. Hay que puntualizar resultaba complicado diferenciar las colonias adheridas de las de *S. aureus* adheridas al sensor. *S. aureus* eran todas las colonias que se identificasen en el medio de cultivo como tal por sus características, estuviesen o no adheridas al disco. Es por todo ello que a la hora de aislar los que corresponden a RPF se podía coger cualquier cepa que estuviese en la placa se encontrase esta adherida o no al sensor y fuese o no *S. aureus*. Para *S. aureus* sólo se contaban las colonias que pertenecían a esta especie, estuviesen o no adheridas al sensor. Para RPFAd se aisló todo lo que estuviese adherido que no se identificase como *S. aureus*.

Por otra parte se aislaron los Biofilms más destacables, unos 40 diferentes, *a priori*, para Enterobacterias y unos 100 diferentes, *a priori*, para bacterias de Baird-Parker.

### **3.8. Metodología de aislamiento.**

#### **3.8.1. Enterobacterias.**

El procedimiento de aislamiento de enterobacterias es tedioso debido a que la mayoría están muy juntas unas de otras e incluso dentro de biofilms. Es por ello que no se pueden aislar colonias directamente como sí se puede en la mayor parte de los casos de bacterias crecidas en medio de cultivo Baird-Parker. El procedimiento para estas, por tanto, es el siguiente:

Se tomaba con el asa estéril desechable una colonia, o grupo de colonias, si están muy juntas y se depositan en una de las ocho porciones de una placa de “Plate Count AGAR” (PCA) (Difco™, Washington, USA) (se procede de esta manera para aprovechar más la placa de Petri). Esta primera siembra se incubaba durante 18-24 horas a 30 °C. Pasado ese tiempo se procede al

aislamiento de lo que ha crecido mediante la siembra en estría por agotamiento en una placa de Petri con PCA. Se incuban en las mismas condiciones que el día anterior (18-24h., 30 °C) con el fin de obtener al día siguiente colonias aisladas (cepas puras). Estas colonias aisladas se inoculan en tubos de plástico estériles y desechables con 4 ml de "Tryptic Soy Broth" (TSB) (Difco™, Washington, USA) y se incuban durante 18-24 horas a 30 °C. En este periodo se alcanzan concentraciones de  $1 \cdot 10^8$ - $1 \cdot 10^9$  ucf/ml.

Posteriormente se procedió a su liofilización. Con la concentración de unidades formadoras de colonias por mililitro obtenidas en el procedimiento descrito era suficiente para asegurar un buen proceso de liofilización.

Para liofilizar las cepas se procede tomando 1ml. de TSB, de los tubos inoculados, y se vierte en un vial de vidrio estéril. Se tapa, con el tapón al uso, dejándolo entreabierto para que pueda haber intercambio gaseoso y se congela durante, al menos, cuatro horas a  $-80$  °C. Transcurrido ese tiempo se procederá a su liofilización durante unas 10-12 horas. Una vez liofilizado se procede a cerrar completamente el tapón de goma y se sellará con un remache de aluminio.

### **3.8.2. Bacterias crecidas en el medio de cultivo Baird-Parker.**

Se utilizaron dos metodologías diferentes para el aislamiento de las diferentes cepas según se encontrasen:

- i) Si se hallaban en colonias bien diferenciadas y separadas de otras se tomaban con un asa de siembra estéril desechable y se inoculaban en tubos con 4 ml de TSB, manteniéndolas durante 24 horas a 30 °C. Pasado este tiempo se sembraba el volumen tomado con la parte circular de un asa de siembra estéril desechable en una placa de Petri con medio de cultivo PCA y se incubaba durante 24 horas a 30 °C. De nuevo pasado

ese tiempo se recogían varias colonias con la parte circular del asa de siembra estéril desechable con la finalidad de inocularla en una crioteca comercial (Laboratorios Microkit S.L., España), donde se conservará a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hasta que se pueda llevar a cabo el análisis de las cepas.

- ii) Si la cepa se encuentra razonablemente cerca de otra como para no poder estar seguro de que se toman bacterias sólo de esa colonia con la punta del asa de siembra estéril se procedía a extender lo recogido con el asa en una placa de PCA dividida en ocho porciones, con el fin de hacer crecer cantidad suficiente de lo recogido y poder aislar al día siguiente, después de una incubación a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 18-24 horas. Una vez crecido esta primera siembra se tomaba una pequeña parte y se hacía una siembra en estría en placas divididas en dos mitades. Se incubaba durante 18-24 horas a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pasado ese tiempo se obtenían colonias lo suficientemente separadas para asegurar su aislamiento y pureza. De esos cultivos puros se tomaba una colonia que se conservaba en la crioteca.

Para aislar los biofilms se procedía de la misma forma que en el caso de las colonias que no están bien separadas para acabar obteniendo una cepa pura que se guardó y conservó en la crioteca.

### **3.8.3. Biofilms.**

Para aislar cepas de los biofilms se procedió de manera diferente según se hubieran desarrollado estos en placas de VRBG o en placas de Baird Parker con RPF. En cada uno de los casos el aislamiento de cepas de los biofilms se hizo como si fuesen colonias que estaban lo suficientemente juntas como para

no tener la certeza de que se podía aislar directamente. Así, para los biofilms formados en VRBG se procedió igual que con las colonias que habían crecido en VRBG. Para los biofilms desarrollados en Baird Parker con RPF se procedió igual que con las colonias que habían crecido en Baird Parker con RPF y que estaban muy juntas.

### 3.9. Identificación (Mini-Api).

La identificación de las cepas aisladas se llevó a cabo con el equipo Mini-Api<sup>®</sup> de bioMérieux S.A. (Marcy L'Etoile, Francia). Para lo cual se utilizaron tres tipos distintos de tiras de identificación para Mini-Api<sup>®</sup>, con 32 pruebas bioquímicas. Los nombres comerciales de las tiras y los grupos microbianos que identifican son los siguientes.

- i) **ID 32 Staph:** Estafilococos y géneros afines.
- ii) **ID 32 E:** Enterobacterias.
- iii) **ID 32 GN:** Gram negativas.

Estas galerías permiten la realización de 32 pruebas bioquímicas de forma simultánea, proporcionando unos colores o turbideces (en caso de la galería ID 32 GN) que el equipo Mini Api<sup>®</sup> es capaz de leer e interpretar proporcionando los resultados en forma de organismo u organismos más probables y el porcentaje de probabilidad de que la identificación sea correcta.

Toda la técnica de identificación se hizo según protocolo bioMérieux S.A. para Mini-Api<sup>®</sup>.

### 3.10. Limpiadores.

Se hicieron pruebas de campo sobre la eficacia de tres tipos de limpiadores proporcionados todos ellos por la casa comercial Henkel Ibérica S.A. Los productos son los siguientes:

- i) **Limpiador convencional:** Limpiador a base de tensioactivos aniónicos (5-15% de tensioactivos aniónicos, <5% tensioactivos no iónicos y jabón).
- ii) **Limpiador con amonio cuaternario:** Limpiador a base de tensioactivos aniónicos y amonio cuaternario (5-15% de tensioactivos no iónicos, <5% tensioactivos catiónicos y amonio cuaternario).
- iii) **Lejía y detergente:** Hipoclorito sódico y tensioactivos aniónicos.

En cuatro puntos de la casa:

- i) Sumidero de la cocina.
- ii) Zona de trabajo de la cocina.
- iii) Sumidero del lavabo.
- iv) Zona del jabón del lavabo.

Para evaluar la eficacia de los limpiadores a probar se colocaron dos sensores de superficie de acero en cada una de las zonas a estudiar en 30 domicilios del Vallés Oriental (Barcelona). Dichos sensores permanecieron en el punto del domicilio correspondiente durante siete días completos. En esa semana se procedía a hacer la limpieza del hogar y por supuesto de las zonas donde estaban los sensores, con un único producto de limpieza de los tres del ensayo, el indicado para esa semana. Pasados los siete días se procedió a recoger el sensor para analizarlo en el laboratorio y colocar otro que se quedaría en el hogar siete días más. Esta operación se realizó durante tres semanas más una última que fue la semana control. En la semana control las

personas encargadas de la limpieza de los hogares lo hicieron con sus productos de limpieza habituales.

Las personas encargadas de realizar la limpieza eran los propietarios del domicilio o personal de limpieza contratado directamente por los propietarios. No se les dieron instrucciones de cómo debían llevar a cabo la limpieza del hogar.

Como se ha comentado anteriormente se colocaron dos sensores en cada uno de los cuatro puntos del hogar a estudiar. Con cada uno de los sensores se llevó a cabo un análisis microbiológico diferente:

- i) Baird-Parker con RPF.
- ii) VRBG.

El medio VRBG es un medio selectivo y diferencial que permite exclusivamente el crecimiento de Gram negativas y diferencia entre estas las que son enterobacterias, este grupo de microorganismos es muy interesante tenerlo en cuenta a la hora de valorar un producto desinfectante ya que si después de la desinfección quedan bacterias pertenecientes a este grupo nos indica la posibilidad que haya otras bacterias entéricas susceptibles de provocar enfermedades.

El Baird-Parker con RPF se utilizó para hacer recuentos de bacterias capaces de crecer en ese medio reduciendo el telurito de potasio, con o sin formación de halo. La adaptación de algunas cepas de *S. aureus* a algunos principios activos de productos desinfectantes unido a la capacidad patogénica lo convierten en un microorganismo muy interesante para el estudio de la eficacia de la desinfección.

### 3.11. Diseño estadístico.

Para la realización del estudio estadístico se utilizó el programa informático SPSS para Windows, versión 12.0.1. (SPSS Inc., 1989-2003).

Para la comparación de medias de recuentos<sup>2</sup> entre los diferentes puntos estudiados de la vivienda se utilizó el análisis estadístico del análisis de la varianza de un factor (ANOVA) así como para observar si había diferencias significativas entre el número de biofilms en función del grupo bacteriano estudiado.

De igual modo esta prueba estadística fue utilizada para comparar medias de recuento en función del producto limpiador utilizado en la vivienda.

En los resultados de las dos experimentales expuestas anteriormente se realizó la prueba “post-hoc” a la ANOVA conocida con el nombre de “prueba de Duncan” con nivel de significación de  $p < 0.05$ .

En cambio el análisis estadístico llevado a cabo en la tercera parte experimental de la presente tesis fue el de la Chi cuadrado, con nivel de significación de  $p < 0.05$ , ya que lo que se pretendía era comparar frecuencias de aparición de diferentes especies de microorganismos.

---

<sup>2</sup> Las placas donde, por el elevado número de colonias se hacía imposible el recuento, se les daba el valor de recuento de 1000 ufc., mientras que para las que se podían contar pero eran más de 300 ufc., se les dio el valor de 300 ufc.

## 4. RESULTADOS.

### 4.1. Recuentos de microorganismos en viviendas.

A continuación se presentan una serie de tablas y gráficas en las que se muestran los resultados obtenidos de los recuentos de microorganismos viables en dos medios de cultivo selectivos y diferenciales como son el Violet Red Bile Glucose, Agar (VRBG) y el Baird-Parker RPF, para enterobacterias y *Staphylococcus* y géneros afines, respectivamente. Las tablas son el resultado de aplicar varias pruebas estadísticas a la media de los logaritmos de los recuentos obtenidos por placa. En cambio las gráficas, con el fin de hacerlos más manejables, se expresan en recuentos absolutos por centímetro cuadrado.

El valor de la estadística reside en mostrarnos las diferencias de recuento en unos puntos respecto a los otros, mientras que las gráficas permiten visualizar las diferencias de manera rápida. Ambas herramientas conforman un mapa de la distribución de los microorganismos de interés en el estudio en la vivienda española.

En la Tabla 1 se plasman los resultados del análisis estadístico de los recuentos en medio VRBG, medio de cultivo selectivo y diferencial para enterobacterias, para los cinco puntos de la vivienda. La ANOVA llevada a cabo con la media de los logaritmos de los recuentos y el posterior estudio de homogeneidad de medias, realizado con el prueba de Duncan, separan los cinco puntos estudiados en tres grupos significativamente diferentes para  $p < 0.05$ . Así, el desagüe del fregadero de la cocina es el que presenta recuentos de enterobacterias más altos y significativamente diferentes del resto de puntos, seguido del desagüe de la bañera, el cual conformaría el grupo intermedio y por último, con los recuentos de enterobacterias más bajos, no presentando diferencias significativas de recuentos entre ellos, se encontrarían el suelo de la entrada al domicilio, el tirador del frigorífico y el tirador del retrete.

A continuación, en la Tabla 2, se muestran los resultados de los logaritmos de los recuentos de las enterobacterias con capacidad de adhesión a la superficie

de estudio. De igual modo que en la tabla anterior, el recuento mayor para este grupo de microorganismos se encuentra en el desagüe del fregadero de la cocina, hallándose diferencias estadísticamente significativas respecto al resto de los puntos. Ello es fácilmente comprensible observando la Tabla 2, ya que los recuentos para esa superficie son una unidad logarítmica superiores al resto.

**TABLA 1. ANOVA de un factor. Para recuentos de los cinco puntos en medio VRBG.**

Los resultados expresan la media de los logaritmos de los recuentos para cada sensor (3,14159 cm<sup>2</sup>).

	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Desagüe bañera	182	0,86**	1,26	0,67	1,04
Tirador retrete	187	0,16*	0,57	0,08	0,24
Desagüe fregadero	172	1,66***	1,42	1,45	1,87
Tirador frigorífico	192	0,17*	0,61	0,09	0,26
Suelo entrada domicilio	191	0,31*	0,81	0,19	0,43

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan con nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo inferior.

\*\* Grupo medio.

\*\*\* Grupo superior.

**TABLA 2. ANOVA de un factor. Para recuentos de bacterias adheridas en los cinco puntos en VRBG.**

Los resultados expresan la media de los logaritmos de los recuentos para cada sensor (3,14159 cm<sup>2</sup>).

	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Desagüe bañera	182	0,07*	0,35	0,01	0,12
Tirador retrete	187	0,01*	0,15	-0,01	0,03
Desagüe fregadero	172	0,18**	0,53	0,10	0,26
Tirador frigorífico	192	0,04*	0,28	0,00	0,08
Suelo entrada domicilio	191	0,04*	0,29	0,00	0,08

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan con nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo inferior.

\*\* Grupo superior.

La presencia o ausencia de biofilm formado por enterobacterias en las superficies estudiadas se muestra en la Tabla 3. Al ser una tabla construida a partir de valores cualitativos, como son la presencia o la ausencia, en lugar de valores cuantitativos, como ocurría anteriormente, ésta tabla es ligeramente diferente respecto a las dos. Los valores son fruto de hacer la media del resultado de un parámetro que tiene carácter binario; ausencia de biofilm igual a 0, presencia de biofilm igual a 1. Por tanto al tener el resultado de todas las viviendas estudiadas para cada punto y hacer la media, aquellos valores que más se aproximasen a 0 tenían menos susceptibilidad de formación de biofilm, que aquellos que su media se aproximase a 1. La ANOVA y la posterior prueba de Duncan con nivel de significación  $p < 0.05$  nos diferencia tres grupos, en el que el desagüe de la bañera es el punto de la vivienda estudiado más proclive a la formación de biofilm. Al contrario, el tirador del retrete y el suelo de la entrada serían los que menos favorecen la formación de estos aglomerados microbianos.

La Tabla 4 contiene los resultados de los recuentos totales de microorganismos capaces de crecer en medio Baird-Parker con RPF y de reducir el telurito de potasio, expresados como en todas las demás tablas, en ufc/sensor. La estadística nos diferencia cuatro grupos con significación  $p < 0.05$ . El desagüe de la bañera y el suelo de la entrada son los puntos que contienen recuentos más elevados para este grupo de microorganismos, seguidos del desagüe de la bañera, del tirador del retrete y del tirador del frigorífico respectivamente y formando cada uno de ellos un grupo estadísticamente diferente a los demás.

Al comparar los resultados de la Tabla 4, en la que se muestran los recuentos de las bacterias capaces de crecer en medio de cultivo Baird-Parker con RPF, con los resultados de la Tabla 1, en la que se muestran los recuentos de enterobacterias, se aprecia como los recuentos medios en la vivienda son claramente superiores para enterobacterias respecto a las Gram positivas capaces de crecer en medio de cultivo Baird-Parker con RPF y reducir el telurito de potasio, sobre todo en las superficies más húmedas. En las zonas secas los recuentos son mayores para las bacterias de Baird-Parker.

**TABLA 3. ANOVA de un factor. Para presencia de Biofilm en medio VRBG (BVRBG).**

Los resultados expresan la media de unos resultados que sólo pueden tomar dos valores 0 ó 1.

	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Desagüe bañera	181	0,65***	0,48	0,58	0,72
Tirador retrete	193	0,16*	0,37	0,11	0,21
Desagüe fregadero	191	0,47**	0,50	0,40	0,54
Tirador frigorífico	184	0,45**	0,50	0,37	0,52
Suelo entrada domicilio	190	0,17*	0,38	0,12	0,23

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan con nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo inferior.

\*\* Grupo medio.

\*\*\* Grupo superior.

**TABLA 4. ANOVA de un factor. Para recuentos de los cinco puntos en medio Baird-Parker con RPF.**

Los resultados expresan la media de los logaritmos de los recuentos para cada sensor ( $3,14159 \text{ cm}^2$ ).

	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Desagüe bañera	177	0,75****	0,83	0,63	0,87
Tirador retrete	183	0,52**	0,65	0,42	0,61
Desagüe fregadero	165	0,62***	0,84	0,50	0,75
Tirador frigorífico	191	0,37*	0,56	0,29	0,45
Suelo entrada domicilio	191	0,70****	0,76	0,59	0,81

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan con nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo inferior.

\*\* Grupo medio bajo.

\*\*\* Grupo medio alto.

\*\*\*\* Grupo superior.

El estudio estadístico de los recuentos de los microorganismos con capacidad de crecer en medio de cultivo Baird-Parker con RPF capaces de reducir el telurito de potasio y de adherirse a la superficie de estudio se muestran en la Tabla 5. El análisis numérico revela dos grupos significativamente diferentes. El desagüe de la bañera y el desagüe del fregadero pertenecen al grupo que contiene mayor número de microorganismos viables mientras que el tirador del retrete, el tirador del frigorífico y el suelo de entrada al domicilio pertenecen al grupo menos populoso.

Comparando los recuentos de las bacterias adheridas a las superficies de los dos grupos estudiados (Tablas 2 y 5), se aprecia que aquellas que crecen en medio de cultivo Baird-Parker y reducen el telurito de potasio tienen mayor capacidad de adhesión que las enterobacterias. Así, de los dos grupos estadísticamente diferentes, para  $p < 0.05$ , observado en las enterobacterias, el recuento del desagüe del fregadero que pertenecía al grupo de recuentos altos, si hubiera aparecido en el grupo de las bacterias capaces de crecer en Baird-Parker pertenecería al grupo estadístico de los recuentos menores.

A continuación, en la Tabla 6, se muestran los resultados obtenidos para microorganismos coagulasa positivos, uno de los grupos más importantes en alimentos. Los recuentos más altos se encuentran en el desagüe de la bañera y en el suelo de la entrada al domicilio, siendo los recuentos en los otros tres puntos estudiados muy bajos, una unidad logarítmica menos y significativamente diferentes de los encontrados en estos dos puntos.

**TABLA 5. ANOVA de un factor. Para recuentos de bacterias adheridas en Baird-Parker con RPF.**

Los resultados expresan la media de los logaritmos de los recuentos para cada sensor (3,14159 cm<sup>2</sup>).

	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Desagüe bañera	177	0,42**	0,66	0,33	0,52
Tirador retrete	183	0,16*	0,36	0,10	0,21
Desagüe fregadero	165	0,34**	0,58	0,25	0,43
Tirador frigorífico	191	0,11*	0,29	0,07	0,15
Suelo entrada domicilio	191	0,09*	0,25	0,06	0,13

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan con nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo inferior.

\*\* Grupo superior.

**TABLA 6. ANOVA de un factor. Para recuentos de Coagulasa positivos en los cinco puntos.**

Los resultados expresan la media de los logaritmos de los recuentos para cada sensor (3,14159 cm<sup>2</sup>).

	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Desagüe bañera	177	0,11**	0,49	0,04	0,18
Tirador retrete	183	0,03*	0,22	0,00	0,06
Desagüe fregadero	165	0,02*	0,20	-0,01	0,05
Tirador frigorífico	191	0,03*	0,18	0,01	0,06
Suelo entrada domicilio	191	0,11**	0,36	0,05	0,16

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan con nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo inferior.

\*\* Grupo superior.

La Tabla 7 muestra los resultados de presencia o ausencia de biofilm en los puntos estudiados. De igual modo que el cuadro que contenía los resultados del estudio de biofilm para enterobacterias, en este, los datos también son cualitativos. Los valores son fruto de hacer la media del resultado un parámetro que tiene carácter binario; ausencia de biofilm igual a 0, presencia de biofilm igual a 1. Por tanto al tener el resultado de todas las viviendas estudiadas para cada punto y hacer la media, aquellos valores que más se aproximen a 0 tienen menos susceptibilidad de formación de biofilm que aquellos que su media se aproxime a 1. La ANOVA y la posterior prueba de Duncan con nivel de significación  $p < 0,05$  nos diferencia dos grupos, en el que el desagüe del fregadero es el punto de la vivienda estudiado más proclive a la formación de biofilm, con diferencia significativa respecto al resto de puntos de la casa, que a pesar de lo cual tienen también valores relativamente altos, es decir, con facilidad para la formación de biofilms.

La capacidad de formar biofilm por parte de las bacterias que han podido multiplicarse y reducir el telurito en el medio de cultivo Baird-Parker es mayor que en las enterobacterias como se puede apreciar comparando los valores de las Tablas 3 y 7.

**TABLA 7. ANOVA de un factor. Para presencia de Biofilm en medio Baird-Parker con RPF (BRPF).**

Los resultados expresan la media de unos resultados que sólo pueden tomar dos valores 0 ó 1.

	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Desagüe bañera	171	0,63*	0,49	0,55	0,70
Tirador retrete	191	0,57*	0,50	0,50	0,64
Desagüe fregadero	187	0,81**	0,39	0,76	0,87
Tirador frigorífico	182	0,57*	0,50	0,50	0,64
Suelo entrada domicilio	187	0,57*	0,50	0,50	0,64

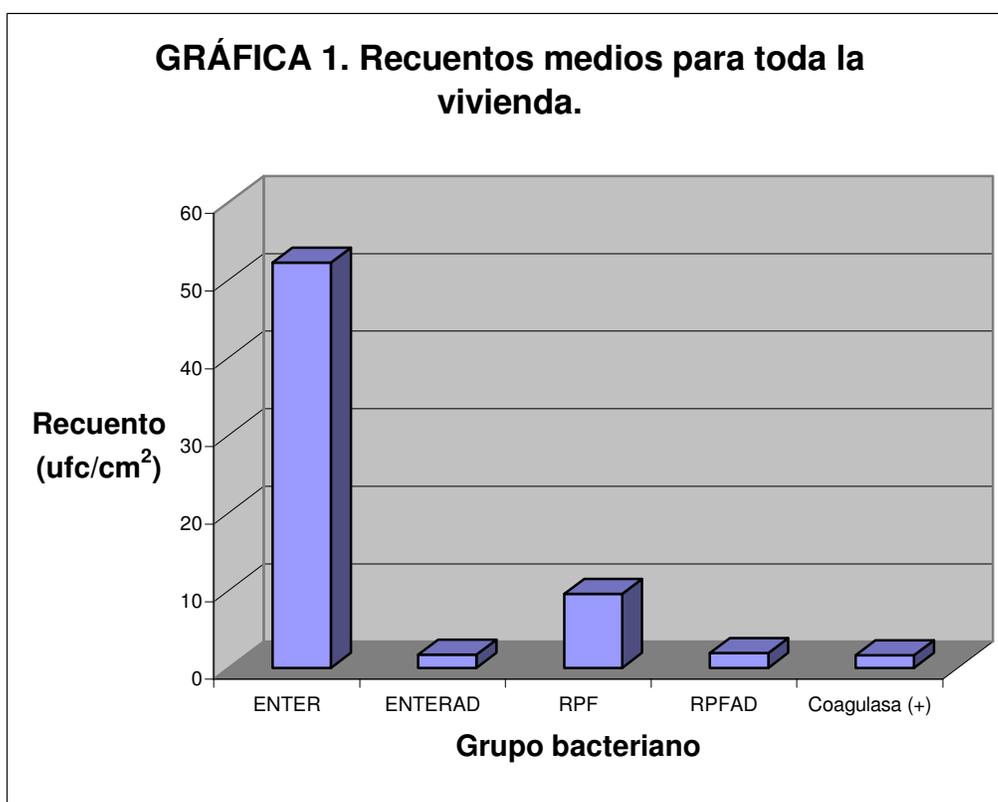
Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan con nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo inferior.

\*\* Grupo superior.

A continuación se muestran las gráficas con los resultados expresados en unidades formadoras de colonias (ufc) por centímetro cuadrado. En ellas se puede apreciar, de manera visual, la situación de cada una de las superficies y cada grupo bacteriano.

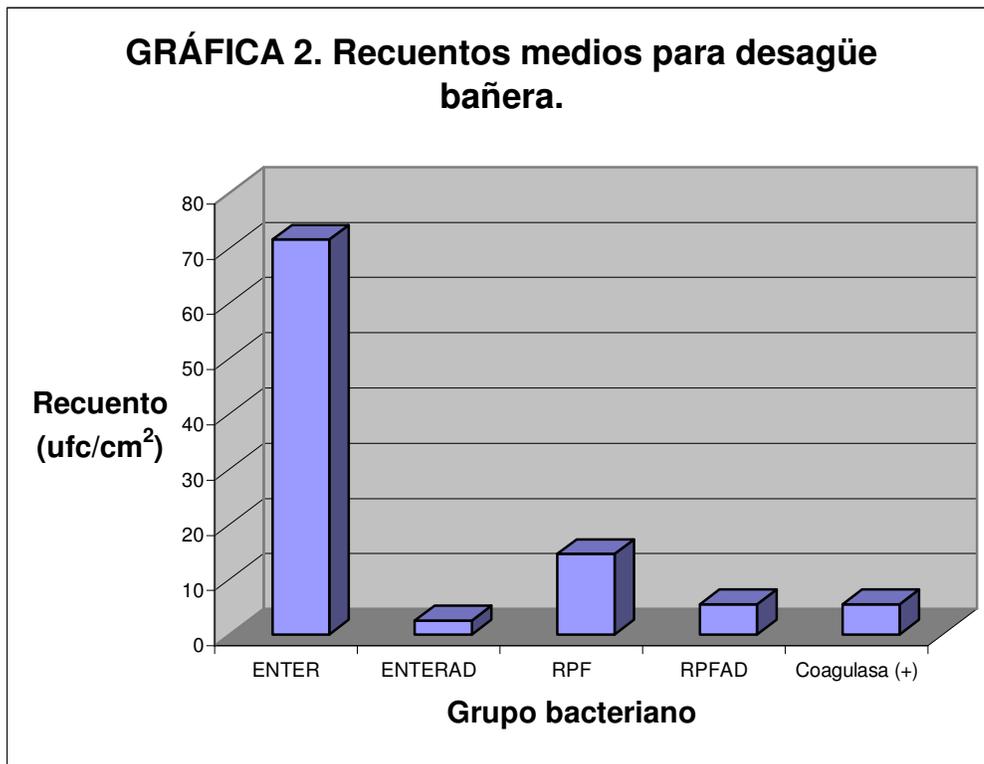
En la Gráfica 1 se muestran los recuentos por grupo bacteriano. En ella se puede observar una clara predominancia de las enterobacterias respecto a aquellas que pueden multiplicarse en medio de cultivo Baird-Parker en 24 horas, a 37 grados centígrados. El grupo de las bacterias Gram positivas, coagulasa positivas, entre las que se encuentra *Staphylococcus aureus*, microorganismo de interés en la seguridad alimentaria, tiene recuentos medios en la vivienda inferiores a 2 ufc/cm<sup>2</sup>.



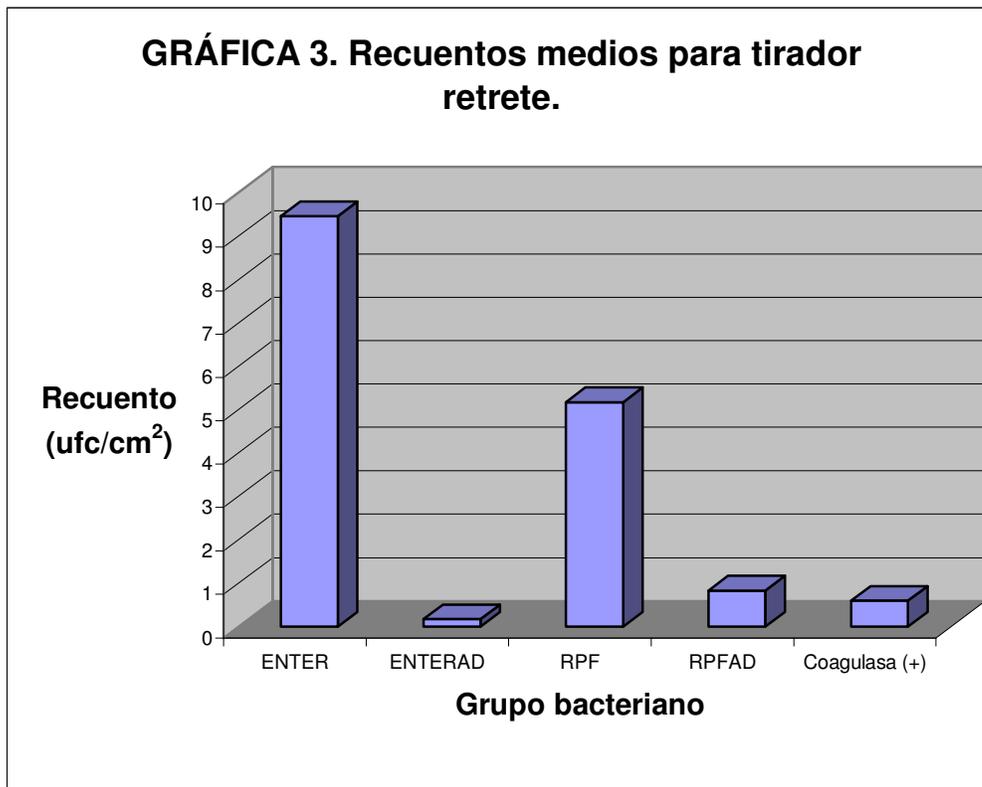
**Leyenda para todas las gráficas:**

- ENTER = Enterobacterias totales.
- ENTERAD = Enterobacterias adheridas a la superficie.
- RPF = Bacterias multiplicadas en Baird-Parker con RPF totales.
- RPFAD = Bacterias adheridas a la superficie multiplicadas en Baird-Parker con RPF.
- Coagulasa (+) = Bacterias multiplicadas en Baird-Parker con RPF formando halo traslucido alrededor de las colonias.

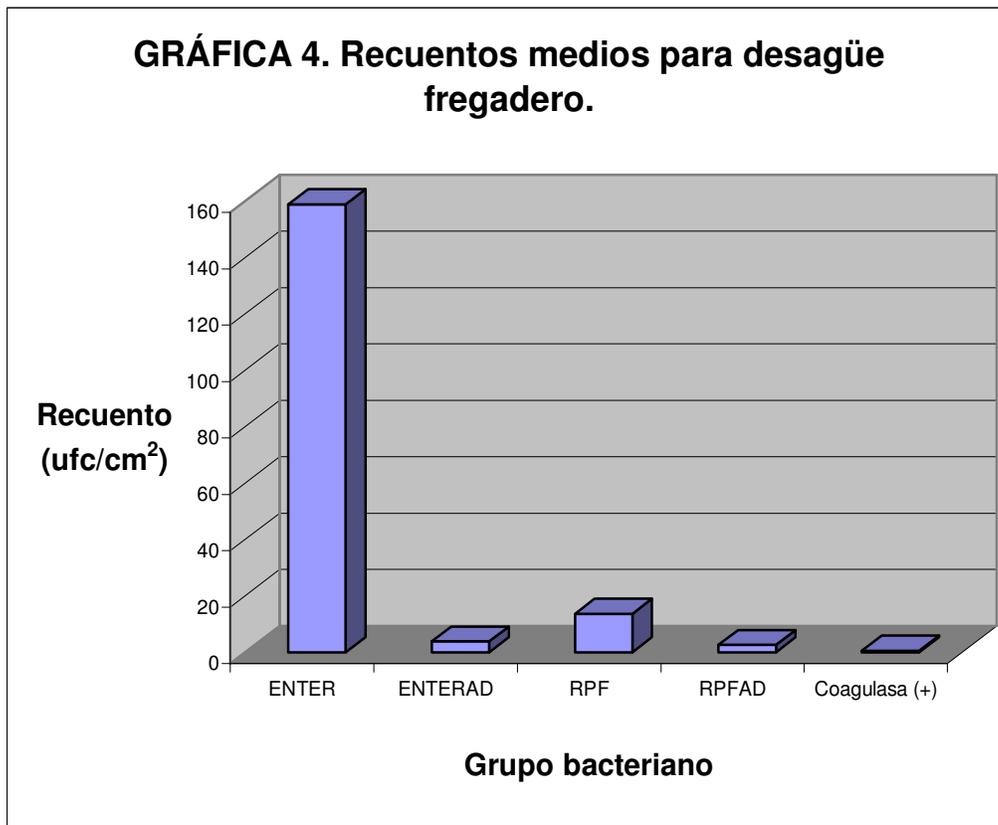
En el desagüe de la bañera el recuento medio de enterobacterias es superior al resto de la flora estudiada, alcanzando recuentos medios de aproximadamente 70 ufc/cm<sup>2</sup>. Esta es la superficie donde las bacterias Gram positivas, coagulasa positivas, presentan recuentos medios más elevados, si bien ni siquiera alcanzan la unidad logarítmica por centímetro cuadrado (Gráfica 2).



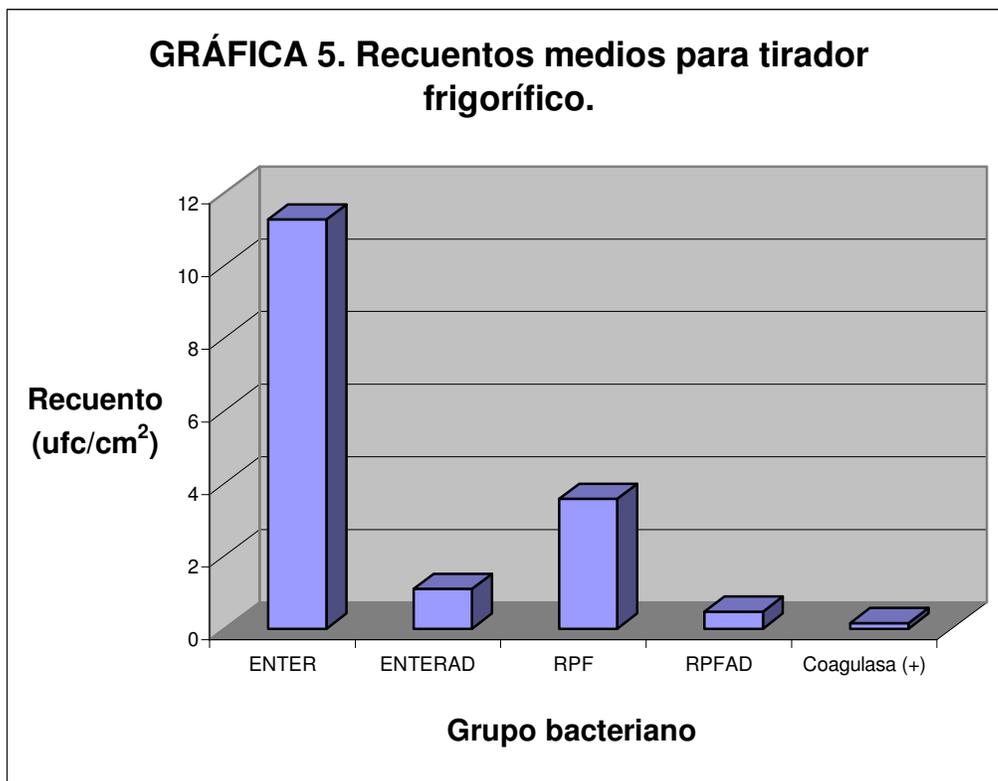
En la Gráfica 3 se observa que el número de enterobacterias presentes en el tirador del retrete también es superior al de aquellas capaces de crecer en medio Baird-Parker reduciendo el telurito de potasio. Si bien en ambos casos los recuentos medios son muy bajos y en ningún caso se superan las 10 ufc/cm<sup>2</sup>.



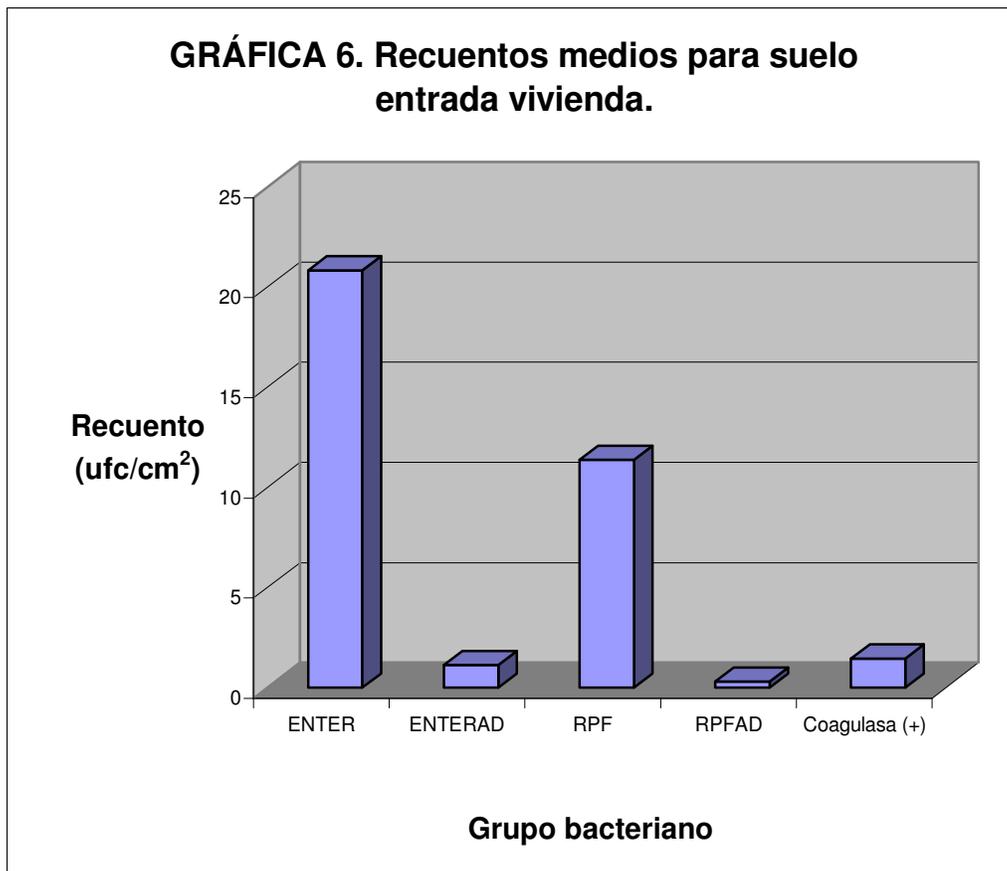
De todas las superficies estudiadas, el desagüe del fregadero, es la más contaminada por enterobacterias (Gráfica 4). Los recuentos medios rondan las 150 ufc/cm<sup>2</sup>. Mientras que los recuentos de la flora susceptible de crecer en medio de cultivo Baird-Parker y reducir el telurito de potasio se encuentra al menos una unidad logarítmica por debajo.



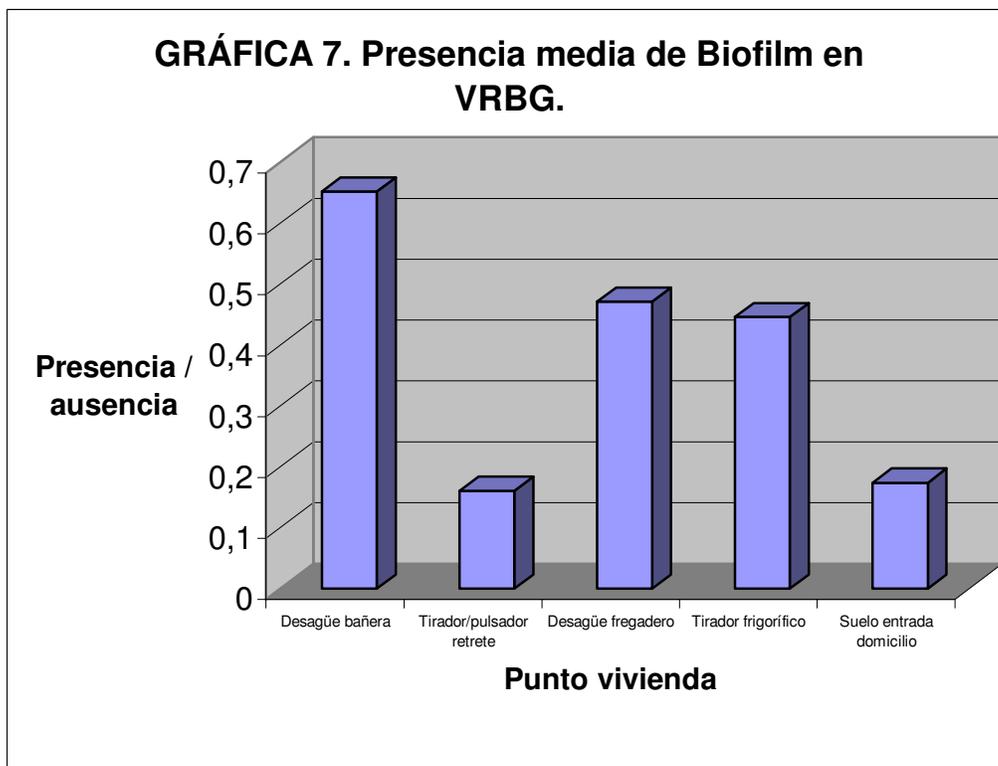
Como en el resto de las superficies involucradas en el estudio, en el tirador del frigorífico predominan las enterobacterias, si bien los recuentos son bajos, semejantes a la otra superficie seca anterior, el tirador de la cisterna del retrete. De este modo las enterobacterias de esta superficie rondan la unidad logarítmica por centímetro cuadrado y las capaces de crecer en medio de cultivo Baird-Parker y reducir el telurito de potasio son cuatro para el mismo área (Gráfica 5).



Recuentos algo más altos se encuentran para la mayoría de grupos microbianos en la tercera de las superficies secas del presente estudio, el suelo de la entrada al domicilio, respecto a las otras dos. Así, en la Gráfica 6, se aprecia que las enterobacterias presentan recuentos medios de 20 ufc/cm<sup>2</sup> mientras que aquellas capaces de crecer en medio Baird-Parker reduciendo el telurito de potasio lo hacen en número aproximado de 12 para la misma unidad de superficie.

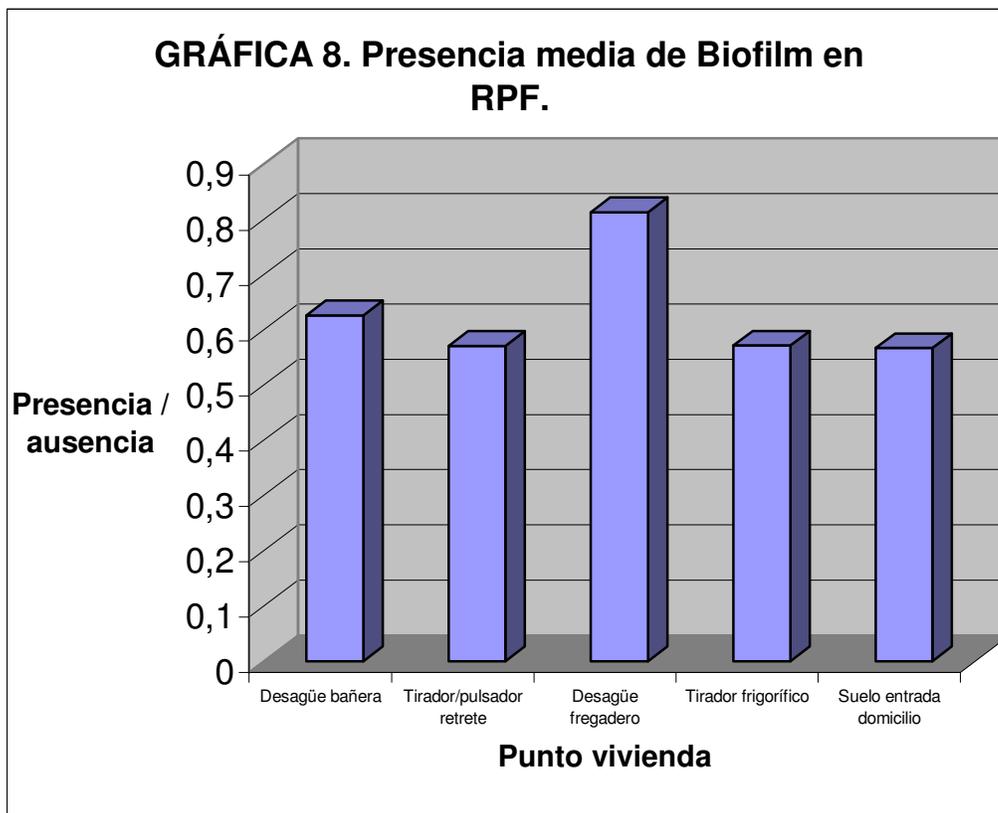


En la Gráfica 7 se muestra la facilidad o dificultad que proporciona una superficie para ser colonizada por un biofilm de enterobacterias. El valor obtenido para cada superficie es el resultado de otorgar valor cero a la ausencia de biofilm y valor uno a la presencia y hacer la media para todas las viviendas estudiadas. De este modo las barras más altas indicarán mayor susceptibilidad de colonización por biofilm y viceversa. En la gráfica se aprecia que el desagüe de la bañera es el punto de mayor predisposición mientras que el suelo de la entrada es que menor riesgo de colonización presenta.

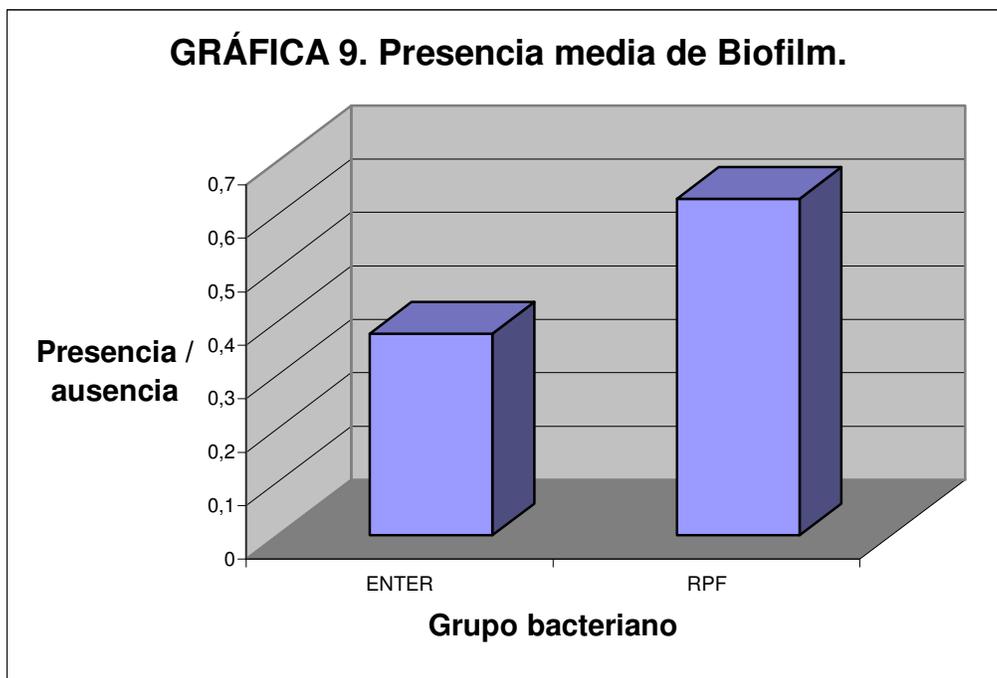


La Gráfica 8 muestra la facilidad o dificultad que muestra una superficie para ser colonizada por un biofilm de bacterias con habilidad para crecer y reducir el telurito de potasio en el medio selectivo Baird-Parker. El valor obtenido para cada superficie es el resultado de otorgar valor cero a la ausencia de biofilm y valor uno a la presencia y hacer la media para todas las viviendas estudiadas. De este modo las barras más altas indicarán mayor susceptibilidad de colonización por biofilm y viceversa.

En la gráfica se observan susceptibilidades similares para todos los puntos excepto para el desagüe de la bañera que presenta colonización en el 80 por ciento de los casos.



Si bien, el número de enterobacterias es claramente superior en los diferentes puntos de la vivienda estudiados, los biofilms los forman mayoritariamente el grupo de bacterias con capacidad de crecimiento y reducción del telurito de potasio en medio de cultivo Baird-Parker. Así, mientras estos microorganismos forman biofilm en, aproximadamente, el 63 por ciento de los casos, las enterobacterias sólo lo hacen en 38 de cada cien superficies domésticas (Gráfica 9).



## 4.2. Identificación y comparación de frecuencias de los microorganismos aislados en las viviendas.

Después de haber analizado los perfiles de frecuencias de aparición de cada una de las diferentes especies que se han obtenido en el estudio, se puede concluir con absoluta claridad que la microbiota presente en cada una de las cinco superficies estudiadas es genuina de esa zona y significativamente diferente del resto de superficies y del global de la vivienda, tanto para Gram positivos como para Gram negativos<sup>1</sup>.

Las tablas que se presentan a continuación contienen los porcentajes en que se han hallado cada una de las diferentes especies o géneros, en su defecto, en este estudio.

Gram positivos:

De los microorganismos Gram positivos identificados, cuyos resultados figuran en la Tabla 8, se observa que los que presentan mayores proporciones son diferentes especies de *Staphylococcus*, muy asociados con el hombre, como son:

- *Staphylococcus hominis*.
- *Staphylococcus epidermidis*.

Si bien, las pruebas de Chi cuadrado realizadas anteriormente, señalan que el perfil de frecuencias de aparición de los diferentes microorganismos es propia de cada punto.

---

<sup>1</sup> Para Gram negativos no se pudo aplicar el estadígrafo de la Chi cuadrado en la mayoría de los puntos debido a que las diferentes especies identificadas presentaban frecuencias esperadas inferiores a 5. Si bien en aquellos en que se salvaba este inconveniente las diferencias resultaron mucho más importantes que para los Gram positivos.

TABLA 8. Identificación de microorganismos Gram positivos.

Identificación	1	2	3	4	5	6	7
1	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+	+	+
22	+	+	+	+	+	+	+
23	+	+	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+	+	+
26	+	+	+	+	+	+	+
27	+	+	+	+	+	+	+
28	+	+	+	+	+	+	+
29	+	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+	+
31	+	+	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+	+	+
33	+	+	+	+	+	+	+
34	+	+	+	+	+	+	+
35	+	+	+	+	+	+	+
36	+	+	+	+	+	+	+
37	+	+	+	+	+	+	+
38	+	+	+	+	+	+	+
39	+	+	+	+	+	+	+
40	+	+	+	+	+	+	+
41	+	+	+	+	+	+	+
42	+	+	+	+	+	+	+
43	+	+	+	+	+	+	+
44	+	+	+	+	+	+	+
45	+	+	+	+	+	+	+
46	+	+	+	+	+	+	+
47	+	+	+	+	+	+	+
48	+	+	+	+	+	+	+
49	+	+	+	+	+	+	+
50	+	+	+	+	+	+	+
51	+	+	+	+	+	+	+
52	+	+	+	+	+	+	+
53	+	+	+	+	+	+	+
54	+	+	+	+	+	+	+
55	+	+	+	+	+	+	+
56	+	+	+	+	+	+	+
57	+	+	+	+	+	+	+
58	+	+	+	+	+	+	+
59	+	+	+	+	+	+	+
60	+	+	+	+	+	+	+
61	+	+	+	+	+	+	+
62	+	+	+	+	+	+	+
63	+	+	+	+	+	+	+
64	+	+	+	+	+	+	+
65	+	+	+	+	+	+	+
66	+	+	+	+	+	+	+
67	+	+	+	+	+	+	+
68	+	+	+	+	+	+	+
69	+	+	+	+	+	+	+
70	+	+	+	+	+	+	+
71	+	+	+	+	+	+	+
72	+	+	+	+	+	+	+
73	+	+	+	+	+	+	+
74	+	+	+	+	+	+	+
75	+	+	+	+	+	+	+
76	+	+	+	+	+	+	+
77	+	+	+	+	+	+	+
78	+	+	+	+	+	+	+
79	+	+	+	+	+	+	+
80	+	+	+	+	+	+	+
81	+	+	+	+	+	+	+
82	+	+	+	+	+	+	+
83	+	+	+	+	+	+	+
84	+	+	+	+	+	+	+
85	+	+	+	+	+	+	+
86	+	+	+	+	+	+	+
87	+	+	+	+	+	+	+
88	+	+	+	+	+	+	+
89	+	+	+	+	+	+	+
90	+	+	+	+	+	+	+
91	+	+	+	+	+	+	+
92	+	+	+	+	+	+	+
93	+	+	+	+	+	+	+
94	+	+	+	+	+	+	+
95	+	+	+	+	+	+	+
96	+	+	+	+	+	+	+
97	+	+	+	+	+	+	+
98	+	+	+	+	+	+	+
99	+	+	+	+	+	+	+
100	+	+	+	+	+	+	+

En las siguientes dos tablas (Tablas 9 y 10) se indican los porcentajes, respecto al total de Gram positivos aislados, encontrados en las viviendas estudiadas, de *Kocuria spp.* y *Micrococcus spp.*, respectivamente. Como se puede apreciar en ambos casos los porcentajes son bajos, en ningún caso se supera el 5%. Además ninguna especie de los dos géneros se puede considerar patógena.

Tabla 20. Indicadores de desempeño de los 11

Indicador	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Indicador de desempeño	11	11	11	11	11	11	11
Indicador de desempeño	11	11	11	11	11	11	11
Indicador de desempeño	11	11	11	11	11	11	11
Indicador de desempeño	11	11	11	11	11	11	11
Indicador de desempeño	11	11	11	11	11	11	11
Indicador de desempeño	11	11	11	11	11	11	11
Indicador de desempeño	11	11	11	11	11	11	11
Indicador de desempeño	11	11	11	11	11	11	11
Indicador de desempeño	11	11	11	11	11	11	11
Indicador de desempeño	11	11	11	11	11	11	11

Tabla 21. Indicadores de desempeño de los 11

Indicador	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Indicador de desempeño	11	11	11	11	11	11	11
Indicador de desempeño	11	11	11	11	11	11	11
Indicador de desempeño	11	11	11	11	11	11	11
Indicador de desempeño	11	11	11	11	11	11	11
Indicador de desempeño	11	11	11	11	11	11	11
Indicador de desempeño	11	11	11	11	11	11	11
Indicador de desempeño	11	11	11	11	11	11	11
Indicador de desempeño	11	11	11	11	11	11	11
Indicador de desempeño	11	11	11	11	11	11	11
Indicador de desempeño	11	11	11	11	11	11	11
Indicador de desempeño	11	11	11	11	11	11	11

En la Tabla 11, a continuación, se muestran los porcentajes de cada una de las diferentes especies de *Staphylococcus* encontradas. Este es sin lugar a dudas el género más abundante de entre los microorganismos que se pueden hallar en una vivienda y que son capaces de multiplicarse y reducir el telurito de potasio en medio de cultivo Baird-Parker. Entre todas las especies identificadas representan el 86.43% del total de estos microorganismos.

Cabe destacar diferentes especies, empezando por la abundancia de aquellas dos más íntimamente relacionadas con el hombre; *Staphylococcus hominis* y *Staphylococcus epidermidis*, entre las cuales constituyen el 50% de los individuos del género.

Sin embargo, por importancia frente a la salud, hay que citar a *Staphylococcus haemolyticus* y *Staphylococcus aureus* quienes representan un serio riesgo para la seguridad alimentaria. Entre los dos representan aproximadamente el 7% de los microorganismos aislados capaces de multiplicarse en Baird-Parker.

Hay que hacer, en este punto, una reseña. De los microorganismos aislados en el medio Baird-Parker con suplemento de RPF, como *Staphylococcus aureus* hay que decir que, después de hacer la identificación con el equipo Mini-Api, sólo un 15% eran realmente *Staphylococcus aureus* y el resto otras especies, entre las que hay que destacar a *Staphylococcus cohnii ssp. cohnii* y *Staphylococcus epidermidis* con un 35% y un 25% de los casos sospechosos de ser *Staphylococcus aureus*, respectivamente.

Código	Descripción	Unidad	Cantidad	Valor
001	...	...	...	...
002	...	...	...	...
003	...	...	...	...
004	...	...	...	...
005	...	...	...	...
006	...	...	...	...
007	...	...	...	...
008	...	...	...	...
009	...	...	...	...
010	...	...	...	...
011	...	...	...	...
012	...	...	...	...
013	...	...	...	...
014	...	...	...	...
015	...	...	...	...
016	...	...	...	...
017	...	...	...	...
018	...	...	...	...
019	...	...	...	...
020	...	...	...	...
021	...	...	...	...
022	...	...	...	...
023	...	...	...	...
024	...	...	...	...
025	...	...	...	...
026	...	...	...	...
027	...	...	...	...
028	...	...	...	...
029	...	...	...	...
030	...	...	...	...
031	...	...	...	...
032	...	...	...	...
033	...	...	...	...
034	...	...	...	...
035	...	...	...	...
036	...	...	...	...
037	...	...	...	...
038	...	...	...	...
039	...	...	...	...
040	...	...	...	...
041	...	...	...	...
042	...	...	...	...
043	...	...	...	...
044	...	...	...	...
045	...	...	...	...
046	...	...	...	...
047	...	...	...	...
048	...	...	...	...
049	...	...	...	...
050	...	...	...	...
051	...	...	...	...
052	...	...	...	...
053	...	...	...	...
054	...	...	...	...
055	...	...	...	...
056	...	...	...	...
057	...	...	...	...
058	...	...	...	...
059	...	...	...	...
060	...	...	...	...
061	...	...	...	...
062	...	...	...	...
063	...	...	...	...
064	...	...	...	...
065	...	...	...	...
066	...	...	...	...
067	...	...	...	...
068	...	...	...	...
069	...	...	...	...
070	...	...	...	...
071	...	...	...	...
072	...	...	...	...
073	...	...	...	...
074	...	...	...	...
075	...	...	...	...
076	...	...	...	...
077	...	...	...	...
078	...	...	...	...
079	...	...	...	...
080	...	...	...	...
081	...	...	...	...
082	...	...	...	...
083	...	...	...	...
084	...	...	...	...
085	...	...	...	...
086	...	...	...	...
087	...	...	...	...
088	...	...	...	...
089	...	...	...	...
090	...	...	...	...
091	...	...	...	...
092	...	...	...	...
093	...	...	...	...
094	...	...	...	...
095	...	...	...	...
096	...	...	...	...
097	...	...	...	...
098	...	...	...	...
099	...	...	...	...
100	...	...	...	...

Gram negativos:

De los microorganismos Gram negativos identificados, cuyos resultados figuran en la Tabla 12, se observa que los que presentan mayores proporciones son diferentes especies del género *Pseudomonas* entre las que destaca *Pseudomonas fluorescens*. *Enterobacter cloacae* también se encuentra en proporciones muy elevadas siendo incluso el microorganismo más abundante en alguno de los puntos estudiados.

TABLA 12. Identificación de microorganismos Gram negativos.

Microorganismo G-	Global vivienda (%)	Desaño bañera (%)	Pulsador retrete (%)	Desaño fregadero cocina (%)	Tirador fregadero (%)	Suelo entrada (%)
<i>Aeromonas salmonicida</i> ssp <i>salmonicida</i>	0,38	0,00	4,55	0,00	0,00	0,00
<i>Aeromonas sobria</i>	1,89	0,00	0,00	3,23	0,00	0,00
<i>Agrobacter radiobacter</i>	0,38	4,17	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Burkholderia cepacia</i>	0,38	0,00	0,00	0,65	0,00	0,00
<i>Comamonas eciolyovana</i>	0,38	0,00	4,55	0,00	0,00	0,00
<i>Enterobacter amnigenus</i>	1,13	0,00	0,00	1,94	0,00	0,00
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	0,38	0,00	0,00	0,00	2,70	0,00
<i>Enterobacter cloacae</i>	14,34	8,33	31,82	14,84	10,81	7,41
<i>Enterobacter spp.</i>	3,02	12,50	4,55	1,94	2,70	0,00
<i>Escherichia coli</i>	0,38	0,00	0,00	0,00	2,70	0,00
<i>Escherichia vulneris</i>	0,75	0,00	9,09	0,00	0,00	0,00
<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	1,13	0,00	4,55	0,00	5,41	0,00
<i>Pantoea spp. (?)</i>	12,45	4,17	18,18	2,58	37,84	37,04
<i>Pasteurella pneumolytica</i>	1,13	8,33	0,00	0,65	0,00	0,00
<i>Positividad de Brucella spp.</i>	1,13	4,17	0,00	1,29	0,00	0,00
<i>Pseudomonas / Comamonas spp.</i>	1,89	4,17	0,00	1,94	2,70	0,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,91	0,00	0,00	7,74	0,00	3,70
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	16,88	16,67	0,00	16,77	27,03	18,52
<i>Pseudomonas putida</i>	3,77	0,00	0,00	5,16	2,70	3,70
<i>Pseudomonas spp.</i>	22,64	29,17	4,55	30,97	2,70	11,11
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	3,02	0,00	9,09	0,65	2,70	14,81
<i>Rahnella aquatilis</i>	0,38	0,00	0,00	0,65	0,00	0,00
<i>Serratia liquefaciens</i>	3,02	0,00	9,09	3,87	0,00	0,00
<i>Serratia marcescens</i>	0,38	0,00	0,00	0,00	0,00	3,70
<i>Serratia odonifera</i>	0,38	0,00	0,00	0,65	0,00	0,00
<i>Serratia proteamaculans</i>	0,75	0,00	0,00	1,29	0,00	0,00
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	0,38	0,00	0,00	0,65	0,00	0,00
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,89	8,33	0,00	1,94	0,00	0,00
<i>Xanthomonas campestris</i>	0,38	0,00	0,00	0,65	0,00	0,00

El género *Enterobacter* (Tabla 13), representa prácticamente el 19% de los microorganismos Gram negativos aislados en el presente trabajo. De este modo se convierte en el segundo género, de este grupo, con más presencia en la vivienda, después de *Pseudomonas spp.* En el género *Enterobacter* cabe prestar especial atención a *Enterobacter cloacae* que además de suponer el 14.34% de los microorganismos Gram negativos presentes en la vivienda tiene un potencial riesgo patogénico.

El género *Escherichia* no es abundante en las superficies estudiadas de la vivienda, pero se ha desglosado como género de interés, en la Tabla 14, debido a su potencial patogenicidad, especialmente atribuible a *Escherichia coli*. Si bien este microorganismo a penas representa el 0.4% de los Gram negativos aislados en el estudio.

El género *Pantoea* se ha puesto en una tabla a pesar de no haberse podido identificar especies del mismo debido a su elevada presencia media en la vivienda. Así, en la Tabla 15, podemos observar como este género representa en torno al 12.5% de las bacterias Gram negativas aisladas, predominando en el tirador de la puerta del frigorífico y en el suelo de la entrada a la vivienda.

El género *Pseudomonas* (Tabla 16) es el más abundante de entre las bacterias aisladas del medio VRBG. Representan un 53.21% del total de las identificadas y destaca entre ellas, como ya se comentó anteriormente *Pseudomonas fluorescens*. Que predomina especialmente en el tirador de la puerta del frigorífico.

En la Tabla 17 se indican los porcentajes de aparición media de *Serratia spp.* en la vivienda española. Si se observa la tabla se aprecia que no es un género especialmente abundante y que no cabe destacar bajo ningún concepto.

TABLE 1. Distribution of respondents by gender

Gender	Number of respondents	Percentage
Male	10	100%
Female	10	100%
Total	20	200%

TABLE 2. Distribution of respondents by age group

Age group	Number of respondents	Percentage
18-24	10	50%
25-34	10	50%
Total	20	100%

TABLE 3. Distribution of respondents by education level

Education level	Number of respondents	Percentage
Primary	10	50%
Secondary	10	50%
Total	20	100%

**PLANTA DE INVESTIGACION Y DESARROLLO**

Actividad	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
<b>Actividad de Investigación y Desarrollo</b>	181	181	181	181	181	181	181
Actividad de Investigación y Desarrollo	181	181	181	181	181	181	181
Actividad de Investigación y Desarrollo	181	181	181	181	181	181	181
Actividad de Investigación y Desarrollo	181	181	181	181	181	181	181
<b>Total</b>	181	181	181	181	181	181	181

**PLANTA DE INVESTIGACION Y DESARROLLO**

Actividad	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
<b>Actividad de Investigación y Desarrollo</b>	181	181	181	181	181	181	181
Actividad de Investigación y Desarrollo	181	181	181	181	181	181	181
Actividad de Investigación y Desarrollo	181	181	181	181	181	181	181
Actividad de Investigación y Desarrollo	181	181	181	181	181	181	181
<b>Total</b>	181	181	181	181	181	181	181

### 4.3. Estudio de efectividad de desinfectantes.

El sumidero de la cocina, como se ha visto anteriormente, es un punto donde la contaminación por enterobacterias es elevado y, por ello, interesante de cara a contrastar la diferente actividad de los limpiadores para reducir su número. A continuación se muestran tres tablas (Tablas 18, 19 y 20) en las que se comparan los recuentos de las diversas formas de enterobacterias estudiadas (enterobacterias viables, enterobacterias adheridas, biofilm de enterobacterias) con los limpiadores de interés. Excepto para los biofilms formados por enterobacterias, los diferentes limpiadores presentan efectividades similares, sin diferencias estadísticamente significativas, a la hora de disminuir los recuentos de este grupo de microorganismos. Cuando lo que se valora es la prevención de la formación de biofilms por enterobacterias, si se aprecia una mayor eficacia del limpiador que combina lejía y detergente frente al resto.

**TABLA 18. ANOVA. Para sumidero de la cocina. Detergentes frente a enterobacterias.**

Los resultados expresan la media de los logaritmos de los recuentos para cada sensor (3,14159 cm<sup>2</sup>).

Detergentes	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Control	25	1,43*	1,26	0,91	1,95
Tensioactivos	25	1,53*	1,28	1,00	2,06
Lejía y detergente	27	1,44*	1,30	0,93	1,95
Amonio cuaternario	25	1,54*	1,32	1,00	2,09

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan; nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo único.

**TABLA 19. ANOVA. Para sumidero de la cocina. Detergentes frente a enterobacterias adheridas.**

Los resultados expresan la media de los logaritmos de los recuentos para cada sensor (3,14159 cm<sup>2</sup>).

Detergentes	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Control	25	0,74*	1,04	0,31	1,17
Tensioactivos	25	0,61*	1,14	0,14	1,08
Lejía y detergente	27	0,70*	0,91	0,34	1,06
Amonio cuaternario	25	0,78*	1,10	0,33	1,24

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan; nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo único.

**TABLA 20. ANOVA. Para sumidero de la cocina. Detergentes frente a biofilm de enterobacterias.**

Los resultados expresan la media de unos resultados que sólo pueden tomar dos valores 0 ó 1.

Detergentes	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Control	25	0,80**	0,41	0,63	0,97
Tensioactivos	25	0,96***	0,20	0,88	1,04
Lejía y detergente	27	0,74*	0,45	0,56	0,92
Amonio cuaternario	25	0,88**	0,33	0,74	1,02

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan; nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo inferior.

\*\* Grupo medio.

\*\*\* Grupo superior.

La evolución de los recuentos de las bacterias capaces de crecer y reducir el telurito de potasio en Baird-Parker, frente a la acción de los diferentes productos limpiadores estudiados, se puede observar en las cuatro tablas siguientes (Tablas 21, 22, 23 y 24).

Para los recuentos de estas bacterias, tanto totales como adheridas, el producto que contiene tensioactivos aniónicos y amonio cuaternario, es significativamente más efectivo para conseguir reducciones en los recuentos, fenómeno que no se producía con las enterobacterias. Los recuentos de bacterias Gram positivas, coagulasa positivas, fueron tan nimios, en los cuatro puntos estudiados, que apenas se pudo evaluar la desinfección diferencial conseguida por los tratamientos. La tabla correspondiente a los resultados de este grupo bacteriano se muestra a continuación para el sumidero de la cocina (Tabla 23) pero se obviarán a partir de ahora, ya que no aportan ninguna información adicional.

El producto que mejor previene la formación de biofilms es el que combina lejía y detergente.

**TABLA 21. ANOVA. Para sumidero de la cocina. Detergentes frente a bacterias de Baird-Parker.**

Los resultados expresan la media de los logaritmos de los recuentos para cada sensor (3,14159 cm<sup>2</sup>).

Detergentes	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Control	25	0,95**	1,01	0,53	1,36
Tensioactivos	23	1,31***	0,96	0,90	1,72
Lejía y detergente	27	0,80**	0,77	0,49	1,11
Amonio cuaternario	25	0,69*	0,80	0,37	1,02

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan; nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo inferior.

\*\* Grupo medio.

\*\*\* Grupo superior.

**TABLA 22. ANOVA. Para sumidero de la cocina. Detergentes frente a bacterias de Baird-Parker adheridas.**

Los resultados expresan la media de los logaritmos de los recuentos para cada sensor (3,14159 cm<sup>2</sup>).

Detergentes	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Control	25	0,66**	0,91	0,28	1,03
Tensioactivos	23	0,91***	0,95	0,50	1,33
Lejía y detergente	27	0,51**	0,72	0,22	0,79
Amonio cuaternario	25	0,38*	0,58	0,15	0,62

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan; nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo inferior.

\*\* Grupo medio.

\*\*\* Grupo superior.

**TABLA 23. ANOVA. Para sumidero de la cocina. Detergentes frente a bacterias coagulasa positivo.**

Los resultados expresan la media de los logaritmos de los recuentos para cada sensor (3,14159 cm<sup>2</sup>).

Detergentes	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Control	25	0,04*	0,15	-0,02	0,10
Tensioactivos	23	0,01*	0,06	-0,01	0,04
Lejía y detergente	27	0,00*	0,00	0,00	0,00
Amonio cuaternario	25	0,00*	0,00	0,00	0,00

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan; nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo único.

**TABLA 24. ANOVA . Para sumidero de la cocina. Detergentes frente a biofilm de bacterias de Baird-Parker.**

Los resultados expresan la media de unos resultados que sólo pueden tomar dos valores 0 ó 1.

Detergentes	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Control	25	0,68**	0,48	0,48	0,88
Tensioactivos	23	0,91***	0,29	0,79	1,04
Lejía y detergente	27	0,52*	0,51	0,32	0,72
Amonio cuaternario	25	0,84***	0,37	0,69	0,99

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan; nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo inferior.

\*\* Grupo medio.

\*\*\* Grupo superior.

Las Tablas 25, 26 y 27 contienen los resultados de los recuentos obtenidos de enterobacterias totales, enterobacterias adheridas y biofilm formado por enterobacterias, en la zona donde se prepara el alimento en la cocina, para cada uno de los tres limpiadores probados y para el limpiador control. En ellas se aprecia como ninguno de los cuatro limpiadores tiene una efectividad significativamente superior para la reducción de enterobacterias y enterobacterias con capacidad de adhesión. En cambio, el producto que combina hipoclorito sódico y detergente tiene un efecto protector frente a la formación de biofilms significativamente superior al resto. Mientras que el producto que incluye en su formulación sólo tiene tensioactivos y jabón es el que tiene una efectividad significativamente inferior, al resto, frente a la prevención de formación de agregados microbianos de enterobacterias.

**TABLA 25. ANOVA. Para zona de trabajo en la cocina. Detergentes frente a enterobacterias.**

Los resultados expresan la media de los logaritmos de los recuentos para cada sensor (3,14159 cm<sup>2</sup>).

Detergentes	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Control	25	1,30*	1,31	0,76	1,85
Tensioactivos	26	1,52*	1,27	1,00	2,03
Lejía y detergente	27	1,13*	1,39	0,58	1,68
Amonio cuaternario	27	1,28*	1,27	0,78	1,78

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan; nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo único.

**TABLA 26. ANOVA. Para zona de trabajo en la cocina. Detergentes frente a enterobacterias adheridas.**

Los resultados expresan la media de los logaritmos de los recuentos para cada sensor (3,14159 cm<sup>2</sup>).

Detergentes	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Control	25	0,65*	0,99	0,24	1,06
Tensioactivos	26	0,44*	0,89	0,08	0,80
Lejía y detergente	27	0,89*	1,29	0,38	1,40
Amonio cuaternario	27	0,56*	0,92	0,19	0,92

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan; nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo único.

**TABLA 27. ANOVA. Para zona de trabajo en la cocina. Detergentes frente a biofilm de enterobacterias.**

Los resultados expresan la media de unos resultados que sólo pueden tomar dos valores 0 ó 1.

Detergentes	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Control	25	0,68**	0,48	0,48	0,88
Tensioactivos	26	0,92***	0,27	0,81	1,03
Lejía y detergente	27	0,56*	0,51	0,36	0,76
Amonio cuaternario	27	0,78**	0,42	0,61	0,95

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan; nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo inferior.

\*\* Grupo medio.

\*\*\* Grupo superior.

En la Tabla 28 se observan los recuentos obtenidos en la zona de trabajo de la cocina, para bacterias capaces de crecer y reducir el telurito de potasio en medio de cultivo Baird-Parker. Las pruebas estadísticas llevadas a cabo tampoco muestran diferencias significativas en el caso de células aisladas frente a los diferentes limpiadores. Sí se observan, en cambio, como ya ha sucedido anteriormente, la mayor protección que confiere la combinación de lejía y detergente frente a la formación de biofilms de este grupo bacteriano (Tabla 30).

**TABLA 28. ANOVA. Para zona de trabajo en la cocina. Detergentes frente a bacterias de Baird-Parker.**

Los resultados expresan la media de los logaritmos de los recuentos para cada sensor (3,14159 cm<sup>2</sup>).

Detergentes	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Control	25	1,01*	0,93	0,63	1,39
Tensioactivos	25	1,04*	1,07	0,60	1,48
Lejía y detergente	27	1,13*	0,86	0,79	1,47
Amonio cuaternario	25	0,77*	0,96	0,37	1,17

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan; nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo único.

**TABLA 29. ANOVA. Para zona de trabajo en cocina. Detergentes frente a bacterias Baird-Parker adheridas.**

Los resultados expresan la media de los logaritmos de los recuentos para cada sensor (3,14159 cm<sup>2</sup>).

Detergentes	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Control	25	0,75*	0,77	0,43	1,07
Tensioactivos	25	0,79*	1,14	0,32	1,26
Lejía y detergente	27	0,70*	0,72	0,42	0,99
Amonio cuaternario	25	0,43*	0,84	0,08	0,78

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan; nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo único.

**TABLA 30. ANOVA. Para zona de trabajo en cocina. Detergentes frente a biofilm de bacterias Baird-Parker.**

Los resultados expresan la media de unos resultados que sólo pueden tomar dos valores 0 ó 1.

Detergentes	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Control	25	0,60**	0,50	0,39	0,81
Tensioactivos	25	0,84***	0,37	0,69	0,99
Lejía y detergente	27	0,33*	0,48	0,14	0,52
Amonio cuaternario	25	0,60**	0,50	0,39	0,81

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan; nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo inferior.

\*\* Grupo medio.

\*\*\* Grupo superior.

El número de enterobacterias totales, hallado en el sumidero del lavamanos del lavabo, presenta diferencias estadísticamente significativas para el limpiador que sólo contiene tensioactivos y jabón. Los recuentos para este limpiador son más altos que para el resto de desinfectantes utilizados. En cambio, los recuentos de enterobacterias adheridas o de formación de biofilm no son diferentes, según las pruebas estadísticas llevadas a cabo con ellos, como se puede apreciar en las Tablas 31, 32 y 33.

**TABLA 31. ANOVA. Para sumidero del lavabo. Detergentes frente a enterobacterias.**

Los resultados expresan la media de los logaritmos de los recuentos para cada sensor (3,14159 cm<sup>2</sup>).

Detergentes	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Control	24	0,78*	1,16	0,29	1,27
Tensioactivos	23	1,50**	1,26	0,95	2,05
Lejía y detergente	27	0,70*	1,17	0,24	1,17
Amonio cuaternario	24	0,40*	0,97	-0,01	0,81

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan; nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo inferior.

\*\* Grupo superior.

**TABLA 32. ANOVA. Para sumidero del lavabo. Detergentes frente a enterobacterias adheridas.**

Los resultados expresan la media de los logaritmos de los recuentos para cada sensor (3,14159 cm<sup>2</sup>).

Detergentes	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Control	24	0,46*	1,03	0,03	0,90
Tensioactivos	23	0,32*	0,56	0,08	0,56
Lejía y detergente	27	0,33*	0,86	-0,01	0,67
Amonio cuaternario	24	0,30*	0,83	-0,05	0,65

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan; nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo único.

**TABLA 33. ANOVA. Para sumidero del lavabo. Detergentes frente a biofilm de enterobacterias.**

Los resultados expresan la media de unos resultados que sólo pueden tomar dos valores 0 ó 1.

Detergentes	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Control	24	0,38*	0,49	0,17	0,58
Tensioactivos	23	0,65*	0,49	0,44	0,86
Lejía y detergente	27	0,41*	0,50	0,21	0,61
Amonio cuaternario	24	0,38*	0,49	0,17	0,58

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan; nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo único.

En las Tablas 34, 35 y 36, se analizan los datos obtenidos respecto a la efectividad de los diferentes desinfectantes frente al grupo de bacterias capaces de crecer en medio de cultivo Baird-Parker y reducir el telurito de potasio. Se aprecian propiedades desinfectantes similares en los cuatro tipos de limpiadores para bacterias tanto libres como adheridas. La situación cambia cuando hacemos referencia a la formación de biofilms. En este punto resulta el limpiador control el más efectivo para prevenir la formación del biofilm, siendo el limpiador control un producto cualquiera que se utilizase en cada casa como limpiador habitual del hogar. Si obviamos este limpiador aleatorio, el más efectivo contra la formación de biofilms vuelve a ser el que combinación de lejía y detergente.

**TABLA 34. ANOVA. Para sumidero del lavabo. Detergentes frente a bacterias de Baird-Parker.**

Los resultados expresan la media de los logaritmos de los recuentos para cada sensor (3,14159 cm<sup>2</sup>).

Detergentes	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Control	25	0,93*	0,88	0,57	1,29
Tensioactivos	22	1,14*	0,85	0,77	1,51
Lejía y detergente	24	0,91*	0,91	0,53	1,30
Amonio cuaternario	24	0,87*	0,95	0,47	1,27

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan; nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo único.

**TABLA 35. ANOVA. Para sumidero del lavabo. Detergentes frente a bacterias de Baird-Parker adheridas.**

Los resultados expresan la media de los logaritmos de los recuentos para cada sensor (3,14159 cm<sup>2</sup>).

Detergentes	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Control	25	0,72*	0,76	0,40	1,03
Tensioactivos	22	0,93*	0,85	0,55	1,31
Lejía y detergente	25	0,61*	0,79	0,28	0,93
Amonio cuaternario	24	0,78*	0,96	0,37	1,18

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan; nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo único.

**TABLA 36. ANOVA. Para sumidero del lavabo. Detergentes frente a biofilm de bacterias de Baird-Parker.**

Los resultados expresan la media de unos resultados que sólo pueden tomar dos valores 0 ó 1.

Detergentes	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Control	25	0,24*	0,44	0,06	0,42
Tensioactivos	22	0,68****	0,48	0,47	0,89
Lejía y detergente	24	0,38**	0,49	0,17	0,58
Amonio cuaternario	24	0,63***	0,49	0,42	0,83

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan; nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo inferior.

\*\* Grupo medio bajo.

\*\*\* Grupo medio alto.

\*\*\*\* Grupo superior.

En el análisis de datos llevado a cabo con los recuentos de enterobacterias obtenidos en la zona donde se coloca el jabón de manos en el lavabo no se han encontrado actividades desinfectantes diferenciales por lo que respecta a enterobacterias totales o adheridas en esta zona. Sí las hay frente a la formación de biofilms. Otra vez el desinfectante control vuelve a ser el que mejor previene la formación de biofilms, mientras que el limpiador que sólo contiene tensioactivos y jabón es, de igual modo que en ocasiones precedentes, el significativamente menos eficaz en este aspecto (Tablas 37, 38 y 39).

**TABLA 37. ANOVA. Para zona del jabón en el lavabo. Detergentes frente a enterobacterias.**

Los resultados expresan la media de los logaritmos de los recuentos para cada sensor (3,14159 cm<sup>2</sup>).

Detergentes	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Control	23	0,36*	0,90	-0,03	0,75
Tensioactivos	25	0,54*	1,04	0,11	0,97
Lejía y detergente	28	0,44*	0,92	0,08	0,79
Amonio cuaternario	27	0,24*	0,80	-0,07	0,56

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan; nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo único.

**TABLA 38. ANOVA. Para zona del jabón en el lavabo. Detergentes frente a enterobacterias adheridas.**

Los resultados expresan la media de los logaritmos de los recuentos para cada sensor (3,14159 cm<sup>2</sup>).

Detergentes	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Control	23	0,27*	0,76	-0,06	0,60
Tensioactivos	25	0,51*	1,05	0,07	0,94
Lejía y detergente	28	0,14*	0,42	-0,02	0,30
Amonio cuaternario	27	0,19*	0,67	-0,07	0,45

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan; nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo único.

**TABLA 39. ANOVA. Para zona del jabón en el lavabo. Detergentes frente a biofilm de enterobacterias.**

Los resultados expresan la media de unos resultados que sólo pueden tomar dos valores 0 ó 1.

Detergentes	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Control	23	0,17*	0,39	0,01	0,34
Tensioactivos	25	0,44***	0,51	0,23	0,65
Lejía y detergente	28	0,29**	0,46	0,11	0,46
Amonio cuaternario	27	0,19**	0,40	0,03	0,34

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan; nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo inferior.

\*\* Grupo medio.

\*\*\* Grupo superior.

De igual modo que en el sumidero del lavamanos del lavabo para el grupo de bacterias capaces de multiplicarse en medio de cultivo Baird-Parker y reducir el telurito, en la zona donde se sitúa el jabón de manos del lavabo, no se aprecian diferencias de recuento para los diversos productos utilizados. Por lo que respecta a la valoración de la capacidad inhibición de formación de biofilms de este grupo de microorganismos, en este caso, tampoco se aprecian diferencias estadísticamente significativas de unos limpiadores respecto a otros, probablemente debido a los bajos recuentos que presenta la zona (Tablas 40, 41 y 42).

**TABLA 40. ANOVA. Para zona del jabón en el lavabo. Detergentes frente a bacterias de Baird-Parker.**

Los resultados expresan la media de los logaritmos de los recuentos para cada sensor (3,14159 cm<sup>2</sup>).

Detergentes	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Control	26	0,73*	0,88	0,38	1,09
Tensioactivos	26	1,01*	0,87	0,66	1,36
Lejía y detergente	26	1,03*	1,00	0,62	1,43
Amonio cuaternario	28	0,64*	0,84	0,31	0,96

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan; nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo único.

**TABLA 41. ANOVA. Para zona del jabón en lavabo. Detergentes frente a bacterias Baird-Parker adheridas.**

Los resultados expresan la media de los logaritmos de los recuentos para cada sensor (3,14159 cm<sup>2</sup>).

Detergentes	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Control	26	0,56*	0,85	0,22	0,91
Tensioactivos	26	0,65*	0,88	0,29	1,00
Lejía y detergente	26	0,56*	0,75	0,26	0,86
Amonio cuaternario	28	0,57*	0,84	0,24	0,89

Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan; nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo único.

**TABLA 42. ANOVA. Para zona del jabón en lavabo. Detergentes frente a biofilm de bacterias Baird-Parker.**

Los resultados expresan la media de unos resultados que sólo pueden tomar dos valores 0 ó 1.

Detergentes	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Control	26	0,12*	0,33	-0,02	0,25
Tensioactivos	26	0,27*	0,45	0,09	0,45
Lejía y detergente	26	0,23*	0,43	0,06	0,40
Amonio cuaternario	28	0,25*	0,44	0,08	0,42

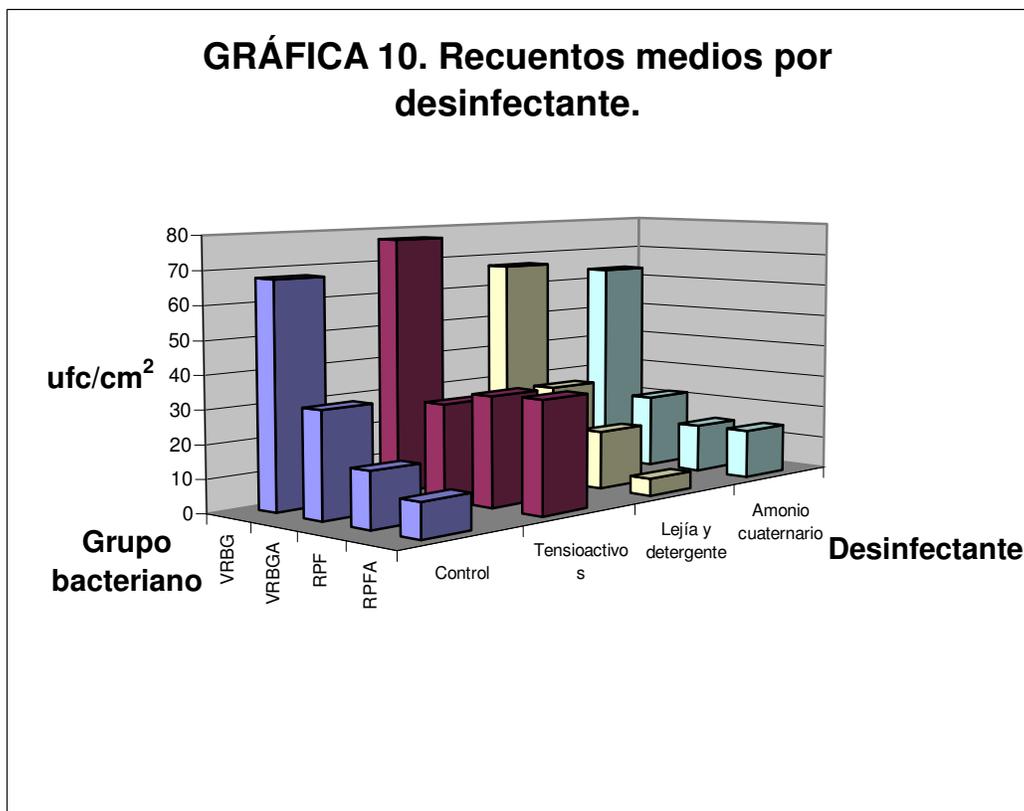
Prueba de homogeneidad de medias realizado mediante la prueba de Duncan; nivel de significación  $p < 0,05$ .

\* Grupo único.

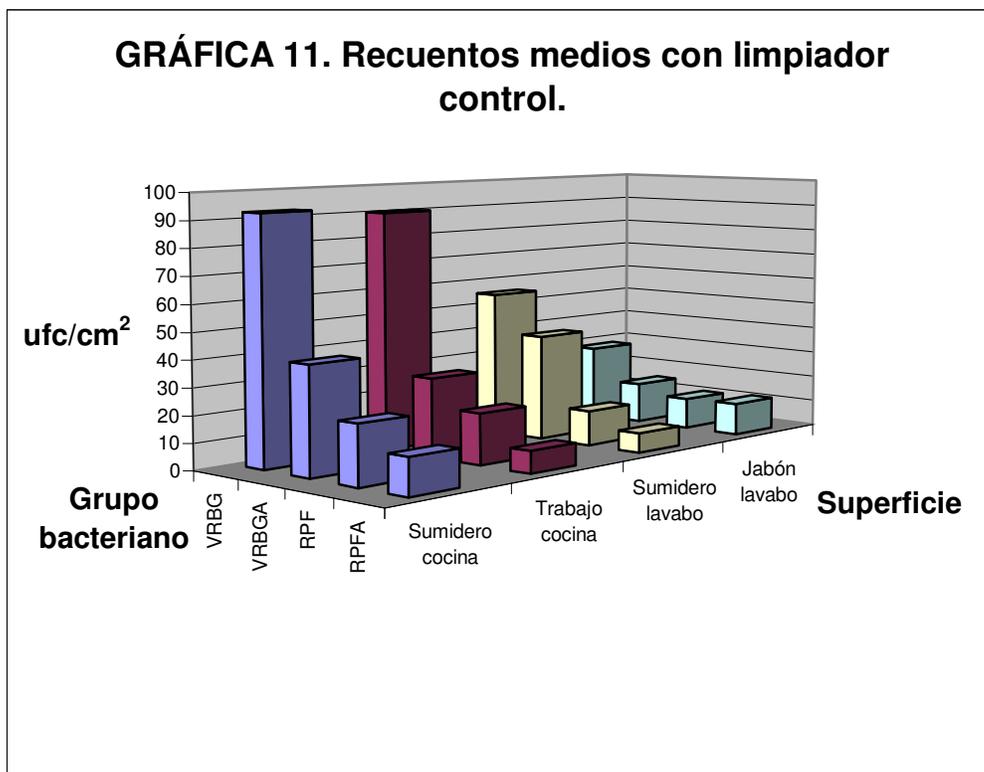
A continuación se muestran las gráficas con los recuentos medios por centímetro cuadrado. Son gráficas tridimensionales en las que en el techo de cada barra se cruzan las tres variables de interés, que son:

- Grupo bacteriano.
- Superficie estudiada.
- Recuento obtenido por centímetro cuadrado.

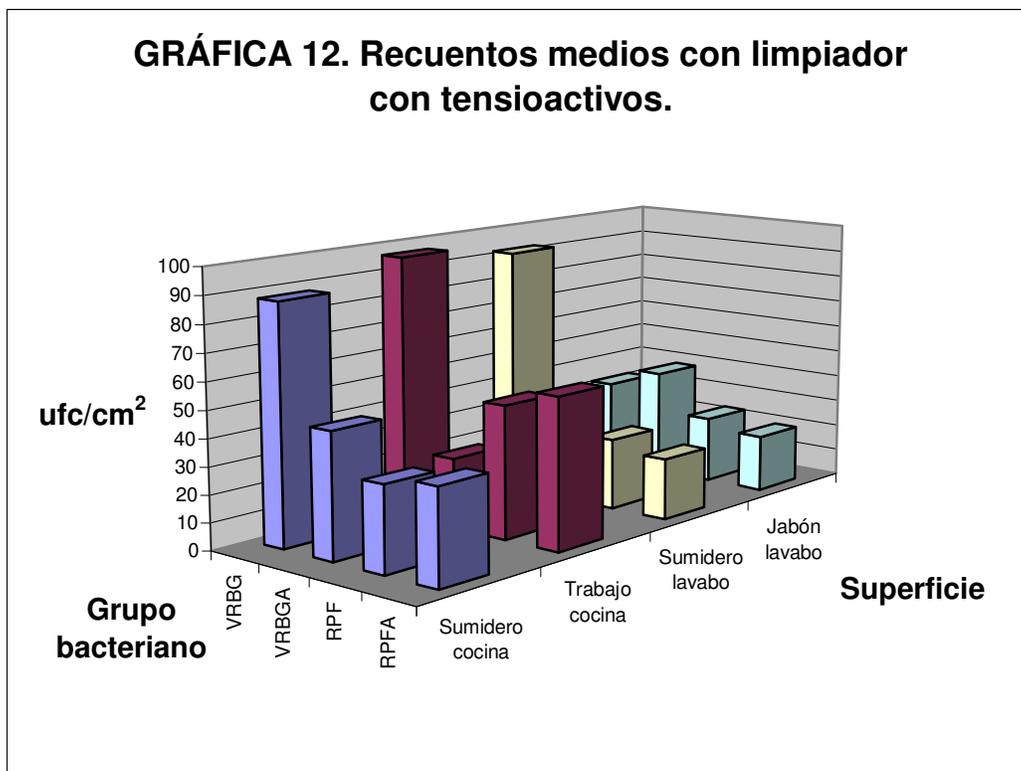
La primera gráfica, Gráfica 10, es ligeramente diferente ya que no pretende comparar efectividad en diferentes superficies sino contrastar la eficacia de cada uno de los limpiadores incluidos en el estudio. Por ello la variable superficie ha sido sustituida por desinfectante. En la comparación, cuyos resultados se muestran gráficamente bajo estas líneas, se observa que la utilización continuada del producto comercial que contiene amonio cuaternario permite obtener recuentos inferiores al resto. Al contrario, el que está formulado exclusivamente con tensioactivos, provoca menores reducciones bacterianas para todos los grupos bacterianos estudiados.



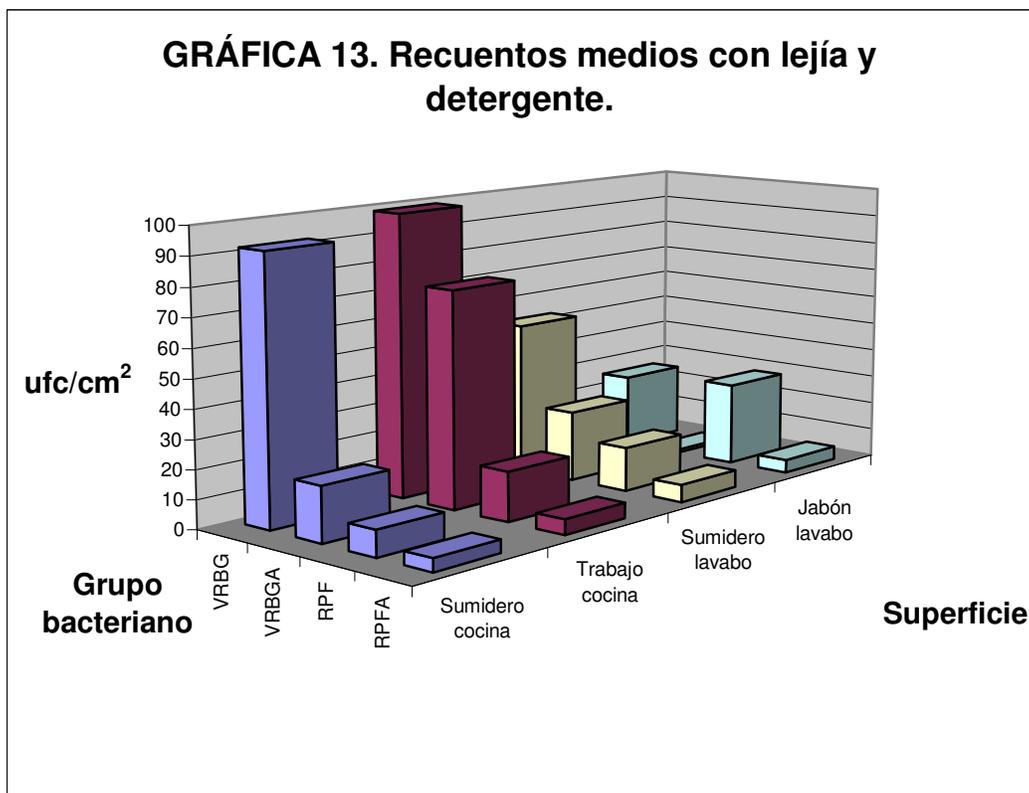
El limpiador control presenta recuentos medios para las enterobacterias en la cocina de 90 ufc/cm<sup>2</sup> mientras que en el sumidero del lavabo alcanzan cotas menores, rondando las 55 ufc/cm<sup>2</sup>. Los recuentos de bacterias capaces de crecer y reducir el telurito de potasio en medio de cultivo Baird-Parker son a penas 20 ufc/cm<sup>2</sup> en la cocina y están por debajo de 10 ufc/cm<sup>2</sup> en el lavabo (Gráfica 11).



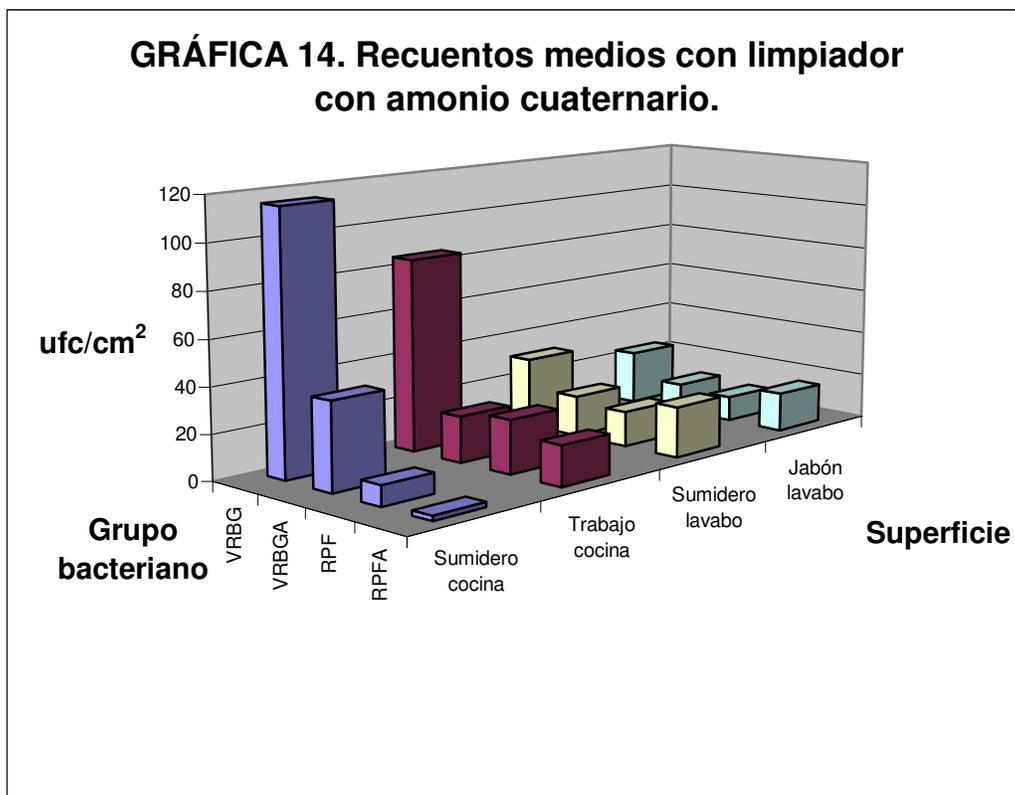
Como se ha comentado en la primera gráfica el producto que sólo contiene tensioactivos es el desinfectante menos eficaz de los probados. Como se puede ver en la Gráfica 12, tanto en las zonas de estudio de la cocina, como en el sumidero del lavabo, las enterobacterias se hallan en recuentos que rondan las 90 ufc/cm<sup>2</sup>. Los microorganismos capaces de crecer en medio de cultivo Baird-Parker y reducir el telurito de potasio se encuentran en la zona de preparación de alimentos entorno a las 50 ufc/cm<sup>2</sup>. En el sumidero de la cocina, punto generalmente muy contaminado, este grupo microbiano tiene recuentos que rondan las 30 ufc/cm<sup>2</sup>.



Los recuentos medios, después de una semana de utilización del producto que combina lejía y detergente, para las enterobacterias presentes en la cocina se encuentran entre 90-100 ufc/cm<sup>2</sup>, como se puede ver en la Gráfica 13. En medio Baird-Parker el crecimiento de colonias fue sensiblemente inferior al de enterobacterias, hallándose en la mayoría de los puntos por debajo de la veintena de bacterias viables por centímetro cuadrado.



El producto que contiene amonio cuaternario en su formulación es el que presenta menores recuentos medios después de su utilización "in situ" de todos los productos que se han analizado en este estudio. Así, si no tenemos en cuenta los valores de enterobacterias encontrados en la cocina, que son valores prácticamente iguales para todos los productos, vemos que las barras de la Gráfica 14 son, todas, mucho más pequeñas que en las tablas precedentes.



## 5. DISCUSIÓN.

### 5.1. Estudio casas.

Diversos estudios señalan que en el hogar se producen más toxiinfecciones que en el total de las otras fuentes de toxiinfección (Hilton y Austin, 2000; Anónimo, 1998 a).

Según (Scott y Bloomfield, 1993) una superficie que supere el recuento de  $10^2$  CFU/cm<sup>2</sup> tiene una contaminación elevada, ya sean únicamente bacterias de origen entérico o con otras bacterias potencialmente patógenas. Mientras que (Ak y cols., 1994) en otro estudio consideraron como elevados niveles que superaran  $3.9 \cdot 10^2$  CFU/cm<sup>2</sup> del TVC.

Si bien según (Kassa y cols., 2001) los organismos entéricos son probablemente los más significativos como organismos indicador de contaminación fecal en los sitios muestreados.

Los recuentos de enterobacterias obtenidos en nuestro estudio, llevado a cabo en 250 viviendas distribuidas en cuatro grandes ciudades de España, nos muestran que el desagüe de la bañera y el desagüe del fregadero de la cocina, con 70 y 150 ufc/cm<sup>2</sup> respectivamente, son los puntos más contaminados por este grupo bacteriano. Esto se puede deber a que son puntos que permanecen húmedos durante muchas horas a lo largo del día y en los que además se acumulan restos de materia orgánica. En la cocina el crecimiento microbiano se podría ver alentado debido a que las temperaturas medias en esa estancia son más elevadas que en el resto de la vivienda. Además muchos de los alimentos que allí se procesan, especialmente los crudos, son inoculadores de enterobacterias y otros tipos de bacterias. Y es que según (Scott y cols., 1982) probablemente la comida es la principal fuente de introducción de contaminación microbiológica en la cocina. La cocina es, probablemente, el lugar más importante donde se pueden esconder y transmitir infecciones (Scott y cols., 1984).

En los otros tres puntos muestreados los recuentos son significativamente menores (no superan en ningún caso las 20 ufc/cm<sup>2</sup>) por lo que en principio no constituirían un riesgo para la salud.

Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por (Rusin y cols., 1998) encontraron que el entorno de la cocina estaba mucho más contaminado con coliformes fecales y totales que el lavabo, lo que sugiere la extensión del riesgo en el hogar es sumamente mayor en el entorno de la cocina. La presencia de estas bacterias entéricas en el fregadero lavamanos y en el tirador de la nevera y congelador indica un riesgo potencial de contaminación de los alimentos si los manipuladores son portadores o están infectados con patógenos entéricos (Roels y cols., 1997).

Los recuentos de enterobacterias de las otras tres superficies estudiadas entran dentro de lo permisible y en principio no supondrían un riesgo para la salud.

En cuanto a enterobacterias con capacidad de adhesión a la superficie si bien no son importantes en cuanto a número, ya que en ninguno de los puntos estudiados alcanzan las 4 ufc/cm<sup>2</sup>, sí lo son en cuanto al riesgo que suponen, ya que eliminar estas bacterias requerirá un mayor esfuerzo. Si el tratamiento de limpieza y desinfección no se hace según el protocolo establecido, probablemente estas bacterias quedarán allí pudiendo formar a posteriori un biofilm con el riesgo que ello implica. Incluso hay quien indica que a pesar de los programas convencionales de limpieza, las bacterias adheridas pueden sobrevivir y proliferar en las superficies de los equipos que tratan alimentos (Austin y Berferon, 1995).

El crecimiento de biofilms en los entornos de procesamiento de alimentos proporciona una mayor oportunidad para la contaminación microbiana del producto procesado, lo que incrementa el riesgo de transmisión de enfermedades (Frank y Koffi, 1990; McCarthy, 1992; Ronner y Wong, 1993).

En cuanto a la presencia de biofilm formado por enterobacterias, este se halla mayoritariamente en las dos zonas más húmedas. Zonas donde los recuentos microbianos son más elevados que en los otros puntos y, por tanto, más susceptibles de permitir la formación de aglomerados bacterianos. Estos resultados son coincidentes con (Scott y cols., 1982) quienes encontraron que las enterobacterias se hallaban muy frecuentemente en lugares húmedos donde solían estar en números muy grandes y eran el microorganismo predominante.

A estos dos puntos de recuentos elevados se le suma uno de escasa relevancia por número de enterobacterias viables, pero que claramente la tiene en la formación de biofilms. Es el tirador de la puerta de la nevera, que tiene un índice de formación de biofilm de entorno al 40 %. Esta elevada formación de biofilms sobre esta superficie puede deberse al hecho de que en muchas ocasiones se toca mientras se está manipulando alimentos y por tanto con restos de estos y con las manos húmedas. Esto provoca que los microorganismos que se depositen sobre el tirador de la puerta del frigorífico se puedan ver protegidos y nutridos por restos de materia orgánica. Esa protección sería frente a la limpieza, en primer término, limpieza que en muchos casos además no va acompañada de desinfección como en otras superficies. Y frente a la deshidratación, en segundo término, lo cual permitiría a una parte de esas bacterias adherirse primero y formar un biofilm después.

Una limpieza inadecuada de las superficies promueve la acumulación de suciedad y, en presencia de agua, contribuye al desarrollo de los biofilms bacterianos que pueden contener microorganismos patógenos (Boulangé-Peterman y cols., 1993).

El espacio temporal para el desarrollo de un biofilm es generalmente corto y varía en función de la temperatura y disponibilidad de nutrientes (Holah, 1995).

Los recuentos de bacterias capaces de crecer en medio de cultivo Baird-Parker y reducir el telurito de potasio nos muestran que, el desagüe de la bañera y cocina y el suelo de la entrada al domicilio, son los puntos más contaminados

por este grupo microbiano. Si bien, los recuentos de este grupo bacteriano en todas las superficies estudiadas es inferior al de enterobacterias.

En el caso de la bañera, el alto recuento se puede deber a la combinación de humedad continuada y restos de materia orgánica acumulada, procedente de la descamación de la piel durante la ducha. En la entrada del domicilio la elevada presencia de este tipo de bacterias se podría explicar por la introducción de estas desde la calle, o bien, debido a descamación natural de la piel y con ella la flora acompañante que iría a parar al suelo del domicilio. Contaminación que, por otra parte, tiene pocas posibilidades de proliferar, al descansar sobre una superficie, generalmente seca y sobre la que se suele aplicar un proceso de limpieza y desinfección con cierta asiduidad. Además, debido a su ubicación, tiene pocos visos de suponer un riesgo para la salud, ya que no hay vías aparentes de contacto entre ella y los alimentos que se vayan a consumir en el hogar.

Por lo que respecta a las bacterias de este grupo, con capacidad de adhesión a la superficie, los mayores recuentos se encuentran en los dos desagües estudiados y, por tanto, dicha capacidad de adhesión sería lógicamente atribuible a la mediación del agua presente en ambas superficies. En las otras tres zonas, los recuentos son inferiores a la unidad formadora de colonias por centímetro cuadrado, incluso en el suelo de entrada a la vivienda, donde los recuentos eran significativamente más altos que en el desagüe del fregadero de la cocina.

El principal interés de estudio de este grupo era obtener una indicación del recuento de *Staphylococcus aureus* en los cinco puntos analizados ya que, como indican (Jablonsky y Bohach, 1997), *Staphylococcus aureus* es un importante patógeno alimentario, y la intoxicación estafilocócica es una de las causas más prevalentes de gastroenteritis en el mundo.

El esquema de distribución de este microorganismo es similar al encontrado para todo el grupo bacteriano capaz de crecer en medio de cultivo Baird-Parker y reducir el telurito de potasio. Los recuentos más altos se encontraron en el

desagüe de la bañera y en el suelo de entrada a la vivienda, si bien estos sólo alcanzaron el recuento medio de 5 ufc/cm<sup>2</sup> en el desagüe de la bañera, siendo este el punto más contaminado por *Staphylococcus aureus* de los cinco estudiados. Las causas para justificar esta distribución no se estiman muy diferentes de las que se consideraron para todo el grupo. Los riesgos que implica esta distribución no parecen merecer más consideración que la recomendación de practicar una adecuada limpieza y desinfección de estos puntos, ya que *Staphylococcus aureus* necesita crecer hasta alcanzar concentraciones de 10<sup>5</sup> ufc/g para producir la toxina y provocar la enfermedad (Bergdoll, 1989). Si bien no hay que olvidar que está presente y ante un eventual cambio de condiciones (mayor humedad y nutrientes o descuido en la desinfección) podría multiplicarse o llegar a los alimentos.

La presencia de biofilms formados por microorganismos de este grupo bacteriano es más importante que en el caso de las enterobacterias y se distribuyen de manera más homogénea en los puntos estudiados de la vivienda, si exceptuamos el desagüe del fregadero de la cocina, donde la frecuencia de aparición es significativamente mayor. Esta amplia distribución de biofilms formados por este heterogéneo grupo de bacterias capaces de crecer en medio Baird-Parker y reducir el telurito de potasio se debe principalmente a la resistencia frente a la desecación que presentan muchas de estos microorganismos. En algunos casos se explica por su facilidad para la agregación. Un ejemplo de ello es *Staphylococcus aureus*, a quien 15 minutos de aire secante no reduce significativamente su recuento en las superficies, posiblemente debido a su estructura grupal, lo que corrobora su tolerancia frente a las condiciones secas (Kusumaningrum y cols., 2003), y en otros por lo heterogéneo del grupo que le confiere una mayor resistencia a los factores de estrés como indican (Kumar y Anand, 1998).

Si bien hemos encontrado que en las zonas secas los recuentos de bacterias libres y adheridas son mayores para las bacterias capaces de multiplicarse en Baird-Parker y reducir el telurito de potasio que el de enterobacterias, por lo que queda demostrado que son más resistentes a la desecación que las enterobacterias.

Según estos investigadores, los biofilms formados por varias especies diferentes, son más gruesos y estables frente al estrés ambiental que los biofilms monoespecíficos. La estabilización de los biofilms mixtos posiblemente se deba a la producción de diferentes sustancias poliméricas extracelulares resultantes de la actividad de diferentes especies de microorganismos (Chmielewski y Frank, 2003). Estos dos factores explicarían por qué los microorganismos que son capaces de crecer en el medio de cultivo Baird-Parker son capaces de mostrar tantos biofilms en todos los puntos estudiados. La disponibilidad de agua y materia orgánica, serían las causas que explicasen porque el desagüe del fregadero de la cocina tiene un índice de formación de biofilms significativamente superior al resto de puntos, ya altos de por sí.

El hecho de que este grupo bacteriano tenga tanta facilidad para formar biofilms es preocupante, en cuanto a que los biofilms son difíciles de eliminar una vez se forman en una superficie. Según Frank y Koffi (1990) la formación de biofilms y el subsiguiente desprendimiento de los mismos sobre alimentos, puede suponer una importante fuente de contaminación en alimentos y provocar importantes brotes de enfermedades transmitidas por alimentos.

## **5.2. Identificaciones.**

Las comparaciones de perfiles llevadas a cabo entre las diferentes superficies de la vivienda analizadas, para cada uno de los dos grupos bacterianos, muestran que la microbiota es genuina de cada una de ellas. Ni siquiera la flora media de la vivienda es comparable, en cuanto a perfil de especies residentes, a ninguna superficie concreta. Estos resultados son fruto de la precisión de las identificaciones, que alcanzó el nivel de especie. Si nos hubiéramos quedado en el género el análisis estadístico, probablemente, no hubiera mostrado diferencias significativas entre cada uno de los puntos estudiados, ya que los géneros predominantes acaparan porcentajes importantes de las bacterias identificadas.

Lo mismo se puede decir de las identificaciones llevadas a cabo con las bacterias que habían crecido en medio de cultivo Baird-Parker y habían sido capaces de reducir el telurito de potasio. El género claramente predominante en todos los puntos es *Staphylococcus*, un análisis de Chi cuadrado con los resultados mostrados por géneros probablemente no hubiera encontrado diferencias significativas entre las superficies estudiadas.

El hecho de que identificando hasta la especie nos muestre diferencias significativas en cada una de las superficies estudiadas se podría deber a que a pesar de que los microorganismos que pueblan cada una de las superficies, por lo general, son evolutivamente próximos entre ellos, las diferentes condiciones que se dan en cada una de estas superficies estudiadas provocarían que algunas especies predominasen en número sobre otras ya que entre ellos se establece un ecosistema de desplazamiento por multiplicación. Aquellos a los que las condiciones físico-químicas le sean propicias tendrán mayor capacidad de multiplicación y acabarán por desplazar, eliminar, a los que no sean capaces de multiplicarse en tasa elevada.

En el global de la vivienda, entre los microorganismos que las tiras comerciales de identificación "ID 32E" y "ID 32GN" son capaces de identificar, se hayan en mayor número, *Pseudomonas spp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter cloacae* y *Pantoea spp.* por este orden de importancia. Entre ellos acaparan el 70%, aproximadamente, de las bacterias de este grupo encontrados en el hogar. Se sabe desde hace tiempo que las Pseudomonaceas son tremendamente abundantes. Scott y cols., (1982) encontraron Pseudomonaceas en el 91% de los hogares en una o más superficies.

De estos microorganismos cabe destacar *Enterobacter cloacae* dada su capacidad patogénica. Microorganismo, por tanto, al que hay que prestar especial atención y de cara al cual deberían enfocarse los sistemas de higienización en el hogar. Este microorganismo adquiere su mayor protagonismo en el tirador del retrete, donde es el microorganismo de este grupo más abundante. Ello indica que preparar alimentos después de una mala

o nula limpieza de las manos al terminar de deponer implicaría un alto riesgo de que este microorganismo pasara a los alimentos.

*Salmonella* es la causante de muchos de los brotes por intoxicación alimentaria causados en el hogar, si bien el presente estudio no ha encontrado la bacteria. Estos resultados son coincidentes con los de (Scott y cols., 1982). Según estos autores no esperaban encontrar *Salmonella* en gran número en un muestreo de 250 casas. Los casos de enfermedad por *Salmonella enteritidis* han sido frecuentemente atribuidos al consumo de huevos crudos o poco hechos (Hayes y cols., 1999). Por lo que no necesariamente se debe encontrar en las superficies analizadas ya que la vía de llegada del patógeno al huésped suele ser directamente por un alimento que lo contenga o bien mediante la contaminación cruzada entre alimentos y no entre superficies y alimento. Sin embargo esta última vía no cabe desestimarla por completo ya que, como apunta Cogan (2002), aunque los niveles de contaminación en las superficies por *Salmonella* suelen ser bajos incluso en esos números puede ser suficiente para el crecimiento seguido de contaminación cruzada con alimentos cocinados.

Según Tierney y cols. (2003) *E. coli* se aísla con mayor frecuencia que *Salmonella* de los sitios muestreados y se encuentran en mayor proporción ambos en las muestras del fregadero, el escurridor y la superficie alrededor del grifo. En el estudio llevado a cabo por Kassa y cols. (2001) en 70 restaurantes no se encontraron aislamientos de los patógenos más frecuentes (*Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *E. coli* O157:H7, *Yersinia* y *Vibrio*) pero sí se aislaron bastantes bacterias del grupo *Aeromonas*-*Plesiomonas*, que se sabe causan gastroenteritis. Estos resultados apuntan en la misma dirección que los obtenidos en el presente trabajo. Si bien, no se han encontrado bacterias de la especie *Aeromonas hydrophila*, la principal causante de gastroenteritis del género, sí se han aislado e identificado especies próximas como *Aeromonas sobria* y *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida*.

La elevada presencia en todas las superficies estudiadas de *Pseudomonas fluorescens*, a la que, en cambio, no se le conocen cuadros de patogeneidad

en personas sanas es digna de tener en cuenta. Por lo que se propone como microorganismo de referencia a la hora de evaluar la eficacia de los productos desinfectantes destinados al uso doméstico. Ya que como apunta Jeffrey (1995) no todos los productos desinfectantes utilizados en el hogar son completamente eficaces contra *Pseudomonas spp.* e incluso diferentes cepas de la misma especie de bacterias pueden tener resistencia diferencial.

Por lo que respecta al género *Pantoea*, decir que es un género en el que no se conocen especies patógenas y por tanto no supone riesgo alguno en personas sanas. Nunes y cols. (2001) proponen la utilización de una especie del género (*Pantoea agglomerans*) como inhibidor competitivo de patógenos presentes en peras. Una línea interesante de estudio futuro sería, aprovechando la enorme presencia de *Pantoea spp.* encontrada en el presente trabajo, el propiciar su desarrollo en el hogar, con el fin de eliminar flora patógena. Ello se podría llevar a cabo mediante siembras de esta bacteria después de la limpieza y desinfección.

La producción de quitinasas por hongos como *Trichoderma* o bacterias (principalmente de la especie *Pantoea agglomerans*) ha demostrado ser un mecanismo importante de antagonismo contra los hongos con pared celular formada por quitina como *Rhizoctonia solana*, *Aspergillus* i *Penicillium* (Chet y cols., 1990)

Las especies que cabe destacar por frecuencia de aparición entre aquellos que habían crecido en medio de cultivo Baird-Parker reduciendo el telurito de potasio pertenecen la mayoría, como ya se ha dicho al género, *Staphylococcus* y son:

- *Staphylococcus hominis*
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Staphylococcus warneri*
- *Staphylococcus saprophiticus*
- *Staphylococcus spp.*
- *Staphylococcus cohnii ssp. cohnii*
- *Staphylococcus haemolyticus*

No se conoce patogeneidad en ninguno de ellos para personas sanas. Sin embargo todos ellos han provocado casos de infecciones oportunistas en personas inmunodeprimidas. Muchos de ellos tienen relación directa con el hombre, ya que a pesar de que la superficie de la piel es hostil a la supervivencia y crecimiento de muchas bacterias debido a su sequedad, bajo pH (3-5) y sustancias inhibitorias (lisozima que destruye el peptidoglucano). A pesar de estos factores algunas bacterias pueden sobrevivir en la piel, crecer y formar la microbiota normal ya que las glándulas sudoríparas y sebáceas excretan agua, aminoácidos, urea, sales y ácidos grasos que sirven como nutrientes a estos microorganismos Mateos, 2003.

Cabría destacar la mayor presencia de *Staphylococcus aureus* en el suelo de la entrada del domicilio. Única superficie donde tiene cierta relevancia, en porcentaje, suponiendo prácticamente el 5% de los microorganismos de este grupo. Sin embargo esta frecuencia, en una superficie donde los recuentos medios para este grupo de bacterias rondan las 10 ufc/cm<sup>2</sup> y donde la contaminación cruzada con alimentos es prácticamente imposible, resta importancia a la presencia de la bacteria. Se podría indicar, por tanto, que *S. aureus* no supone un riesgo lo suficientemente importante como para considerar un cambio de pautas dirigidas a la consecución de un alto nivel de higiene en el domicilio. Incluso a pesar de que hemos encontrado la bacteria en el 25% de las 250 viviendas analizadas. Resultados comparables con el 31% de los 201 hogares examinados encontrados por Scott y cols. (1982) pero discrepantes, a la vez, con el mismo autor, quien afirma que *S. aureus* tiende a predominar en lugares de contacto con la piel humana como el retrete, grifos, toallas.

Aunque la mayoría de los microorganismos encontrados más frecuentemente en las 201 casas muestreadas pertenecían a especies no patógenas la mayoría de los hogares estaban contaminados con enterobacterias o pseudomonaceas y otras especies potencialmente patógenas como *S. aureus* (Scott y cols., 1982).

### 5.3. Estudio desinfectantes.

Como norma general de los cuatro productos probados, en las cuatro superficies diferentes, el producto limpiador en cuya formulación cuenta exclusivamente con tensioactivos, como agente funcional, es el que menos reducción en recuento provocaba en todos los grupos microbianos estudiados. En cambio, el limpiador que además contiene amonio cuaternario, conseguía mayores reducciones que el resto sobre todo en unidades formadoras de colonias libres y adheridas. Sin embargo, la máxima efectividad frente a los biofilms era conseguida por el producto que combina de lejía y detergente. Lo cual nos indica la manera de proceder en diferentes superficies, una vez conocida la forma en que se presenta el tipo de contaminación que sustenta, ya que como indica Bloomfield (2003), la reevaluación de las prácticas habituales y la promoción de la mejora de la higiene en el entorno doméstico pueden tener un impacto significativo en reducir las enfermedades infecciosas. Las superficies del hogar desempeñan un papel importante a la hora de la transmisión de infecciones, especialmente infecciones alimentarias. Si bien hay autores que proponen que la desinfección de otras partes de los pisos incluido lavabos son innecesarias (exceptuando graves enfermedades infecciosas) (Borneff, 1989). Afirmación que, después de realizar el presente trabajo, no podemos compartir ya que queda demostrado que la utilización regular de productos de limpieza efectivos disminuye considerablemente los recuentos de las superficies en las que se aplican.

El sumidero del fregadero de la cocina y la zona de preparación de alimentos de la misma son dos zonas donde la contaminación por enterobacterias es elevada y por ello interesante de cara a contrastar la diferente actividad bactericida de los desinfectantes. Los resultados muestran que, excepto para los biofilms formados por enterobacterias, los diferentes productos estudiados presentan efectividades similares a la hora de disminuir los recuentos de este grupo de microorganismos. Esto podría ser debido a que son zonas donde conviven agua, materia orgánica y temperatura adecuada para el desarrollo de

microorganismos, durante muchas horas al día, lo que unido al alto número de biofilms que se forman en ese entorno lo convierte en un buen reservorio. Esto provoca que, incluso después de una desinfección diferencial entre los diversos productos estudiados, se recontaminase rápidamente, alcanzando valores de microorganismos similares a los que había antes de la desinfección en pocas horas. De este modo, no se podría apreciar esa actividad germicida diferencial al no tomarse la muestra justo después de la aplicación.

En la misma línea apunta la investigación llevada a cabo por Scott y cols. (1982) en la que indica que el fregadero, los sifones de desagüe y alrededores actúan como reservorios donde las bacterias se pueden multiplicar. En el mismo sentido las pruebas con detergente y agua caliente no muestran una reducción significativa de la flora doméstica. En cambio el hipoclorito y los desinfectantes fenólicos producen una desinfección que dura al menos 3 horas. Así estos dos últimos alcanzan altos niveles de desinfección pero a las 3 horas se reestablecen los niveles de contaminación previos en la mayoría de los puntos (Scott y cols., 1984). Si bien según Tierney y cols. (2003), quienes comprobaron que cuando se utilizaba un limpiador al menos una vez al día el recuento de aerobios mesófilos nunca superaba  $10^4$  CFU/cm<sup>2</sup>. En cambio, en cocinas donde el agente limpiador se utilizaba menos de una vez a la semana los niveles microbianos superaban  $10^6$  CFU/cm<sup>2</sup> en el caso del grifo y  $10^7$  CFU/cm<sup>2</sup> en el caso del fregadero. Por tanto la recontaminación aún produciéndose necesita más de las tres horas indicadas por Scott y cols. (1984). Nuestros resultados avalan el fenómeno de la recontaminación pero en ningún caso hasta los valores encontrados Tierney y cols. (2003). Los valores máximos de nuestros recuentos no superan en ningún caso los dos logaritmos.

Cuando bacterias como *S. aureus* u otras bacterias oportunistas tienen que ser eliminadas, se recomienda el uso de trapos y bayetas impregnadas con desinfectante y desechables, ya que según Kusumaningrum (2003) durante la limpieza, los microorganismos se transfirieron desde las superficies hasta las telas de limpieza y la eliminación de las bacterias en las telas de limpieza requiere mayores cantidades de hipoclorito que en las pruebas en suspensión.

Este aspecto debe tenerse en cuenta de cara a la utilización de los utensilios de limpieza, sobre todo trapos y bayetas, los cuales en ocasiones pueden facilitar el tránsito de los microorganismos que se encuentran en estas zonas contaminadas a otras donde se manipulan alimentos y que en circunstancias normales serían seguras. Scott y Bloomfield (1993) encontraron evidencias de transferencia de contaminación hacia y desde la bayeta a la superficie.

La evidencia del laboratorio y de los estudios en el hogar muestra que el uso de desinfectantes, de la manera indicada, puede producir una mayor reducción en la frecuencia de aparición de superficies contaminadas que las conseguidas por las limpiezas exclusivamente a base de detergente (Anónimo, 2002 a). Si bien, en algunas de ellas, como la del fregadero de la cocina, el uso de desinfectante tiene un efecto muy efímero, ya que, la relativa susceptibilidad de un microorganismo a cada desinfectante varía en función de la fase de crecimiento en el que este se halle, incluso para desinfectantes con mecanismos de acción similares (Luppens y cols., 2002).

Según estos mismos autores, un factor que tiene una gran importancia en la efectividad de los desinfectantes usados en este estudio fue la gran proporción de células muertas en la fase de muerte de la cinética de crecimiento bacteriano. Estas células muertas pueden, sin embargo, seguir reaccionando con los desinfectantes, por ejemplo con secuestro del principio activo del desinfectante a la membrana, como pasa con el cloruro de benzalconio, o bien mediante la liberación de enzimas todavía activos que reaccionen con el desinfectante, como puede ser la catalasa frente al peróxido de hidrógeno. De esta manera, las células muertas protegen a las vivas en suspensión. Estos fenómenos se producen, sobre todo, cuando el porcentaje de muertas supera el 90%. Es en la fase de crecimiento estacionario es donde las bacterias son más susceptibles a la acción desinfectante.

Frente a la formación de biofilms de enterobacterias sí se aprecia una mayor eficacia preventiva del limpiador que combina lejía y detergente frente al resto. Esta eficacia es fruto de la combinación de ambos productos. De este modo, una explicación para esta mayor eficacia sería que el detergente facilitaría la

penetración de la lejía en la matriz de microorganismos, mediante la disminución de la tensión superficial del biofilm y una vez dentro, la lejía exhibiría allí su actividad letal frente a las bacterias que lo forman. Otra posible explicación sería que el detergente actuaría eliminando la suciedad y materia orgánica, lo que permitiría la acción desinfectante de la lejía, ya que no se vería inactivada por la presencia de materia orgánica interferente.

Respecto a las bacterias del otro grupo de interés en este trabajo los diferentes productos probados muestran efectividades desinfectantes desiguales, siendo el limpiador que contiene amonio cuaternario el que obtiene recuentos significativamente menores que el resto y por tanto se puede considerar más eficaz en la finalidad que persigue. Todo ello sería un indicativo de que este producto es el que mejor se comporta frente a todas las bacterias presentes en una superficie determinada. Sin embargo, esta mayor eficacia desinfectante sólo se puede apreciar aquí dada la menor capacidad de este grupo microbiano para recontaminar la zona entre dos procesos consecutivos de desinfección.

Los recuentos de biofilms muestran, de igual modo que ocurría con los formados por enterobacterias, que es la combinación de lejía y detergente la más eficaz para su minimización. Al igual que para las enterobacterias las explicaciones podrían ser que, o bien, el detergente facilitaría la penetración de la lejía en la matriz de microorganismos, mediante la disminución de la tensión superficial del biofilm y una vez dentro, la lejía podría actuar frente a las bacterias que lo forman, o bien, que el detergente actuaría eliminando la suciedad y materia orgánica, lo que permitiría la acción desinfectante de la lejía, ya que no se vería inactivada por la presencia de materia orgánica interferente.

En el caso del grupo de bacterias, que se hallaban en el sumidero del lavabo, capaz de crecer en medio de cultivo Baird-Parker y reducir el telurito de potasio se aprecia que todos los productos desinfectantes utilizados tienen una eficacia similar en cuanto a reducción del recuento de células viables y en cuanto a reducción del número de células con capacidad de adhesión. La inhibición de formación de biofilms se muestra, sin embargo, más fuerte con la utilización de

unos productos respecto a otros. Así, el desinfectante que más reducción consigue es el desinfectante control. Los recuentos de biofilms obtenidos después de su utilización son significativamente menores que los alcanzados con el resto de productos estudiados, seguido del producto que conjuga la eficacia del detergente y la lejía. Lo mismo ocurre para los recuentos de biofilms de enterobacterias hallados en la zona del jabón de manos del lavabo. El análisis de estos datos indicaría que muy probablemente el desinfectante control utilizado en los lavabos de la mayoría de las viviendas es la lejía. Recordemos que la elección del desinfectante control se dejaba al libre albedrío de las personas encargadas de la limpieza de la vivienda y que estos domicilios habían sido seleccionados por ser representativos del comportamiento medio español. En España la lejía es el producto desinfectante más utilizado (Oset, 2001).

Viendo los resultados obtenidos, se podría calificar dicha decisión como correcta, cuanto menos en eficacia desinfectante. El hipoclorito sódico (lejía doméstica) se recomienda, especialmente en Estados Unidos, para la desinfección de la cocina por su acción biocida a baja concentración y por su disponibilidad (Kusumaningrum y cols., 2003). En la misma línea Borneff y cols. (1988 b), comentan que cuando el limpiador tradicional se sustituye por uno que contiene hipoclorito, las cadenas de transmisión de la infección se ven interrumpidas. Por ello se recomienda a los fabricantes de limpiadores que suplementen estos con desinfectantes. Además las personas encargadas de la higienización del hogar deberían estar adecuadamente aleccionadas sobre la manipulación correcta y eficiente de esos productos.

En ambos casos el limpiador convencional, que no tiene ni amonio cuaternario ni hipoclorito, es el más facilita la formación de biofilms.

Sin embargo, para el grupo de bacterias capaces de multiplicarse en medio de cultivo Baird-Parker y reducir el telurito, en la zona donde se sitúa el jabón de manos del lavabo, no se aprecian diferencias estadísticamente significativas de recuentos de biofilms para los diversos productos utilizados. Esto sería más atribuible a los bajos recuentos que presenta la zona, lo que impediría que

hubiesen diferencias, entre productos, reseñables estadísticamente, que a una efectividad similar.

Ayliffe y cols. (1966) quien demostró que cerca del 90% de la contaminación del suelo podía ser eliminada con una limpieza a base de agua y jabón exclusivamente, pero que cuando quedaban así, la contaminación volvía a niveles de antes de la limpieza en unas pocas horas. También demostraron que aunque la contaminación podía ser reducida en mayor grado por la acción de los desinfectantes la recontaminación a niveles de prelimpieza/desinfección sucede en un corto periodo de tiempo. Llegaron a la conclusión de que la práctica diaria o semanal de desinfectantes como parte de una rutina de limpieza consigue poco y no debe, por tanto, ser promovida. A su vez en el estudio de Scott y cols., (1984) sobre los efectos de la aplicación diaria de desinfectante durante un periodo de 3 días, no se encontró evidencia de ningún efecto sustancial o acumulativo en términos de frecuencia sobre la cantidad de superficies catalogados como higiénicos. Ambos estudios muestran resultados discordantes con los obtenidos en el presente trabajo, puesto que se han encontrado efectividades diferenciales según el principio activo de los productos de limpieza utilizados, lo que demuestra una persistencia en el tiempo de la efectividad del producto.

Los consumidores deben estar informados de los riesgos que existen y las medidas preventivas frente a esos riesgos (Tierney y cols., 2003), ya que los principios holísticos para la higiene y la salud pública han contribuido substancialmente al incremento en la expectativa de vida en más de 30 años y en la calidad de vida desde el principio del siglo XX (Anónimo, 1998 b).

Un nivel adecuado de higienización se puede alcanzar económicamente y con la debida consideración a la contaminación al medio ambiente (Holah, 1995).

## 6. CONCLUSIONES.

1. Los sensores de superficie pueden utilizarse para discriminar los niveles de contaminación microbiana en las diferentes áreas domésticas.
2. La utilización de sensores de superficie es el sistema más sencillo y económico para la determinación de la contaminación microbiana de las diferentes superficies domésticas. Permitiendo determinar la contaminación real de la superficie.
3. Las superficies donde coinciden agua, materia orgánica, temperaturas altas y facilidad de acceso a los microorganismos, son las más contaminadas de la vivienda. Algunas de estas superficies se encuentran en la cocina y ello implica un riesgo potencial de contaminación cruzada con alimentos.
4. El uso frecuente de desinfectantes es recomendable, sobre todo, en aquellas superficies que vayan a entrar en contacto de manera directa o indirecta con los alimentos, para evitar contaminaciones cruzadas. De todos modos hay que tener presente que hay superficies dentro y fuera de la cocina que, a pesar de desinfectarse de manera correcta, tienen

recuentos elevados; por lo que habrá que tomar medidas que impidan el flujo de microorganismos de la superficie en cuestión a los alimentos.

5. La limpieza y desinfección con la finalidad de conseguir la esterilidad es una entelequia. Las superficies donde las condiciones son favorables para la multiplicación de los microorganismos, que nunca se eliminan completamente en la higienización, van a alcanzar recuentos similares a los que tenían previamente, en pocas horas.
  
6. Evitar la formación de biofilms en el hogar requiere un régimen de higienización más estricto que el que se lleva a cabo en la actualidad. Por ello, se recomiendan prácticas higiénicas que impidan la llegada de los microorganismos a los alimentos. Estas prácticas pasarían por evitar el contacto directo o indirecto de los alimentos, sobre todo aquellos listos para comer, con las superficies que más riesgo de albergar biofilms presentan.
  
7. Para evitar la formación de biofilms, además de la utilización de productos de limpieza, requiere una mejora en las prácticas y usos higiénicos domésticos.

8. Las zonas con mayor contaminación en el hogar son, por este orden: el desagüe del fregadero de la cocina y el desagüe de la bañera, con gran diferencia del resto de superficies estudiadas.
  
9. Las condiciones ambientales determinan la biota presente en una superficie. Así, las enterobacterias colonizan casi exclusivamente las superficies húmedas, mientras que las secas, aún siendo el grupo principal, el protagonismo lo comparten con las bacterias capaces de crecer en medio de cultivo Baird-Parker con RPF reduciendo el telurito. Por lo que el control de humedad, en la superficie, será el mejor sistema para reducir o eliminar la presencia de enterobacterias.
  
10. Se propone la sustitución de *Pseudomonas aeruginosa* por *Pseudomonas fluorescens* como microorganismo de referencia en las normas que regulan los estudios de actividad desinfectante, de aquellos productos destinados al uso doméstico, dada su mayor presencia en este ámbito.
  
11. *Staphylococcus aureus*, a pesar de haberse encontrado en bajo porcentaje, puede suponer un riesgo para la seguridad alimentaria, en los hogares, si no se siguen las medidas higiénicas apropiadas.

12. En el grupo de las enterobacterias no se ha encontrado *Salmonella*, si bien, sí aparecen, en proporciones importantes, *Enterobacter cloacae* y *Escherichia coli*.

13. Las identificaciones obtenidas indican que muchas de las colonias que presentaban reducción del telurito de potasio y formación de halo opaco, característico de las bacterias coagulasa positivas, no son *Staphylococcus aureus*.

## **7. PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS.**

Debido al proceso de elaboración, redacción y aceptación de patentes, no se ha podido publicar ningún artículo hasta obtener la publicación que se incluye a continuación.

## 8. BIBLIOGRAFÍA.

1. Acuff, G.R., Vanderzanr, C., Hanna, M.O., Ehlers, J.G. y Gardner, F.A. **Effects of handling and preparation of turkey products on the survival of *Campylobacter jejuni*.** *Journal of Food Protection* 49:627-31. 1986.
2. Ak, N.O. (a), Cliver, D.O., y Kaspar, C.W. **Decontamination of plastic and wooden cutting boards for kitchen use.** *Journal of Food Protection* 57, 23-30. 1994.
3. Ak, N.O. (b), Cliver, D.O., y Kaspar, C.W. **Cutting boards of plastic and wood contaminated experimentally with bacteria.** *Journal of Food Protection* 57, 16-22. 1994.
4. Albrecht, J.A. **Food safety knowledge and practices of consumers in the USA.** *J Consumer Stud Home Econ.* 19:119-34. 1995.
5. Altekruise, S.E., Street, D.A., Fein, S.B., y Levy, A.S. **Consumer knowledge of foodborne microbial hazards and food-handling practices.** *Journal of Food Protection* 59, 287-294. 1996.

6. Anderson, J.B., Shuster, T.A., Gee, E., Hansen, K. y Mendenhall, V.T. **A camera's view of consumer food safety practices.** *Comunicación Persona*, 2000.
  
7. Anónimo. **Test methods for the antimicrobial activity of disinfectants in food hygiene.** *Strasbourg: Council of Europe*, 1987.
  
8. Anónimo. **Method of test for the antimicrobial activity of disinfectants in food hygiene.** *British Standards Institution*, 1988.
  
9. Anónimo. **Microbiología de los alimentos. Características de los patógenos microbianos.** *ICMSF*, 1996.
  
10. Anónimo. **Regulatory impact statement "Food safety standards - costs and benefits".** *Australia New Zeland Food Authority*. 25-5-1999.
  
11. Anónimo. **EHEDG Glossary.** *EHEDG*, 2004.

12. Anónimo (a). **Food safety from farm to table. A national food safety initiative. A report to the president.** *U.S. Environmental Protection Agency*, 1997.
  
13. Anónimo (a). **Guidelines for prevention of infection and cross infection in the domestic environment.** *IFH*, 1998.
  
14. Anónimo (a). **Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illnesses - selected sites.** *FoodNet* 2000; 49(10):201-5. 1999.
  
15. Anónimo (a). **Keep your food safe.** *Department of Health and Human Services. U.S. Department of Agriculture Food and Drug Administration*, 2001.
  
16. Anónimo (a). **Hygiene procedures in the home and their effectiveness: a review of the scientific evidence base.** *IFH*, 2002.

17. Anónimo (b). **PHLS evidence to the house of commons agriculture select commitee enquiry into food safety.** 1997.
  
18. Anónimo (b). **The World Health report 1998-Life in the 21st century: a vision for all.** *World Health Organization*, 1998.
  
19. Anónimo (b). **Food safety standards, costs and benefits.** *Australia New Zealand Food Authority*, 1999.
  
20. Anónimo (b). **The impact of food and nutrition on public health - the case for a food and nutrition policy and action plan for the european region of WHO 2000-2005.** *Poster presentado en el "XIIIth International Congress of Dietetics". Edinburgh, UK, 23-27 de Julio de 2000.*
  
21. Anónimo (b). **WHO Surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications in europe, 7th report.1993-1998.** *World Health Organization*, 2001.

22. Anónimo (b). **Partnership for food safety education.**  
*http://www.fightbac.org, 2002.*
23. Anónimo (c). **NORMA ESPAÑOLA-Antisépticos y desinfectantes químicos. Actividad bactericida básica. Método de ensayo y requisitos (fase 1).** Norma Española (UNE-EN 1040), 1997.
24. Anónimo (c). **NORMA ESPAÑOLA- Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad bactericida de los antisépticos y desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios, en la industria, en el hogar y en colectividad.** Norma Española (UNE-EN 1276), 1998.
25. Anónimo (c). **AOAC official method 960.09.** Cunniff P, Ed. *Official methods of analysis of AOAC International.* Gaithersburg, Md.: AOAC International, 2000:10.
26. Anónimo (c). **Food safety materials.** Foodlink, 2002.

- 
27. Anwar, H., Strap, J.L. y Costerton, J.W. **Susceptibility of biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa* to bactericidal actions of whole blood and serum.** *FEMS Microbiology Letters* 92:235-42. 1992.
28. Austin, J.W. y Bergeron, G. **Development of bacterial biofilms in dairy processing lines.** *Journal of Dairy Research* 62(3):509-19. 1995.
29. Austin, J.W., Sanders, G., Kay, W.W. y Collinson, S.K. **Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation.** *FEMS Microbiology Letters* 162:295-301. 1998.
30. Ayliffe, G.A.J., Collins, B.J. y Lowbury, E.J.L. **Cleaning and disinfection of hospital floors.** *British Medical Journal* 2:442-5. 1966.
31. Bagge, D., Hjelm, M., Johansen, C., Huber, I. y Gram, L. ***Shewanella putrefaciens* adhesion and biofilm formation on food processing surfaces.** *Applied and Environmental Microbiology* 67(5):2319-25. 2001.

32. Barnes, L.M., Lo, M.F., Adams, M.R. y Chamberlain, A.H.L. **Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces.** *Applied and Environmental Microbiology* 65(10):4543-8. 1999.
33. Beckers, H.J., van Leusden, F.M., Bindschedler, O. y Guerraz, D. **Evaluation of a pour-plate system with a rabbit plasma-bovine fibrinogen agar for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in food.** *Can J Microbiol.* 30:470-4. 1984.
34. Bergdoll, M.S. ***Staphylococcus aureus*.** Doyle MP, Ed. *Foodborne Bacterial Pathogens.* 463-523. 1989.
35. Bessems, E. **The effect of practical conditions on the efficacy of disinfectants.** *International Biodeterioration & Biodegradation* 48:177-83. 1998.
36. Bishop, P.L. **Biofilm structure and kinetics.** *Wat Sci Tech* 36(1):287-94. 1997.

37. Blackman, I. C. y Frank, J. F. **Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces.** *Journal of Food Protection* 59(8), 827-831. 1996.
38. Blackmore, M.A. **A comparison of hand drying methods.** *Catering Health* 1:189-98. 1989.
39. Bloomfield, S.F., Arthur, M., Looney, E., Begun, K., y Patel, H. **Comparative testing of disinfectant and antiseptic products using proposed European suspension testing methods.** *Letters in Applied Microbiology*, 233-237. 1991.
40. Bloomfield, S.F. y Looney, E. **Evaluation of the repeatability and reproducibility of European suspension test methods for antimicrobial activity of disinfectants and antiseptics.** *Journal Applied Bacteriology* 73, 87-93. 1992.
41. Bloomfield, S.F., Arthur, M., Begun, K., y Patel, H. **Comparative testing of disinfectants using proposed European surface test methods.** *Letters*

*in Applied Microbiology* 17, 119-125. 8-3-1993.

42. Bloomfield, S.F., Arthur, M., Van Klingeren, B., Holah, J.T., y Elton, R. **An evaluation of the repetability and reproducibility of a surface test for the activity of disinfectants.** *Journal Applied Bacteriology* 76[1], 86-94. 1994.
  
43. Bloomfield, S.F. **Reproducibility and predicivity of disinfection and biocide tests.** Brown MRW, Gilbert P, Eds. *Microbiological quality assurance screening and bioassay: a guide towards relevance and reproducibility of inocula.* Florida.: CRC Press Inc., 189-215. 1995.
  
44. Bloomfield, S.F. y Scott, E. **Cross-contamination and infection in the domestic environment and the role of chemical disinfectants.** *Journal Applied Microbiology* 83:1-9. 1997.
  
45. Bloomfield, S.F. **Preventing infectious disease in the domestic setting: A risk-based approach.** *American Journal of Infection Control* 29:207-12. 2001.

- 
46. Bloomfield, S.F. **Home hygiene: a risk approach.** *International Journal of Hygiene Environmental Health* 206[1], 1-8. 2003.
47. Booth, I.R. **Stress and the single cell: Intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress.** *International Journal of Food Microbiology* 78:19-30. 2002.
48. Borneff, J. **Effective hygienic measurements in households today.** *International Journal of Microbiology and Hygiene* 187, 404-413. 1989.
49. Borneff, J. (a), Hassinger, R., Wittig, J. y Edenharder, R. **Distribution of microorganisms in household kitchens I. Problems, experiments, results.** *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [B]*. 1988.
50. Borneff, J. (b), Hassinger, R., Wittig, J., y Edenharder, R. **Distribution of microorganisms in household kitchens II. Evaluation of results and hygienic inferences.** *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [B]*. 1988.

- 
51. Boulangé-peterman, L., Barroux, B. y Bellon-Fontaine, M.N. **The influence of metallic wettability on bacterial adhesion.** *J Adhesion Sci Technol* 7(3):221-30. 1993.
52. Boulangé-peterman, L. **Processes of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability: a review with special reference to the food industry.** *Biofouling* 10(4):275-300. 1996.
53. Boulangé-peterman, L., Rault, J. y Bellon-Fontaine, M.N. **Adhesion of *Streptococcus thermophilus* to stainless steel with different surface topography and roughness.** *Biofouling* 11(3):201-16. 1997.
54. Bower, C.K., McGuire, J. y Daeschel, M.A. **The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces.** *Trends in Foods Science & Technology* 7, 152-157. 1996.
55. Boyd, R.D., Cole, D., Rowe, D., Verran, J., Paul, A.J. y West, R.H. **Cleanability of soiled stainless steel as studied by atomic force microscopy and time of flight secondary ion mass spectrometry.**

*Journal of Food Protection* 64(1):87-93. 2001.

56. Bradford, M.A., Humphrey, T.J. y Lappin-Scott, H.M. **The cross-contamination and survival of *Salmonella enteritidis* PT4 on sterile and non-sterile foodstuffs.** *Letters in Applied Microbiology* 24:261-4. 1997.
57. Brocklehurst, T.F., Zaman-Wong, C.M., y Lund, B.M. **A note on the microbiology of retail packs of prepared salad vegetables.** *Journal Applied Bacteriology* 63, 409-415. 1987.
58. Brown, M.R.W. y Gilbert, P. **Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents.** *Journal Applied Bacteriology* 74:87S-97S. 1993.
59. Bryers, J.D. **Biologically active surfaces: processes governing the formation and persistence of biofilms.** *Biotechnol Prog* 3(2):57-68. 1987.
60. Carpentier, B. y Cerf, O. **Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry.** *Journal Applied*

*Bacteriology* 75:499-511. 1993.

61. Carsberg, H. **Selecting your sanitizers.** *Food Quality* 2(3):35-6. 1996.
62. Cason, J.A., Bailey, J.S., Stern, N.J., Whittemore, A.D. y Cox, N.A.  
**Relationship between aerobic bacteria, *Salmonellae*, and  
*Campylobacter* on broiler carcasses.** *Poultry Science* 76:1037-41. 1997.
63. Cheesbrough, J.S., Barkess-Jones, L. y Brown, D.W. **Possible prolonged  
environmental survival of small round structured viruses.** *Journal of  
Hospital Infection* 35(4):325-6. 1997.
64. Chet, I., Ordentlich, A., Aspira, R. y Oppenheim, A. **Mechanisms of  
biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria.** *Plant Soil*  
129:85-92. 1990.
65. Chmielewski, R.A.N. y Frank, J.F. **Biofilm formation and control in food  
processing facilities.** *Comprehensive Reviews in Food Science and Food*

*Safety*. 2, 22-32. 2003.

66. Cogan, T.A., Bloomfield, S.F., y Humphrey, T.J. **The effectiveness of hygiene procedures for prevention of cross-contamination from chicken carcasses in the domestic kitchen.** *Letters in Applied Microbiology* 29, 354-358. 1999.
67. Cogan, T.A., Slader, J., Bloomfield, S.F. y Humphrey, T.J. **Achieving hygiene in the domestic kitchen: the effectiveness of commonly used cleaning procedures.** *Journal of Applied Microbiology* 92, 885-892. 2002.
68. Costerton, J.W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., y James, G. **Biofilms, the customized microniche.** *Journal of Bacteriology* 176(8), 2137-2142. 1994.
69. Criado, M.T., Suárez, B., y Ferreirós, C.M. **The importance of bacterial adhesion in the dairy industry.** *Food Technology* 48, 123-126. 1994.

70. Davey, M.E. y O'toole, G.A. **Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics.** *Microbiology and molecular biology reviews* 847-67. 2000.
71. De Boer, E. y Hahne, M. **Cross-contamination with *Campylobacter jejuni* and *Salmonella spp.* from raw chicken products.** *Journal of Food Protection* 53:1067-8. 1990.
72. DeBeer, D., Srinivasan, R. y Stewart, P.S. **Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection.** *Applied and Environmental Microbiology* 60(12), 4339-4344. 1994.
73. Dunsmore, D.G. y Thomson, M.A. **Bacteriological control of food equipment surface by cleaning systems II. Sanitizer effects.** *Journal of Food Protection* 44(1):21-7. 1981.
74. Emery, H.C. **Changing poor hand-washing habits - a continuing challenge for sanitarians.** *Dairy Food Environ Sanit* 1990; 10:8-9.

75. Exner, M., Hartemann, P. y Kistemann, T. **Hygiene and health - the need for a holistic approach.** *Journal Infect. Control* 29[4], 228-231. 2001.
76. Fatemi, P. y Frank, J.F. **Inactivation of *Listeria monocytogenes* / *Pseudomonas* biofilms by peracid sanitizers.** *Journal of Food Protection* 62(7):761-5. 1999.
77. Fein, S.B., Jordan Lin, C.T. y Levy, A.S. **Foodborne illness: perceptions, experience, and preventive behaviors in the United States.** *Journal of Food Protection* 58, 1405-1411. 9-6-1995.
78. Frank, J.F. y Koffi, R.A. **Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat.** *Journal of Food Protection* 53:550-4. 1990.
79. Frank, J.F. y Chmielewski, R.A.N. **Effectiveness of sanitation with quaternary ammonium compound or chlorine on stainless steel and other domestic food-preparation surfaces.** *Journal of Food Protection* 60:43-7. 1997.

80. Frank, J.F. **Control of biofilm in the food and beverage industry.** Walker J, Surman S, Jass J, Eds. *Industrial Biofouling*. Chicester, New York. 205-24. 2000.
81. Frank, J.F. y Chmielewski, R.A.N. **Influence of surface finish on the cleanability of stainless steel.** *Journal of Food Protection* 64:1178-82. 2001.
82. Gibson, H., Taylor, J.H., may, K.E. y Holah, J.T. **Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms.** *Journal of Applied Microbiology* 87:41-8. 1999.
83. Giese, J. H. **Sanitation: the key to food safety and public health.** *Food Technology*, 74-80. 1991.
84. Gilbert, P., Evans, D.J., Evans, E., Duguid, I.G. y Brown, M.R.W. **Surface characteristics and adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*.** *Journal Applied Bacteriology* 71:72-7. 1991.

85. Gilbert, R.J. y Watson, H.M. **Some laboratory experiments on various meat preparation surfaces with regard to surface contamination and cleaning.** *Journal of Food Technology* 6:163-70. 1971.
86. Gilbert, R.J. **Foodborne infections and intoxications - recent trends and prospects for the future.** *Food Microbiology advances and prospects for the future.* London.: Academic Press., 47-66. 1983.
87. Greenwood, M.H. y Hooper, W.L. **Chocolate bars contaminated with *Salmonella napolí*: an infectivity study.** *British Medical Journal* 286:1394. 1983.
88. Griffith, C.J. y Worsfold, D. **Application of HACCP to food preparation practices in domestic kitchens.** *Food Control* 5(3):200-4. 1994.
89. Griffith, C.J., Peters, A.C., Redmond, E.C. y Price, P. **Food safety risk scores applied to consumer food preparation and the evaluation of hygiene interventions.** *Department of Health London* 1999.

90. Griffith, C.J. **Food safety in catering establishments.** Farber JM, Tood EC, Eds. *Safe handling of foods.* New York. 235-56. 2001.
91. Griffith, C.J., Price, P., Peters, A.C. y Clayton, D.A. **An evaluation of food handlers knowledge, belief and attitudes about food safety and its interpretation using social cognition models.** *Food Standards Agency,* 2001.
92. Guzewich, J. y Ross, M.P. **Evaluation of risks related to microbiological contamination of ready-to-eat food by food preparation workers and the effectiveness of interventions to minimize those risks.** *Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition,* 1999.
93. Hayes, S., Nylen, G., Smith, R., Salmon, R.L. y Palmer, S.R. **Undercooked hens eggs remain a risk factor for sporadic *Salmonella enteritidis* infection.** *Commun Dis Public Health* 2(1):66-7. 1999.
94. Hedberg, C.W., Korlath, J.A., D'Aoust, J.Y., White, K.E., Schell, W.L., Miller, M.R., Cameron, D.N., MacDonald, K.L. y Osterholm, M.T. **A multistate outbreak of *Salmonella javiana* and *Salmonella oranienbrug* infections**

**due to consumption of contaminated cheese.** *JAMA* 268(22):3203-7.  
1992.

95. Heilmann, C., Schewitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D. y  
Götz, F. **Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming  
*Staphylococcus epidermidis*.** *Molecular Microbiology* 20(5), 1083-  
1091.1996.

96. Heinzl, M. **Phenomena of biocide resistance in microorganisms.**  
*International Biodeterioration & Biodegradation* 41:225-34. 1998.

97. Helke, D.M. y Wong, A.C.L. **Survival and growth characteristics of  
*Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless  
steel and buna-N rubber.** *Journal of Food Protection* 57(11):963-8. 1994.

98. Herald, P.J., Zottola, E.A. **Scanning electron microscopic examination of  
*Yersinia enterocolitica* attached to stainless steel at selected  
temperatures and pH values.** *Journal of Food Protection* 51(6):445-8.  
1988.

99. Hernandez, J. y Dubón, F. **Bacilos Gram negativos anaerobios facultativos.** *Sistemática bacteriana* 5.11-5.18. 1992.
100. Hilton, A.C. y Austin, E. **The kitchen dishcloth as a source of and vehicle for foodborne pathogens in a domestic setting.** *International Journal of Environmental Health Research* 10(3):257-61. 2000.
101. Hirai, Y. **Survival of bacteria under dry conditions; from a viewpoint of nosocomial infection.** *Journal of Hospital Infection* 19:191-200. 1991.
102. Holah, J.T. **Disinfection of food production areas.** *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz.* 14, 343-363. 1995.
103. Hood, S.K. y Zottola, E.A. **Isolation and identification of adherent Gram-Negative microorganisms from four meat-processing facilities.** *Journal of Food Protection* 60, 1135-1138. 1997.
104. Hood, S.K. y Zottola, E.A. **Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems.** *International*

*Journal of Food Microbiology* 37(2-3):145-53. 1997.

105. Hoogenboom-Verdegaal, A.M.M. y Postema, C.A. **Voedsel-infecties.**  
*Practitioner* 5:549-54. 1990.
106. Humphrey, T.J., Martin, K.W. y Whitehead, A. **Contamination of hands and worksurfaces with *Salmonella enteritidis* PT4 during the preparation of egg dishes.** *Epidemiol. Infect.* 1994.
107. Jablonsky, L.M., Bohach, G.A. ***Staphylococcus aureus*.** Beuchat LR, Montville TJ, Eds. *Food microbiology: fundamentals and frontiers.* Washington,D.C.: MP Doyle., 353-75. 1997.
108. Jay, L.S., Comar, D. y Govenlock, L. D. **A video study of australian domestic food-handling practices.** *Journal of Food Protection* 62(11), 1285-1296. 1999.

109. Jeffrey, D.J. **Chemicals used as disinfectants: active ingredients and enhancing additives.** *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz.* 14, 57-74. 1995.
110. Jeong, D.K. y Frank, J.F. **Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments.** *Journal of Food Protection* 57(7):576-86. 1994.
111. Jermini, M. **HACCP: internal verses regulatory assessments.** *Seminar on Food Safety Assessment an Nutrition Research*, 1999.
112. Jones, K. y Bradshaw, S.B. **Synergism in biofilm formation between *Salmonella enteritidis* and a nitrogen-fixing strain of *Klebsiella pneumoniae*.** *Journal of Applied Microbiology* 82:663-8. 1997.
113. Jones, M.V. **Application of HACCP to identify hygiene risks in the home.** *International Journal of Biodeterioration and Biodegradation* 41:191-9. 1998.

114. Joseph, B., Otta, S.K. y Karunasagar, I. **Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers.** *International Journal of Food Microbiology* 64:367-72. 2001.
115. Josephson, K.L., Rubino, J.R. y Pepper, I.L. **Characterization and quantification of bacterial pathogens and indicator organisms in household kitchens with and without the use of a disinfectant cleaner.** *Journal of Applied Microbiology* 83, 737-750. 1997.
116. Kaferstein, F. y Abdussalam, M. **La inocuidad de los alimentos en el siglo XXI.** *Boletín de la Organización Mundial de la Salud* 1:1-5. 1999.
117. Kaferstein, F.K. **Food safety: a commonly underestimated public health issue.** *World Health Stat Q* 50:3-4. 1997.
118. Kampelmacher, E.H., Mossel, D.A.A., Van Schothorst, M. y Van Noorle-Jansen, L.M. **Quantitative investigations on the efficacy of methods for decontaminating wooden surfaces used in meat preparation.** *Alimenta* 1971:70-6. 1971.

119. Kassa, H., Harrington, B. y Bisesi, M. **Comparisons of microbiological evaluations of selected kitchen areas with visual inspections for preventing potential risk of foodborne outbreaks in food service operations.** *Journal of Food Protection* 64[4], 509-513. 2001.
120. Kerslake, V.B. **Community awareness of safe food handling practices and food poisoning: knowledge and experience.** *University of Wellington, New Zealand.* 1995.
121. Kim, K.Y. y Frank, J.F. **Effect of nutrients on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel.** *Journal of Food Protection* 58:24-8. 1995.
122. Klontz, K.C., Timbo, B., Fein, S. y Levy, A. **Prevalence of selected food consumption and preparation behaviors associated with increased risks of food-borne disease.** *Journal of Food Protection* 58 (8):927-30. 1995.

123. Knabel, S.J. **Foodborne illnesses: role of home food handling practices.** *Food Technology* 49(4), 119-131. 1995.
124. Kumar, C.G. y Anand, S.K. **Significance of microbial biofilms in food industry: a review.** *International Journal of Food Microbiology* 42:9-27. 1998.
125. Kusumaningrum, H.D., Paltinaite, R., Koomen, A.J., Hazeleger, W.C., Rombouts, F.M. y Beumer, R.R. **Tolerance of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* to surface cleaning and household bleach.** *Journal of Food Protection* 66(12):2289-95. 2003.
126. Kusumaningrum, H.D., Riboldi, G., Hazeleger, W.C. y Beumer, R.R. **Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods.** *International Journal of Food Microbiology* 85:227-36. 2003.
127. Lawrence, J.R., Korber, D.R., Hoyle, B.D., Costerton, J.W. y Caldwell, D.E. **Optical sectioning of microbial biofilms.** *Journal of Bacteriology* 173,

6558-6567. 1991.

128. Lee, S.H. y Frank, J.F. **Inactivation of surface-adherent *Listeria monocytogenes* hypochlorite and heat.** *Journal of Food Protection* 54(1):4-6. 1991.
129. Lerebour, G., Cupferman, S. y Bellon-Fontaine, M.N. **Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to the Episkin reconstructed epidermis model and to an inert 304 stainless steel substrate.** *Journal of Applied Microbiology* 97:7-16. 2004.
130. Lindberg, L.E., Holmbom, B.R., Väisänen, O.M., Weber, L. y Salkinoja-Salonen, M.S. **Sugar composition of biofilms produced by paper mill bacteria.** *Appl Microbiol Biotechnol* 55:638-43. 2001.
131. Lipson, A. **Infecting dose of *Salmonella*.** *British Medical Journal* 969.1976.

132. Lowbury, E.J.L. y Fox, J. **The influence of atmospheric drying on the survival of wound flora.** *Journal of Hygiene* 51:203-14. 1953;
133. Lunden, J., Autio, T., Markkula, A., Hellstrom, S. y Korkeala, H. **Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants.** *International Journal of Food Microbiology* 82(3):265-72. 2003.
134. Lundén, J.M., Miettinen, M.K., Autio, T.J. y Korkeala, H.J. **Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times.** *Journal of Food Protection* 63(9):1204-7. 2000.
135. Luppens, S.B.I., Rombouts, F.M. y Abee, T. **The effect of the growth phase of *Staphylococcus aureus* on resistance to disinfectants in a suspension test.** *Journal of Food Protection* 65(1):124-9. 2002.
136. Mafu, A.A., Roy, D., Goulet, J., Savoie, L. y Roy, R. **Efficiency of sanitizing agents for destroying *Listeria monocytogenes* on**

- contaminated surfaces.** *J Dairy Sci* 73:3428-32. 1990.
137. Manafi, M. **How important is the home hygiene?** *FEMS Circular* 53, 3. 2003.
138. Marshall, K.C., Stout, R. y Mitchell, R. **Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces.** *Journal of General Microbiology* 68, 337-348. 1971.
139. Mateos, P.F. **Relación huesped - parásito. Factores de patogenicidad microbiana.** <http://edicion-micro.usal.es/web/educativo/micro2/tema17.html#anchor317673>. 2003.
140. McCarthy, S.A. **Attachment of *Listeria monocytogenes* to chitin and resistance to biocides.** *Food Technology*, 84-87. 1992.
141. McEldowney, S. y Fletcher, M. **Adhesion of bacteria from mixed cell suspension to solid surfaces.** *Arch Microbiol* 148(1):57-62. 1987.

142. McEldowney, S. y Fletcher, M. **The effect of temperature and relative humidity on the survival of bacteria attached to dry solid surfaces.** *Letters in Applied Microbiology* 7:83-6. 1988.
143. Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M. y Tauxe, R.V. **Food-related illness and death in the United States.** *Emerging Infectious Diseases* 5(5):607-25. 1999.
144. Meredith, L., Lewis, R. y Haslum, M. **Contributory factors to the spread of contamination in a model kitchen.** *British food journal* 103(1):23-35. 2001.
145. Mittelman, M.W. **Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations.** *Journal of Dairy Science* 81(10):2760-4. 1998.
146. Montville, R., Yuhuan, C. y Schaffner, D.W. **Risk assessment of hand washing efficacy using literature and experimental data.** *International Journal of Food Microbiology.* 305-313. 2002.

- 
147. Morse, E.V., Duncan, M.A., Estep, D.A., Riggs, W.A. y Blackburn, B.O.  
**Canine salmonellosis: a review and report of dog to child transmission of *Salmonella enteriditis*.** *Public Health Briefs* 66 (1). 1976.
148. Mossel, D.A.A. **Occurrence, prevention and monitoring of microbial quality loss of foods and dairy products.** *CRC Critical Reviews Environmental Control* 5:1-139. 1975.
149. Mossel, D.A.A. **Index and indicator organisms - a current assessment of their usefulness and significance.** *Food Technology Australia* 30:212-9. 1978.
150. Mossel, D.A.A., Eelderink, I., Koopmans, M.I. y Van Rossem, F. **Influence of carbon source, bile salts and incubation temperature on recovery of *Enterobacteriaceae* from foods using MacConkey-type agars.** *Journal of Food Protection* 42:470-5. 1979.
151. Mossel, D.A.A., Corry, C.B., Struijk, C.B. y Baird, R.M. **Major taxonomic characteristics.** John Wiley and Sons, Ed. *Essentials of the microbiology of*

- foods*. New York 26-9. 1995.
152. Motarjemi, Y. y Kaferstein, F.K. **Global estimation of foodborne diseases.** *World Health Stat Q* 50(1-2):5-11. 1997.
153. Nunes, C., Usall, J., Teixido, N. y Vinas, I. **Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2.** *International Journal of Food Microbiology* 70:53-61. 2001.
154. Olsen, S.J., Mackinon, L.C., Goulding, J.S., Bean, N.H. y Slutsker, L. **Surveillance for foodborne disease outbreaks -United States, 1993-1997.** *MMWR Surveillance summaries* 49(SS01). 2000.
155. Oset, M. **Comparativa de uso de desinfectantes en España.** *Comunicación Personal*. 2001.
156. Petit, F. y Lowbury, E.J.L. **Survival of wound pathogens under different environmental conditions.** *Journal of Hygiene* 66:393-406. 1968.

157. Piette, J.P.G. y Idziak, E.S. **Role of flagella in adhesion of *Pseudomonas fluorescens* to tendon slices.** *Applied and Environmental Microbiology* 57(6), 1635-1639. 1991.
158. Pratt, L.A. y Kolter, R. **Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili.** *Molecular Microbiology* 30(2):285-93. 1998.
159. Rathmachers, B. y Borneff, M. **Development of a new test method for surface disinfection procedures IV: Natural drying rates of microorganisms and their modification by environmental factors.** *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [B]* 165:43-59. 1977.
160. Redmond, E.C., Griffith, C.J. y Peters, A.C. **Use of social marketing in the prevention of specific cross contamination actions in the domestic environment.** 305-314. 2000. *NSF International, Ann Arbor, Mich.* 11-10-2000.
161. Redmond, E.C., Griffith, C.J., Slader, J. y Humphrey, T.J. **The evaluation and application of information on consumer hazard and risk to food**

**safety education.** *Food Standards Agency* 2001.

162. Redmond, E.C., Griffith, C.J., Slader, J. y Humphrey, T.J. **Assessment of risks associated with consumer food handling practices using real-time microbiological analysis.** *IAFP Conference, 89th annual meeting, San Diego, California.* 30-7-2002.
163. Redmond, E.C. y Griffith, C.J. **Consumer food handling in the home: A review of food safety studies.** *Journal of Food Protection* 66, 130-161. 2003.
164. Roberts, D. **Sources infection: food.** *Lancet* 336(6):859-61. 1990.
165. Robinson, D.A. **Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk.** *British Medical Journal* 282:1584. 1981.
166. Rodrigues, L.C., Cowden, J.M., Wheeler, J.G., Sethi, D., Wall, P.G., Cumberland, P., Tompkins, D.S., Hudson, M.J., Roberts, J.A. y Roderick, P.J. **The study of infectious intestinal disease in England: risk factors**

- for cases of infectious intestinal disease with *Campylobacter jejuni* infection.** *Epidemiol Infect* 127(2):185-93. 2001.
167. Rodríguez, J.J. **Resistencia y adaptación de patógenos a desinfectantes.** <http://www.consumaseguridad.com>. 26-3-2003.
168. Roels, T.H., Frazak, P.A., Kazmierczak, J.J., Mackenzie, W.R., Proctor, M.E., Kurzynski, T.A. y Davis, J.P. **Incomplete sanitation of a meat grinder and ingestion of raw ground beef: contributing factors to a large outbreak of *Salmonella typhimurium* infection.** *Epidemiol Infect* 119:127-34. 1997.
169. Ronner, A.B. y Wong, A.C.L. **Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and Buna-n rubber.** *Journal of Food Protection* 56(9):750-8. 1993.
170. Rousch, W. **Quantitative germ count of wood or plastic surfaces.** *Schweiz Arch Tierheilk* 123:97-103. 1981.

- 
171. Rusin, P., Orosz-Coughlin, P. y Gerba, C. **Reduction of faecal coliform, coliform and heterotrophic plate count bacteria in the household kitchen and bathroom by disinfection with hypochlorite cleaners.** *Journal of Applied Microbiology* 85(5):819-28. 1998.
172. Sagripanti, J.L. y Bonifacio, A. **Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to liquid disinfectants on contaminated surfaces before formation of biofilms.** *Journal of AOAC International* 83(6), 1415-1422. 2000.
173. Scheil, W., Cameron, S., Dalotn, C., Murray, C. y Wilson, D. **A South Australian *Salmonella mbandaka* outbreak investigation using a database to select controls.** *Aust N Z J Public Health* 22(5):536-9. 1998.
174. Schutze, G.E., Sikes, J.D., Stefanova, R. y Cave, M.D. **The home environment and salmonellosis in children.** *Pediatrics* 103 (1). 1999.
175. Schwach, T.S. y Zottola, E. **Scanning electron microscopic study on some effects of sodium hypochlorite on attachment of bacteria to stainless steel.** *Journal of Food Protection* 47(10):756-9. 1984.

176. Scott, E., Bloomfield, S.F. y Barlow, C.G. **An investigation of microbial contamination in the home.** *J.Hyg., Camb* 89[89], 279-293. 1982.
177. Scott, E., Bloomfield, S.F. y Barlow, C.G. **Evaluation of disinfectants in the domestic environment under "in use" conditions.** *J.Hyg.,Camb* 92[92], 193-203. 1984.
178. Scott, E. y Bloomfield, S.F. **A bacteriological investigation of the effectiveness of cleaning and disinfection procedures for toilet hygiene.** *Journal Applied Bacteriology* 59[3], 291-297. 1985.
179. Scott, E. y Bloomfield, S.F. (a). **Investigation of the effectiveness of detergent washing, drying and chemical disinfection on contamination of cleaning cloths.** *Journal Applied Bacteriology* 68(3):279-83. 1990.
180. Scott, E. y Bloomfield, S.F. (b). **The survival and transfer of microbial contamination via cloths, hands and utensils.** *Journal Applied Bacteriology* 68:271-8. 1990.

181. Scott, E. y Bloomfield, S.F. **An in-use study of the relationship between bacterial contamination of food preparation surfaces and cleaning cloths.** *Letters in Applied Microbiology* 16, 173-177. 1993.
182. Scott, E. **Hygiene issues in the home.** *Journal Infect Control* 27[6], 522-525. 1999.
183. Scuderi, G., Fantasia, M., Filetici, E. y Anastasio, M.P. **Foodborne outbreaks caused by *Salmonella* in Italy, 1991-4.** *Epidemiol Infect* 1996; 116(3):257-65.
184. Sheard, J.B. **Food poisoning in England and Wales during 1983. A new title but still the same problems.** *Environmental Health* 94:57-61. 1986.
185. Shin-Ho-Lee y Frank, J.F. **Inactivation of surface-adherent *Listeria monocytogenes* hypochlorite and heat.** *Journal of Food Protection* 54, 4-6. 1991.

186. Silbernagel, K.M. y Lindberg, K.G. **Evaluation of the 3M petrifilm enterobacteriaceae count plate method for the enumeration of enterobacteriaceae in foods.** *Journal of Food Protection* 65[9], 1452-1456. 2003.
187. Sinde, E. y Carballo, J. **Attachment of *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluor-ethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers.** *Food Microbiology* 17:439-47. 2000.
188. Smoot, L.M. y Pierson, M.D. **Influence of environmental stress on the kinetics and strength of attachment of *Listeria monocytogenes* Scott A to buna-N rubber and stainless steel.** *Journal of Food Protection* 61(10):1286-92. 1998.
189. Smoot, L.M. y Pierson, M.D. **Effect of environmental stress on the ability of *Listeria monocytogenes* Scott A to attach to food contact surfaces.** *Journal of Food Protection* 61(10):1293-8. 1998.

- 
190. Stekelenburg, F.K. y Hartog, B.J. **Combined cleaning in restaurants' recipe for hygiene and health.** *Cleaning and Hygiene Today* 5:91-8. 1999.
191. Stevens, R.A. y Holah, J.T. **The effect of wiping and spray-wash temperature on bacterial retention on abraded domestic sink surfaces.** *Journal Applied Bacteriology* 75:91-4. 1993.
192. Stiles, M.E. **Less recognized and suspected foodborne bacterial pathogens.** Lund BM, Baird-Parker AC, Gould GW, Eds. *The microbiological safety and quality of food.* Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Md., 1394-9. 2000.
193. Stopforth, J.D., Samelis, J., Sofos, J.N., Dendall, P.A. y Smith, G.C. **Biofilm formation by acid-adapted and nonadapted *Listeria monocytogenes* in fresh beef decontamination washings and its subsequent inactivation with sanitizers.** *Journal of Food Protection* 65[11], 1717-1727. 2002.
194. Sutherland, I.W. **Microbial exopolysaccharides - Their role in microbial adhesion in aqueous systems.** *Critical Reviews in Microbiology* 10(2):173-

200. 1983.

195. Sykes, G. **Disinfection and sterilisation**. Spon Ltd., 1967.
196. Tamási, G. **Testing disinfectants for efficacy**. *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz.* 14, 75-79. 1995.
197. Tebbutt, G.M. y Southwell, J.M. **Comparative study of visual inspections and microbiological sampling in premises manufacturing and selling high-risk foods**. *Epidemiol Infect* 103:475-86. 1989.
198. Tebbutt, G.M. (a). **Development of standardized inspection in restaurants using assessments and microbiological sampling to quantify the risks**. *Epidemiol Infect* 107:393-4. 1991.
199. Tebbutt, G.M. (b). **An assessment of cleaning and sampling methods for food-contact surfaces in premises preparing and selling highrisk foods**. *Epidemiol Infect* 106:319-27. 1991.

- 
200. Tierney, J., Moriarty, M. y Kearney, L. **The sink environment as a source of microbial contamination in the domestic kitchen.** *Food and Environmental Sanitation*. 22[9], 658-666. 2003.
201. Vatanyoopaisarn, S., Nazli, A., Dodd, C.E.R., Rees, C.E.D. y Waites, W.M. **Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel.** *Applied and Environmental Microbiology* 66(2):860-3. 2000.
202. Vora, P., Senecal, A. y Schaffner, D.W. **Survival of *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 in intermediate moisture foods is highly variable.** *Risk Analysis* 23(1):229-36. 2003.
203. Wall, P.G., Threlfall, E.J., Ward, L.R. y Rowe, B. **Multiresistant *Salmonella typhimurium* DT104 in cats: a public health risk.** *Lancet* 348:471. 1996.
204. Werner, H.P., Borneff, M. y Borneff, J. **Development of a new test method for surface disinfection procedures.** *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, I Abt Orig* 165:1-94. 1977.

- 
205. Whiting, R.C., Sackitey, S., Calderone, S., Morely, K. y Phillips, J.G. **Model for the survival of *Staphylococcus aureus* in nongrowth environments.** *International Journal of Food Microbiology* 31:231-43. 1996.
206. Williamson, D.M., Gravani, R.B. y Lawless, H.T. **Correlating food safety knowledge with home food-preparation practices.** *Food Technology*, 94-100. 1992.
207. Wilson, J., Williams, D., Humphrey, T.J., Parry, S., Foster, J. y Palmer, S. **Bacterial contamination of the domestic kitchen.** *Public Health Laboratory Service 23rd Annual Scientific Conference Abstract*. 1998.
208. Wirtanen, G., Husmark, U. y Mattila-Sandholm, T. **Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems.** *Journal of Food Protection* 59(7):727-33. 1996.
209. Worsfold, D. **An evaluation of food hygiene and food preparation practices.** *Thesis of Open University, Cardiff, UK*. 1994.

210. Yeung, R. y Morris, J. **Food safety risk: Consumer perception and purchase behaviour.** *British food journal* 103:170-86. 2001.
211. Yohannes, K.E., Roche, P., Blumer, C. Spencer, J., Milton, A., Bunn, C., Gidding, H., Kirk, M. y Della-Porta, T. **Australia's notifiable diseases status, 2002.** *National Notifiable Diseases Surveillance System* 2002.
212. Zeitoun, A.A.M., Debevere, J.M. y Mossel, D.A.A. **Significance of enterobacteriaceae as index organisms for hygiene on fresh untreated poultry, poultry treated with lactic acid and poultry stored in a modified atmosphere.** *Food Microbiology* 11, 169-176. 1994.
213. Zhang, P. y Penner, K. **Prevalence of selected unsafe food-consumption practices and their associated factors in Kansas.** *Journal of Food Safety* 19:289-97. 1999.
214. Zhang, T.C. y Bishop, P.L. **Structure, activity and composition of biofilm.** *Wat Sci Tech* 29(7):335-44. 1994.

215. Zhao, P., Zhao, T., Doyle, M.P., Rubino, J.R. y Meng, J. **Development of a model for evaluation of microbial cross-contamination in the kitchen.** *Journal of Food Protection* 61:960-3. 1998.
216. Zottola, E.A. y Sasahara, K.C. **Microbial biofilms in the food processing industry-should they be a concern?** *International Journal of Food Microbiology* 23(2):125-48. 1994.

## 9. RESUMEN.

Más de la mitad de las toxiinfecciones alimentarias se producen en el hogar. Conocer la distribución y el tipo de la flora doméstica y los flujos de esta de unas superficies a otras es fundamental a la hora de establecer medidas para prevenir brotes en el futuro. Además, conocer la capacidad de reducción de recuentos en la flora microbiana de los productos limpiadores / desinfectantes de las superficies utilizados en el hogar es capital para diseñar procesos de higienización que minimicen la llegada de estos a los alimentos.

Entre los objetivos de esta tesis se encuentran la cuantificación y tipificación de la flora microbiana de las superficies domésticas y la valoración de la efectividad desinfectante de algunos de los productos de limpieza doméstica más populares.

Los resultados obtenidos muestran que de todas las superficies estudiadas las que mayor contaminación microbiológica presentan son aquellas que permanecen húmedas durante varias horas al día: desagüe del fregadero de la cocina y desagüe de la bañera. La flora predominante en estas superficies son enterobacterias. Sin embargo en las superficies donde la humedad no está presente de manera constante las enterobacterias ven muy mermada su proliferación hasta recuentos del mismo orden de magnitud que la flora de especies del género *Staphylococcus* y afines. Los *Staphylococcus* y afines tienen, además, una gran capacidad de adhesión y formación de biofilms, lo cual complica su eliminación.

Una vez conocida esta distribución de la flora se procedió a valorar la eficacia desinfectante de diferentes productos limpiadores. Los resultados muestran que los productos destinados a la limpieza del hogar que contienen amonio cuaternario o hipoclorito son los que consiguen una mayor disminución de la flora microbiana de las superficies. Si bien en las superficies húmedas la recontaminación a partir de la flora residual es muy rápida.

**ABSTRACT.**

Households account for more outbreaks of foodborne illness than the total of all other sources. The knowledge of distribution, kind of microorganisms and how they move over different surfaces are very important to control them and their consequences. Furthermore, to study, in use conditions, the activity against bacteria of different commercial surface cleaners and disinfectants is also very important to design effective sanitizer process.

Quantification and identification of surfaces home microorganisms, and the evaluation of disinfectant activity of some of the most popular domestic cleaners are the objectives of this thesis.

Our results show that the major microbiologic counts are found in surfaces that are permanently wet: kitchen's and bath sink drain. Most of those microorganisms are enterobacteria. However in dry surfaces enterobacteria cannot grow as well as in wet surfaces. The counts of enterobacteria on those surfaces are similar to flora related with *Staphylococcus* and near microorganisms. *Staphylococcus* and near microorganisms could attach surfaces and form a biofilm quickly, then, their removal will be more difficult.

After we have got the results of the distribution of the domestic flora, we began to evaluate the activity against bacteria of commercial cleaners and disinfectants. Our results show that those cleaners formulated with quaternary ammonium or hypochlorite, are the most effectives to reduce the total count bacteria over surfaces. But, on wet surfaces, the recontamination, from the residual microorganisms, until bacterial loads detected before cleaning is observed in a very short time.