



CONTROL DEL BIOFILM **En la industria alimentaria**

y su relación con la *Escherichia coli*

Roxana Roller
Junio 2014

Resumen

Existen innumerables de estudios sobre bacterias y se ha demostrado que muchas de ellas son altamente perjudiciales y mucho mas si llegan a estar en contacto con alimentos.

Hoy la industria alimentaria Argentina se encuentra relacionada con la aparición de *E.coli* en carnes de exportación, batería de importancia mundial, científica, económica y medica.

Estas bacterias pueden llegar a superficies de Establecimientos elaboradores de alimentos, fijarse sobre los equipo, hasta formar biopeliculas o biofilms, formando focos de contaminación. Malas prácticas en higiene o insuficientes procedimientos de limpieza y desinfección están en la mira del mundo, para la prevención de este flagelo.

Las medidas sanitarias especificas no solo deben tomar de manera cuenta de la higienes en cuanto a superficies que estén en contacto con alimentos, dentro de una planta procesadora, si no también fomentar la investigación para prevenir la actividad microbiana frente a organismos planctónicos y generadores de biofilms, este hoy es un problema directamente relacionado con la salud pública, cada sector de la industria alimentaria deberá involucrarse para desarrollar su propia tecnología dependiendo de las variables propias a sus procesos.

Índice

Resumen

Índice

Introducción

Objetivos

Hipótesis

Materiales y Métodos.

Marco teórico.

1.-Definición

2.-Proceso de formación

a. Fases

i. Fase 1: Absorción

ii. Fase 2 y 3. Adhesión a la superficie

iii. Fase 4: Crecimiento y maduración

iv. Fase 5: Dispersión de células colonizadas.

3.- Principales procesos que permiten la liberación celular.

b. Acondicionamiento

c. Maduración

d. Cooperación entre especies

4.- Factores que influyen en el desarrollo del biofilms.

a. Propiedades de las superficies en contacto

b. Tiempo de contacto

c. Características de la superficie celular.

d. Disponibilidad de nutrientes.

e. Composición y diversidad microbiana.

f. Disponibilidad del agua.

5.- Formación de Biofilm por patógenos alimentarios.

a. *Listeria monocytogenes*

b. *Salmonella spp*

c. ***Escherichia coli***

d. *Pseudomonas spp.*

e. *Campylobacter jejuni*

f. *Bacillus spp.*

g. *Staphylococcus aureus*

DESARROLLO DE LA INVESTIGACION

HIPOTESIS 1

1. Generalidades

2. *Escherichia coli* y su relación con el biofilms

3. *Escherichia coli*: contexto Argentina.

4. Discusión y conclusión.

HIPOTESIS 2

1. Generalidades

2. Método: encuesta

3. Discusión y Conclusión.

HIPOTESIS 3

1. Generalidades

2. Reservorios y Vías de transmisión.

3. VTEC en medio ambiente.

4. VTEC en acero inoxidable.
5. Estrategias de supervivencia: formación de biofilms
6. Discusión y conclusión.

HIPOTESIS 4

1. Generalidades
2. Rol de la microbiología en la industria alimentaria.
 - 2.1. Acido láctico al 2%
 - 2.1.2 Validaciones en establecimiento argentino exportador
 - 2.1.3 Conclusiones de la aplicación de Acido láctico.
3. Intervenciones Físicas específicas de la Industria Cárnica.
 - 3.1. Steam vacuum sobre cueros en reses.
 - 3.1.2 Conclusiones
4. Discusión y Conclusión.

Introducción

Los biofilms pueden formarse en todo tipo de superficies en la industria alimentaria, incluyendo plástico, cristal, madera, metal y sobre los alimentos.

Puesto que pueden contener microorganismos patógenos y presentar mayor resistencia a la desinfección. Incrementan las posibilidades de contaminación del producto y de provocar infecciones alimentarias, razón por la cual se considera que la presencia de biofilms en las superficies de contacto de la industria alimentaria constituye un riesgo importante para la salud.

Los biofilms formados en las superficies que están en contacto con los alimentos son la causa principal de contaminación del producto final. Las consecuencias de esta contaminación pueden conducir a pérdidas económicas dado el necesario rechazo del producto o incluso, a enfermedades si intervienen microorganismos patógenos.

Por esto motivo es preciso eliminar y controlar todos los microorganismos de las superficies en contacto con los alimentos, antes de que los contaminen y se establezcan en un biofilms que servirá de reservorio. El biofilm formado sobre las carnes crudas y en el entorno del proceso de elaboración (superficies, utensillos, instrumentos...) aumenta considerablemente los problemas de contaminación cruzada y de contaminaciones posteriores en el proceso (Serra, 2003).

Por medio del sistema de alerta rápida para alimentos y piensos de la Unión Europea (rasff)¹ que intercambia rápidamente información sobre riesgos para la salud humana relacionados con alimentos y piensos con la finalidad de asegurar los controles, para una mayor inocuidad alimentaria, se han detectado presencia de microorganismos patógenos proveniente carnes de nuestro país y con esto no solo se compromete la seguridad alimentaria si no también el status sanitario por el nivel de riesgo de nuestros alimentos.

Como se ha mencionado en el párrafo anterior, se han detectado en los últimos años, la presencia de microorganismos patógenos como *salmonella spp* en las superficies carne de pollo, y recientemente en cortes bovinos la presencia de *Escherichia Coli no O157*, estas superficies no suelen ser muy formadoras de biofilms por lo que podríamos estimar que estos microorganismos están más bien relacionados con la contaminación cruzada, ya que actualmente en la industria cárnica argentina los programas de higiene y desinfección se aplican de manera obligatoria.

No obstante esta investigación intenta demostrar que estos programas no contemplan correctamente el control de biopelículas, los mismos logran resistir a muchos tratamientos de saneamiento convencional convirtiéndose en un potencial peligro y factor de riesgo para la inocuidad de los alimentos. Para controlar este problema, cada industria debería realizar una investigación y desarrollar su propia tecnología dependiendo de las variables inherentes a sus procesos.

Analizaremos los hallazgos de la bacteria e coli en carnes argentinas para determinar la presencia de Biofilms y la posibilidad de resistencia que hayan favorecido su supervivencia en los diferentes procesos a los que se sometió la carne antes de su despacho a UE.

¹ El [Reglamento \(CE\) n° 178/2002](#) constituye el fundamento jurídico del Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos conocido por sus siglas RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*). Los artículos 50, 51 y 52 de este Reglamento establecen el ámbito y los procedimientos del RASFF.

Objetivos

El objetivo principal de esta investigación es indagar la presencia de microorganismos patógenos especialmente *Escherichia coli* protagonista de los últimos eventos a nivel nacional y su capacidad de formar biofilms con otras MO.

Determinar si la industria frigorífica utiliza el control microbiológico como indicador de higiene, los patógenos más relevantes en la formación de biofilm, su control y remoción.

Relacionar el *Escherichia coli* NO O157 con su persistencia en el medio ambiente, y su capacidad de formar biofilms.

Describir el estado de situación y reacción a nivel industrial frente a estos microorganismos emergentes (*Escherichia coli* O157 y NO O157), responsables de contaminar alimentos. Medidas de intervención para reducir la carga bacteriana en carnes.

Hipótesis

1. El *Escherichia coli* es capaz de formar biofilms provocando contaminación en carnes argentinas;
2. La industria cárnica posee autocontroles para *Escherichia coli* O157:h7, sin embargo no los realiza para las *E.coli* NO O157;
3. La *Escherichia coli* NO O157 es mas resistente y tiende a convivir en comunidades bacterianas (biofilms);
4. La reacción y acción en el nivel industrial no contempla la formación de biofilms como responsables de la contaminación y su control queda reducido a los procesos de higiene.

Materiales y métodos

Para la realización de esta investigación se utilizó material documental y de investigación de diferentes técnicos y especialistas en el tema a nivel nacional e internacional.

Se evaluaron los rechazos realizados en la Unión Europea de carnes argentinas, así como también los informes de las empresas involucradas.

Todos los Establecimientos analizados reúnen condiciones higiénicas sanitarias y se encuentran habilitados por SENASA, poseen estándares sanitarios que avalan su exportación a diferentes destinos de exportación, en el marco de esta investigación, se constató in situ los procedimientos de higiene, así como sus procesos e intervenciones.

Se utilizó la encuesta para determinar en la población de establecimientos de producción primaria exportadores los procedimientos microbiológicos empleados y la tecnología utilizada.

Se analiza la normativa vigente nacional.

Se analiza validaciones estadísticas para comprobar la actividad bacteriana dentro de una industria cárnica.

Esta Investigación corresponde a un diseño cuantitativo y descriptivo.

Marco teórico.

1. Definición

Los biofilms son comunidades complejas de microorganismos que crecen embebidos en una matriz orgánica polimérica auto producida, y adherida a una superficie viva (biofilms de mucosa) o inerte que pueden presentar una única especie microbiana o un abanico de especies diferentes.²

Podemos encontrar Biofilms en todos los medios donde existan bacterias, en el medio natural, clínico o industrial. Solo necesitan un entorno hidratado y una mínima presencia de nutrientes, porque pueden desarrollarse sobre superficies hidrófobas o hidrófilas bióticas o abióticas.³

Es en las últimas dos décadas donde ha ido creciendo la percepción de que las bacterias no se encuentran en el medio ambiente en una forma libre como las estudiamos frecuentemente en el laboratorio si no que podemos encontrarlas en su gran mayoría formando parte en los biofilms que definimos anteriormente.

Estos dos estados que pueden adoptar las bacterias se diferencian en su forma y es necesario redefinir o incluir esto en su definición. Así sería que un biofilm es una comunidad microbiana sésil⁴ caracterizada por células que están unidas irreversiblemente a un sustrato o interfaz o entre si, embebidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares autoproducidas y que exhiben un fenotipo diferente al de las mismas células en forma planctónicas con respecto a la tasa de crecimiento y a la transcripción de genes⁵. Es de suma importancia esta nueva definición ya que existen poblaciones que cumpliendo con las características de la primera definición no asumen el fenotipo del biofilm, estas poblaciones "no-biofilm" son las que podemos ver creciendo en la superficie de un agar, y tienen un comportamiento "varadas" en una superficie y no presenta las características fenotípicas ni de resistencia inherentes a las biopelículas verdaderas.

La formación de biofilms es una estrategia adaptativa de los microorganismos ya que su mayor fortaleza es la de proteger a los microorganismos de la acción de los agentes externos, incrementa la posibilidad de nutrientes para su crecimiento, facilita el aprovechamiento del agua, reduciendo la posibilidad de deshidratación y posibilita la transferencia de material genético, todas estas son las circunstancias que lo transforman en resistentes y aumentan sus capacidades de supervivencia. Es por eso que los métodos habituales de desinfección o el uso de antibióticos no siempre son efectivos.

2. Proceso de formación

El desarrollo en biofilm es una forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza. En la actualidad se considera que en condiciones ambientales

² Costerton, 1995-, Davey y O'Toole, 2000; Kraigsley et al., 2002; JW Costerton dirige el Centro de Ingeniería del Biofilm en la Universidad del Estado de Montan. Este centro fue fundado en el año 1990 para recoger y estudiar diversas y sorprendentes apreciaciones que iban descubriéndose, por parte de equipos multidisciplinarios de ingenieros, biólogos químicos y especialistas del medio ambiente.

³ Milleret 1987; Marshall 1992; Fletcher 1988.

⁴ Sésil: *sésil adj. bot.* Díc. de cualquier órgano que carece de pie o soporte.

⁵ Donlan y Costerton 2002

adecuadas, la mayoría de los microorganismos son capaces de formar BIOFILMS. (Donlan,2002; Lasa et al.2009).

Además, dependiendo de la cepa implicada, las micro colonias pueden estar compuestas de 10 – 25% de células y de 75 – 90% de matriz SPE⁶. Los biofilms contienen “canales de agua” que permiten el transporte de nutrientes, metabolitos y señales químicas que las células secretan en respuesta al aumento de la densidad poblacional y que interfieren en el desarrollo del biofilms (Tenke et al., 2006).

En la actualidad es bien conocido el sistema de comunicación entre las bacterias por medio de secreción de pequeñas moléculas difusibles. Varios estudios recientes indican que la formación de biofilm es regulada por la expresión de genes dependientes de la densidad poblacional y controlada por señalización célula-a-célula en un mecanismo denominado “*quorum sensing*”⁷. En un creciente número de cepas bacterianas se evidencia ese tipo de comunicación en el cual las bacterias pueden sentir cambios en el medio y coordinar la expresión genética a favor de la supervivencia de toda la comunidad. El “*quorum sensing*” regula varias funciones tan diversas como la movilidad, expresión de factores de virulencia, esporulación, producción de antibióticos, intercambio de material genético además del desarrollo de la biopelícula⁸.

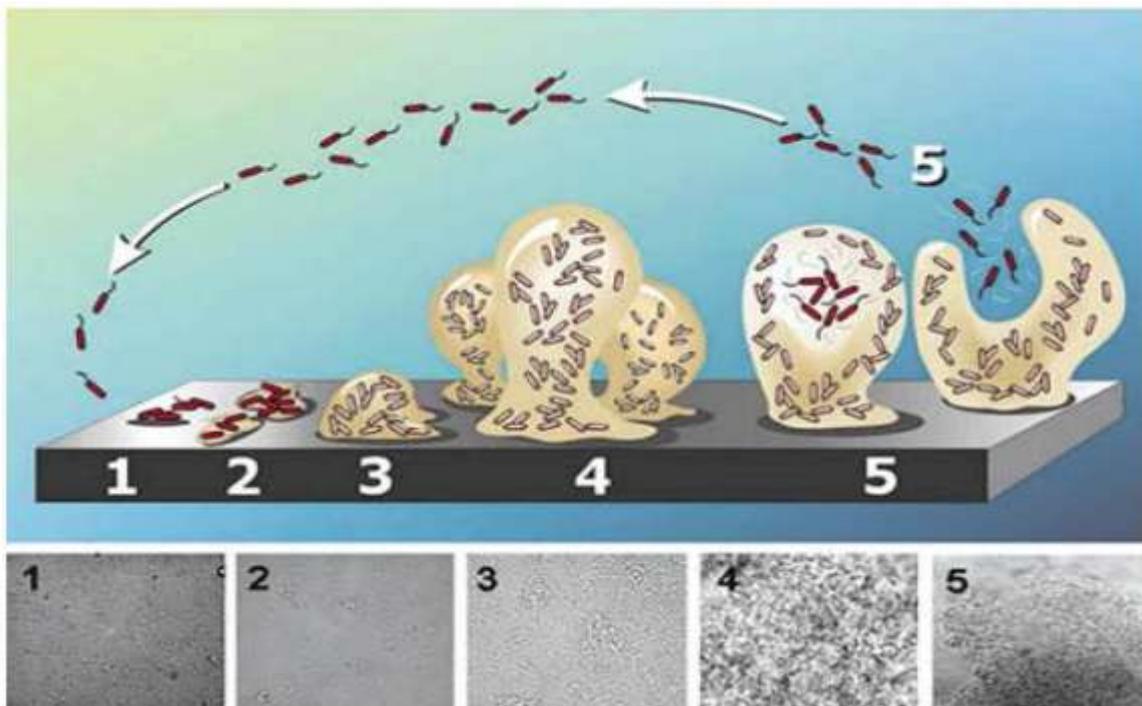


Figura 1. Eventos en el desarrollo de una biopelícula (Balaban et al. 2007).

(1) Absorción/Adhesión reversible (2) Adhesión irreversible y producción de SPE (3) Formación de microcolonias (4) Desarrollo de estructuras tridimensionales y maduración de la biopelícula (5) Dispersión de células.

⁶ SPE: sustancia polimérica extracelular

⁷ (Jiang y Pace, 2006)

⁸ (Jiang y Pace, 2006; Sauer et al., 2007).

i. Fases

1. Fase 1: Absorción

La etapa Inicial del proceso (Figura 1) de formación del biofilm es la adherencia de una célula sobre una superficie, esta adherencia depende de los factores ambientales, como la temperatura y el pH, y de factores genéticos que afectan a la motilidad, la sensibilidad ambiental y presencia de determinadas proteínas en la superficie de la célula en cuestión

En bacterias gram negativas (*pseudomonas aeruginosa*, *Escheriquia coli*, *salmonella enterica*) , se ha visto la presencia de flagelos y fimbrias importantes para la etapa de adherencia primaria.

La adhesión de la bacteria a la superficie es un proceso rápido que se produce entre 5 y 30 segundos.

2. Fase 2 y 3: Adhesión a la superficie.

La adhesión de la bacteria tiene lugar en dos fases; una primera fase reversible, seguida de una irreversible. La primera es una unión debil de una bacteria, en este momento la bacterias siguen presentando movimiento y puede ser eliminadas fácilmente con una buena limpieza.

La fase irreversible es dependiente del tiempo y resulta de anclaje a la superficie de los apéndices bacteriano, caso de que existan y/o de la producción por parte de las células bacterianas inicialmente adheridas al SPE. En esta etapa las bacterias forman la matriz de exopolisácarido para establecer un contacto físico entre ellas y la superficie. Una vez establecido, las células bacterianas se multiplican dando lugar a microcolonias y posteriormente al biofilm. En este periodo de adhesión las bacterias cambian su fenotipo y llegan a ser básicamente diferentes a su forma planctónica. Este cambio implica la expresión de genes específicos, se producen cambios y alteraciones en su morfología y cambia su tasa de crecimientos⁹.

En una biofilm maduro, la mayor parte de su volumen esta ocupado por una matriz laxa (75-95%) alrededor de pocas bacterias (5-25%), que proporcionan la cubierta gelatinosa y deslizando a la superficie colonizada, con un considerable volumen de agua disponible¹⁰.

Para la unión irreversible entre la célula y la superficie es necesario un tiempo de contacto mínimo. Este periodo es usualmente corto y varia en función de la disponibilidad de nutrientes, temperatura y presencia de antibióticos. Varios estudios indican que las uniones irreversibles necesitan para formarse entre 20 min. y cuatro horas a una temperatura de entre 4 y 20° C. ¹¹

3. Fase 4.Crecimiento y maduración.

Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie, comienza a dividirse y la células bacterianas hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia similar a como sucede durante el proceso de formación de colonias en las placas de medios con agar. ¹²

Si las condiciones son adecuadas para un crecimiento suficiente del biofilm se desarrollará una estructura organizada. A este proceso se le denomina "maduración".

⁹ Donlan y Costerton, 2002

¹⁰ Chmielewsky y Frank, 2003

¹¹ Fuster i Valls, 2006

¹² Kumar y Anand, 1998)

Este desarrollo y maduración del biofilm depende de los factores como la disponibilidad de nutrientes, la diversidad microbiana de la comunidad, la disponibilidad del agua y el transporte celular.

A medida que madura el biofilm, se va adaptando a la presencia de nutrientes, al oxígeno y a los cambios poblacionales, formando microcolonias discretas separadas por canales de agua. La densidad estructural de la matriz se incrementa en el núcleo mientras que las capas superiores permanecen porosas. Las bacterias con un metabolismo más activo permanecen en la superficie de la matriz, cerca de los canales de agua. Los canales de agua permiten la dispersión y el intercambio de sustancias orgánicas. Los nutrientes se atrapan y concentran en la matriz del biofilm y se mueven por esta difusión. El número de bacterias viables se reduce con edad del biofilm, así en un biofilm joven se han detectado cerca del 80% de células bacterianas viables y tan solo un 50% en un biofilm maduro.¹³

4. Fase 5: Dispersión de células colonizadas.

Finalmente, algunas bacterias de la matriz del biofilm se liberan del mismo para poder colonizar las nuevas superficies cerrando el proceso.

La liberación de las bacterias desde la biopelícula es lo que menos se conoce se puede deber a modificaciones internas en la estructura del biofilm o producirse por actuación de fuerzas físicas.¹⁴

El desprendimiento de bacterias del biofilm provocado por la acción de fuerzas físicas ha sido estudiado con mayor detalle.

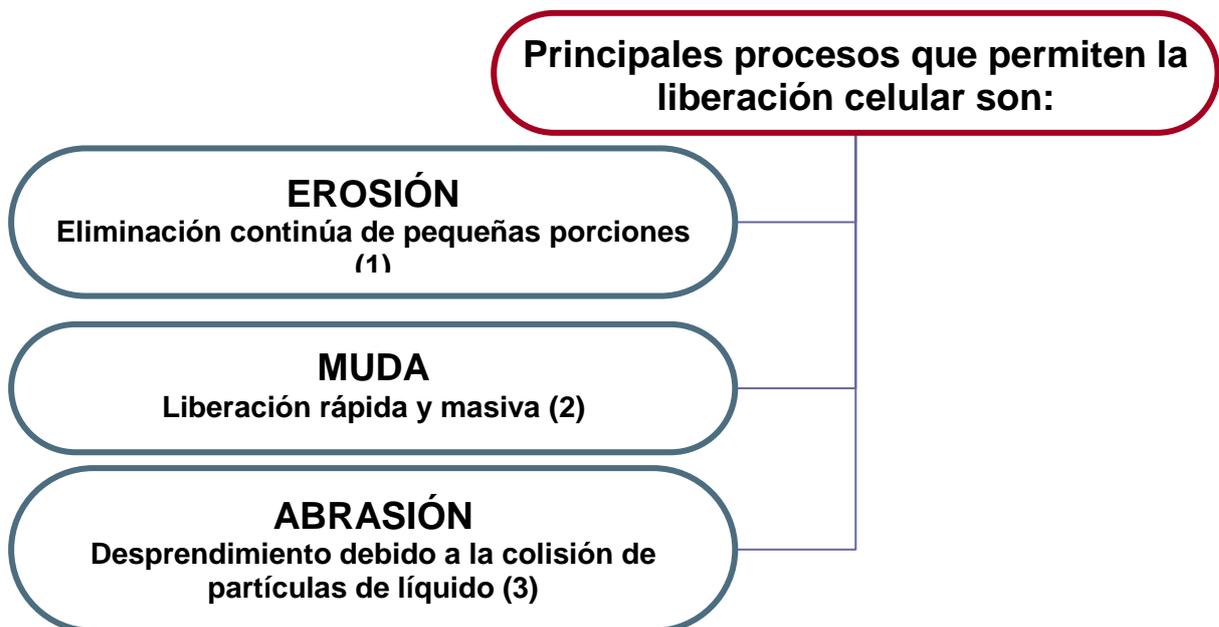


Grafico realizado por R.R

1) Se ha observado que la tasa de erosión se incrementa al aumentar el espesor del biofilm y la fricción en la interfaz líquido biofilm.

2) La muda, sin embargo, resulta ser un proceso más aleatorio que la erosión y se cree que resulta del agotamiento de los nutrientes u oxígeno dentro de la estructura de biofilm.

¹³ Fuster i Valls. 2006

¹⁴ Donlan 2002

3) Los biofilm que se forman en tuberías, filtros entornos cargados de partículas suelen estar sujetos a la dispersión por abrasión.¹⁵

El modo de dispersión influye, aparentemente, en las características fenotípicas de los microorganismos. Los agregados erosionados desde el biofilm por fuerzas físicas mantienen ciertas características del fenotipo del biofilm, como las propiedades de resistencia antimicrobiana, mientras que las bacterias que ha sido dispersada como resultado del crecimiento normal del biofilm pueden revertir rápidamente al fenotipo planctónico.¹⁶

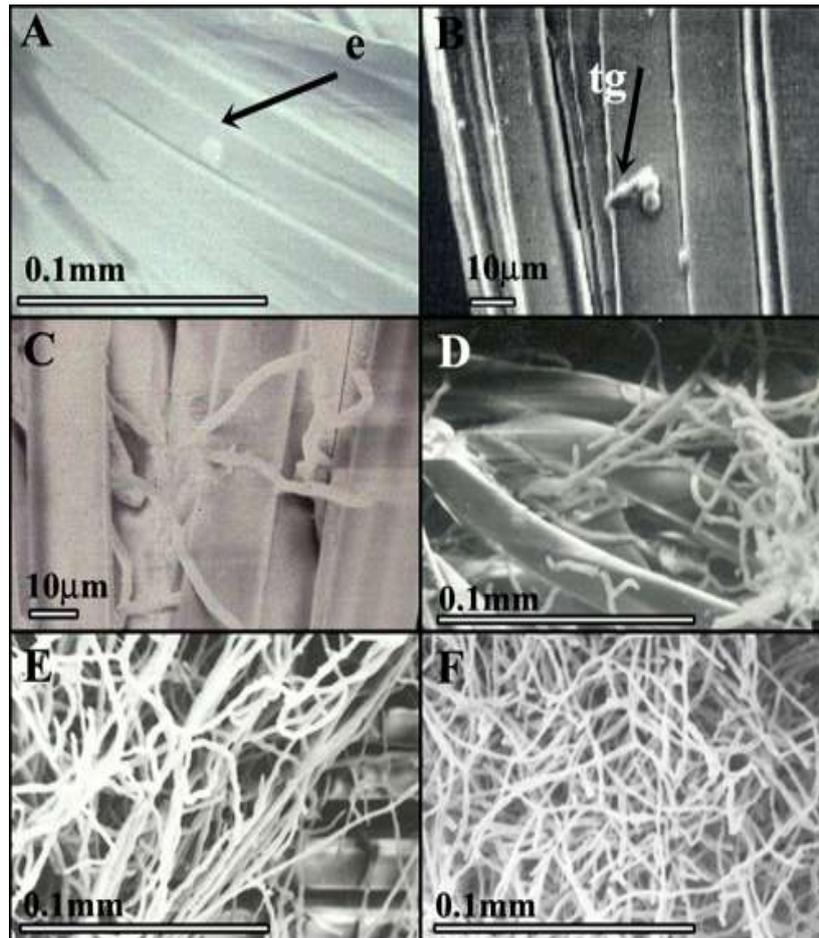


Figura 1. Formación de la biopelícula de *Aspergillus niger* por crecimiento sobre poliéster: (A) 0 horas, (B) 4 horas, (c) 10 horas, (D) 18 horas, (E) 24 horas; (F) 120 horas de crecimiento.

¹⁵ Donlan 2002

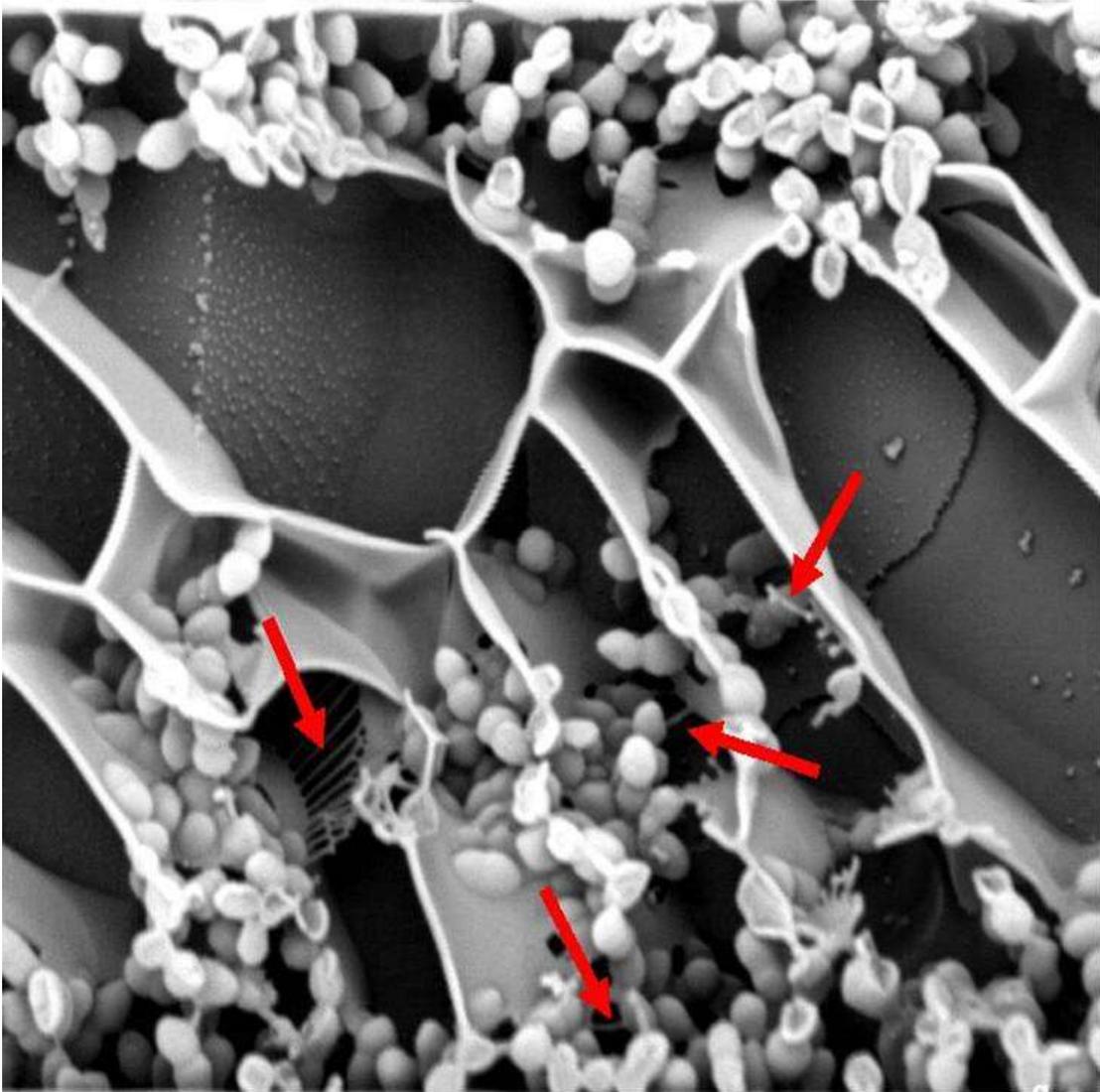
¹⁶ Donlan 2002

i. Acondicionamiento.

La capacidad de unirse a diversos plásticos, cristal y metales, depende de las proteínas específicas de su cubierta y de los apéndices motrices. Los estudios muestran que el acero inoxidable puede ser susceptible como el plástico¹⁷.

La acción del aire y la humedad sobre el acero inoxidable, poco a poco crea una capa de óxido de cromo sobre el que se pega la suciedad orgánica. Así se pre-acondiona el sustrato para la adhesión de las bacterias.

El biofilm puede adherirse a cualquier tipo de superficie, gracias a que previamente entra en contacto con materia orgánica presente en el agua. En la interfase agua/superficie se deposita una capa orgánica, que cambia las propiedades químicas y físicas de la superficie y mejora las posibilidades de fijación de las bacterias.

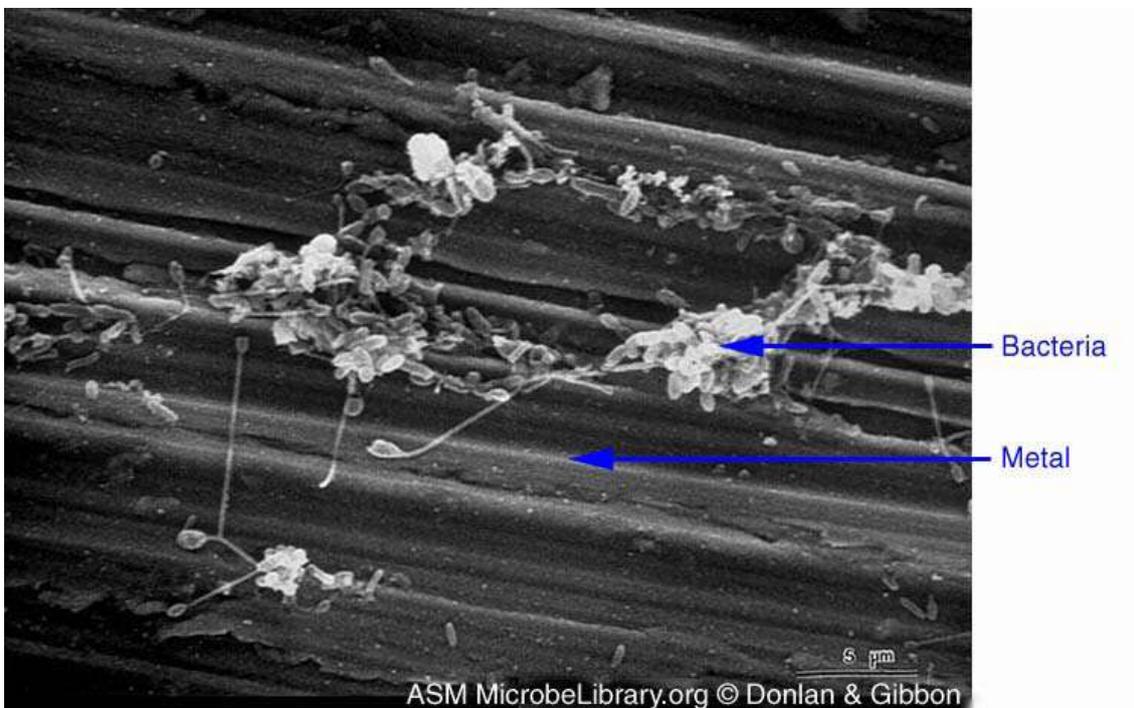


Micrografía electrónica de biofilmes de *S. pneumoniae* sobre una superficie de vidrio. Las flechas rojas señalan material filamentososo que une las células de neumococo entre sí y a la matriz extracelular. Fuente: J. Bacteriol. 2006; 188:7785-7795. Autora de la fotografía: Miriam Moscoso.

¹⁷ Pedersen, 1990



Restos visibles de biofilms microbianos en el desagüe de un tanque de recepción de Leche cruda en una quesería.



ii. Maduración

El biofilm brinda una tranquilidad de ambiente, favorece el crecimiento y la división de células y permite iniciar la fabricación de una mezcla de polímeros polianiónicos, limosa y pegajosa, que excreta al exterior para mantener unidas las células, entre ellas y con la superficie.

El glicocalix de material polimérico se excreta desde la pared celular bacteriana en una formación radicular que recuerda a la de una araña. Su estructura a partir de grupos de polisacáridos neutros o portadores de cargas eléctricas, que suman a la adherencia la capacidad de actuar como un sistema de intercambio iónico para atrapar y concentrar los nutrientes que encuentre.

iii. Cooperación entre especies.

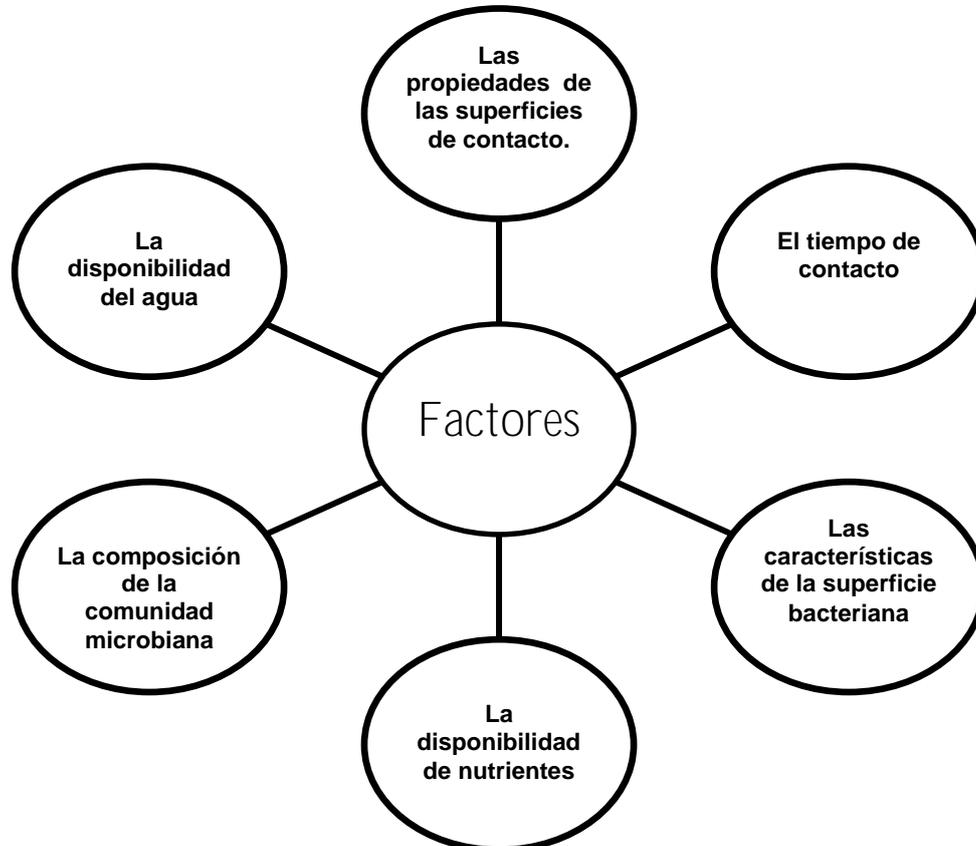
En los biofilm naturales conviven microorganismos compatibles. Cooperativos o al menos comensales. La concentración de células alcanzada en su seno no permite coexistencia de organismos antagónicos.

Las combinaciones viables entre organismos dependen de la buena parte del colonizador primario, esto es, del que llega primero, que es el que selecciona cuales de los “visitantes casuales” de otras especies o cepas se quedan en “su” biofilms.

Podemos dar como ejemplo el caso de la *Listeria monocytogenes*, con cepas muy patógenas como la listeriosis humana, aunque infrecuente, tiene una mortalidad muy alta (20-30%), si bien hay normas muy exigentes en cuanto a la presencia de *L.monocytogenes* en alimentos en la industria frigorífica como así en alimentos que se comercializan listos para consumo humano y hay que vigilar muy bien la higiene de las instalaciones de las instalaciones para cumplir ese requisito. Esta especie puede formar biofilms en solitario, pero lentamente y con la matriz delgada. Pero también puede instalarse en los biofilms de *pseudomonas fluorescens*, por ejemplo, una especie deteriorativa y frecuente en plantas refrigeradas, que produce rápidamente biofilms gruesos.

El mismo numero de *L.monocytogenes* por cm², instalado solo o acompañado, representa soluciones bien distintas para el encargado de la higiene, ya que las pruebas de los productos de limpieza y desinfección suelen hacerse con biofilms de una sola especie.

4.- Factores que influyen en el desarrollo del biofilms



a. Propiedades de las superficies de contacto.

El tipo de sustrato influye en las características de la unión. Las bacterias tienden a unirse a las superficies hidrófilas uniformemente en una capa, mientras que en el caso de las superficies hidrófobas tienden a unirse en grupos (Fuster i Valls, 2006).

En algunos trabajos ha demostrado que las bacterias quedan retenidas en las imperfecciones de las superficies, además, las superficies rugosas son más fáciles de limpiar y acumulan suciedad permitiendo que las bacterias vuelvan a multiplicarse (González, 2005)

El acero inoxidable se usa frecuentemente como material para la cocina y en las instalaciones industriales porque resisten los golpes, a la corrosión dura mucho tiempo y es de sencilla fabricación, además de ser estable, inerte y de fácil limpieza. A escala microscópica se observa, sin embargo que el acero presenta diminutas oquedades que permiten una mayor retención de bacterias por el incremento del número de puntos de adhesión demostraron que los niveles de higiene en las superficies de contacto podían verse disminuidos con el uso de provocar que la superficie se deteriorase. Los defectos en las superficies pueden actuar como punto de retención de microorganismos, lo que hace que las bacterias supervivientes puedan volver a multiplicarse y formar un biofilms (Fuster i. Valss, 2006)

ii. Tiempo de contacto

Un mayor tiempo en contacto entre las células y el sustrato permite que se establezca un mayor número de uniones haciendo la adhesión irreversible, y por tanto, factores como las condiciones ambientales, tipo de microorganismos, sustrato y presión en el caso de superficies de trabajo o utensillos, pueden también influir de manera importante en la mayor posibilidad de formación de biofilms. (Pérez Rodríguez et al, 2008)

iii. Características de la superficie celular.

Las características de la superficie celular como los flagelos, Pili, proteínas de adhesión y cápsulas ejercen también su influencia. Los Pili actúan como un velcro para anclar las bacterias a algunas superficies y también actúan como quimiorreceptores, dirigiendo la bacteria hacia algunos sitios específicos. La pérdida de estos apéndices cambia las propiedades de superficie de la bacteria, lo que pueda provocar una menor capacidad de adhesión.

iv. Disponibilidad de nutrientes

La disponibilidad de nutrientes ejerce una influencia mayor sobre la estructura y composición de biofilms.

v. Composición y diversidad microbiana

Los biofilms multiespecies son más gruesos y estables frente al stress ambiental que los monoespecies. Esto se atribuye a la secreción combinada de las distintas sustancias poliméricas extracelulares resultantes de los diferentes microorganismos (Chmielewsky y Frank, 2003)

vi. Disponibilidad del agua.

La disponibilidad de agua es un factor crucial para la viabilidad del biofilms. Una humedad relativa en torno al 90-100% posibilita el desarrollo del biofilm, la mayoría de ellos se encuentran en ambientes acuosos como pueden ser los sistemas de conducción o tuberías de las industrias lácteas. Sin embargo, también se han encontrado en valores de 70-80% pueden ser suficientes para permitir el desarrollo de biofilms. La temperatura es un factor determinante también y a la vez relacionado con la humedad relativa.

5. Formación de Biofilms por patógenos alimentarios

A pesar de que la mayoría de las especies bacterianas tienen la capacidad de formar biofilms, algunos géneros lo forman más fácil y rápidamente que otros, como es el caso de la *Pseudomonas*, *Listeria*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus*, y *Bacillus* (Lee Wong, 1998).

Si bien son numerosas las especies susceptibles de formar biofilms en la industria de producción de alimentos se citan a continuación algunas de especial importancia en relación con la seguridad alimentaria. (González, 2005)

- i. *Listeria monocytogenes*
- ii. *Salmonella spp*
- iii. ***Escherichia coli***
- iv. *Pseudomonas spp.*
- v. *Campylobacter jejuni*
- vi. *Bacillus spp.*
- vii. *Staphylococcus aureus*

i. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes es un patógeno con capacidad de proliferación en entornos fríos y húmedos, ideales para la formación de biofilms tanto mono como multiespecíficos (Chmielewsky y Frank, 2003). Las cepas de *Listeria* presentan gran facilidad para adherirse a superficies vivas e inertes y requieren solo un corto espacio de tiempo para la unión. Para iniciar la adhesión, utiliza flagelos, pilis y proteínas de membrana. Se ha observado que *Listeria* muestra mayor adhesión cuando está en la fase de mayor actividad metabólica (Gonzalez Ribas, 2005).

Estudios sobre este patógeno han demostrado que puede llegar a formar biofilm en máquinas loncheadoras y en otros utensilios de acero (Keskinen et al. 2008). Este hecho pone de relevancia al biofilm como un factor de importancia en la contaminación cruzada.

Las bacterias del género *Listeria* son bacilos gram positivos, regulares no esporulados, móviles, anaeróbicos facultativos.

ii. *Salmonella spp.*

Entre las zoonosis de etiología bacteriana más importantes, la salmonelosis ocupa un lugar destacado, debido tanto a sus múltiples formas clínicas como a las repercusiones que en materia de Salud Pública tiene la aparición de brotes de esta enfermedad. Según datos de la *European Food Safety Authority* (EFSA), *Salmonella spp.* es el primer causante de brotes de toxoinfección alimentaria en la UE en los últimos años (EFSA, 2009). Varios estudios han demostrado que *Salmonella* se puede adherir y formar biofilms en superficies que se encuentran en las plantas de procesamiento de alimentos y entre las que se incluyen plástico, cemento y acero (Joseph et al., 2001; Chmielewsky y Frank, 2003). Esto se debe a que posee estructuras de superficie, como la *SEF 17 fimbria*, que le facilitan la adhesión a las superficies inanimadas, proporcionando a las células cierta capacidad de resistencia frente a fuerzas mecánicas (Gonzalez Ribas, 2005). Estudios recientes han demostrado que *Salmonella*, *E. coli* y muchas otras enterobacterias producen celulosa como exopolisacárido principal de la matriz

del biofilm y que la formación de éste resulta esencial para la supervivencia de la bacteria en el ambiente (Lasa *et al.*, 2009). Estudios realizados en la industria alimentaria demostraron que existen diferencias entre los distintos serotipos de *Salmonella entérica* en la facilidad de producir biofilms y en la perdurabilidad de los mismos (Vestby *et al.*, 2009). Al igual que el resto de las enterobacterias esta formado por bacilos cortos gran negativos, no esporulados, anaeróbicos facultativos y móviles en su mayoría.

iii. *Escherichia coli*

Para la formación de biofilms, *E. coli* emplea flagelos, pilis y proteínas de membrana para iniciar la adhesión. Cuando ya está unida a la superficie pierde sus flagelos e incrementa la producción de sustancias poliméricas extracelulares (Gonzalez Ribas, 2005; Houdt y Michiels, 2005). Algunos estudios han puesto de manifiesto que cepas de *E. coli*O157:H7 pueden desarrollar biofilms como resultado de una mayor producción de expolisacáridos y *curli* (Ryu *et al.*,2004). Además, se ha demostrado que la formación de biofilm proporciona una mayor resistencia a *E. coli* O157:H7 cuando se expone a soluciones de hipoclorito, uno de los desinfectantes de mayor uso en la industria alimentaria (Wilks *et al.*, 2005; Ryu y Beuchat, 2005).

iv. *Pseudomonas spp.*

Estas bacterias son muy ubicuas y se encuentran en ambientes de procesamiento de alimentos incluidos desagües, suelos, superficie de carnes, frutas y verduras y productos lácteos de baja acidez (Chmielewsky y Frank, 2003; González Ribas,2005).

P. aeruginosa es el modelo bacteriano en el que se han realizado la mayoría de los estudios de formación de biofilms y regulación mediante *quorum sensing* (Golovlev, 2002). Produce una gran cantidad de sustancias poliméricas extracelulares lo que le permite unirse a superficies de materiales inorgánicos, como el acero inoxidable. Dentro del biofilm puede coexistir con *Listeria*, *Salmonella* y otros patógenos formando biofilms multiespecíficos mucho más estables y resistentes (Chmielewsky y Frank, 2003; González Ribas, 2005).

v. *Campylobacter jejuni*

Aunque *Campylobacter* no se multiplica en alimentos, su dosis infectiva mínima es muy pequeña, es menor que 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 lo que incrementa el riesgo de contaminación cruzada (Joshua *et al.*, 2006; Hanning y Slavik, 2009). Uno de los mecanismos de supervivencia de *Campylobacter spp.* en el medio ambiente es la formación de biofilms. Se ha visto que *Campylobacter* es capaz de producir estas biopelículas tanto en ambientes acuáticos como sobre superficies de acero inoxidable y de cristal. El microambiente creado en el interior del biofilm, protege a *C. jejuni* de su inactivación por la presencia de oxígeno. Se ha demostrado que esta bacteria en el interior del biofilm es capaz de sobrevivir durante una semana a 10 °C, con escasos niveles nutritivos y en condiciones atmosféricas normales, a pesar de su sensibilidad a este tipo de ambientes. También, se ha observado que *C. jejuni* desarrolla biofilms más

rápidamente bajo las condiciones aeróbicas más estresantes (20% O₂) que en condiciones de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂), lo que muestra la capacidad de este microorganismo de adaptar las condiciones propias del biofilm en su beneficio, actuando como reservorio de células viables (Reuter *et al.*, 2010). Estos estudios ponen de manifiesto el papel que la formación de biofilms supone para mantener la presencia activa de *Campylobacter* en los ambientes de procesado de alimentos, aumentando el riesgo de contaminación (Murphy *et al.*, 2006).

vi. *Bacillus* spp.

Bacillus spp. es capaz de sobrevivir durante aquellos procesos que utilizan calor y acumularse en las tuberías y en las juntas de estos entornos de procesado de alimentos. Incluso si los fluidos calientes fluyen continuamente sobre estas superficies durante más de 16 horas, *Bacillus* y otras bacterias termorresistentes son capaces de formar biofilms (Chmielewsky y Frank, 2003; González Ribas, 2005).

vi. *Staphylococcus aureus*

Las bacterias de género *Staphylococcus* son microorganismos ubicuos difíciles de eliminar que colonizan ambientes dispares formando parte de la microbiótica habitual de la piel, la garganta y las fosas nasales de sus hospedadores vertebrados. Es un coco gran positivo aerobio o anaerobio facultativo que produce fermentación láctica y es catalasa y coagulasa positivo. Posee numerosos factores de virulencia, en su mayoría componentes de la pared celular, y una variedad de exoproteínas que facilitan la colonización de nuevos hábitats.

Es un importante patógeno alimentario, y la intoxicación estafilocócica es una de las más prevalentes de gastroenteritis en el mundo.

Desarrollo de la investigación

Hipótesis 1. El *Escherichia coli* es capaz de formar biofilms provocando contaminación en carnes argentinas

Generalidades.

Escherichia coli pertenece a la Familia *Enterobacteriaceae* y es parte de la flora anaerobia facultativa del tracto intestinal del hombre y de los animales. La mayoría de las cepas son comensales, aunque algunas pueden causar diarrea y fueron clasificadas en seis categorías según su patogenicidad, manifestaciones clínicas y características epidemiológicas: enterohemorrágico (EHEC), enteropatógeno (EPEC), enterotoxigénico (ETEC), enteroinvasivo (EIEC), enteroagregativo (EaggEC), y de adherencia difusa (DAEC) (Scheutz *et al.*, 2005).

Algunos tipos de E. Coli son capaces de producir una toxina similar a la producida por el género shigella, denominándose a este grupo de E. Coli productores de toxina shiga o STEC (shiga toxin-producing E. Coli), las mas

conocida es la *Escherichia coli* O157:H7 que produce una de las zoonosis alimentarias más frecuentes e importantes en el hombre debido a la gravedad de los cuadros clínicos y al número de afectados sobre todo por consumo de carne vacuna pudiendo suponer un grave riesgo para la salud pública.

Escherichia coli y su relación con el biofilms

Para la formación de biofilms, *E.coli* emplea flagelos, pilis y proteínas de membranas para iniciar la adhesión. Cuando ya está unida a la superficie pierde sus flagelos e incrementa la producción de sustancias poliméricas extracelulares (gonzalez,2005) Estudios han encontrado que algunas cepas de *e.coli* O157:H7 pueden desarrollar biofilms como resultado de una mayor producción de exo-polisacaridos y *Curli* (Ryu et al.,2004). Además, se ha demostrado que la formación de biofilms proporciona una mayor resistencia a *E.coli* O157:H7 cuando se expone a soluciones de hipoclorito, uno de los desinfectantes de mayor uso en la industria alimentaria (Ryu y Beuchat,2005).

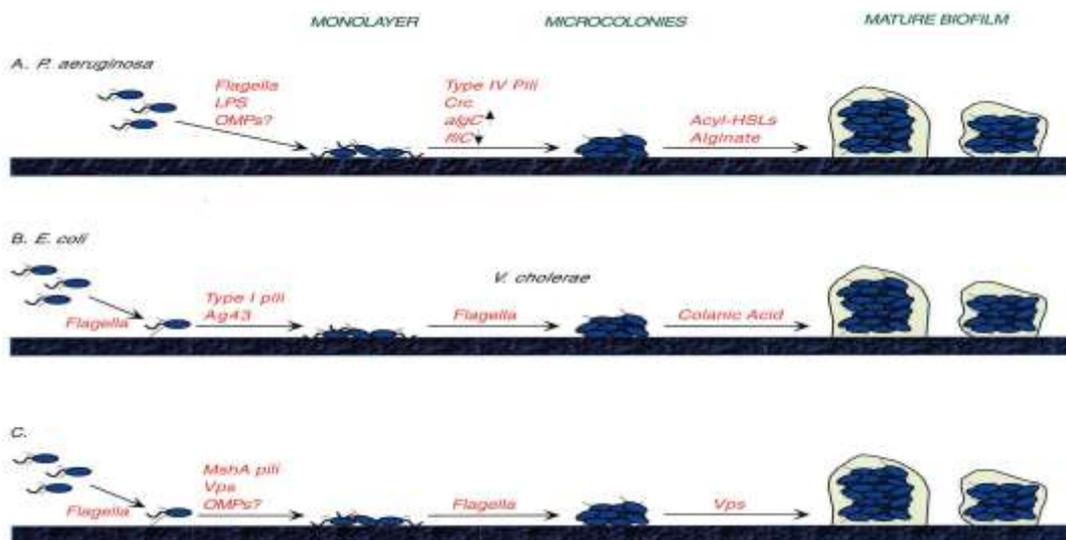


Grafico: El desarrollo de biopelículas en los organismos gram-negativos.

Esta figura se describen los modelos actuales de las primeras etapas en la formación de biopelículas en tres de los mejor estudiados organismos modelo, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *V. cholerae*. (A) En *P. aeruginosa*, se requiere de los flagelos para llevar la bacteria a las proximidades de la superficie, y LPS media en las interacciones tempranas, con una posible función adicional para las proteínas de la membrana externa (OMP). Se requiere la producción de moléculas de señalización célula a célula (acil-HSLs) para la formación de la biopelícula madura. Alginato también puede jugar un papel estructural en este proceso. (B.)

En *E. coli*, se requiere la natación flagelo mediada tanto para acercarse y moviéndose a través de la superficie. Interacciones organismo-superficiales requieren pili de tipo I y el exterior proteína de membrana Ag43. Por último, la EPS conocido como ácido colánico se requiere para el desarrollo de la biopelícula de *E. coli* arquitectura normal. (C) *V. cholerae*, como *E. coli*, utiliza los flagelos de acercarse y distribuidas en la superficie. Los pili MSHA, y posiblemente una o más proteínas de membrana externa no identificados, son necesarios para unión a la superficie. Esta unión superficial inicial parece estar estabilizada por EPS. La formación de la biopelícula madura, con su asociado en tres dimensiones estructura, también se requiere la producción de EPS. VPS se refiere a los EPS producidos por *V. cholerae*.

Escherichia coli contexto Argentina

Argentina es el país con mayor incidencia de SUH a nivel mundial (13.9/10000 niños menores de 5 años), el principal agente causal es *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) (Rivas et al 2006).

Desde el 30 de mayo de 2012 hasta el 31 de Octubre de 2013 la Unión Europea ha rechazado 38 embarques de carne de bovinos (fresca y refrigerada) de cortes anatómicos de alta calidad (cortes Hilton) exportados desde Argentina por hallazgo de *Escherichia Coli* verotoxigenica, de diferentes establecimientos cárnicos, la información expedida por las autoridades Europeas dice que fue las cepas halladas corresponden a NO O157.

En 2012, entró en vigencia la Norma ISO 13.136:2012 para la detección, aislamiento y caracterización de STEC (O157, O111, O26, O103 y O145). En la introducción de esta metodología microbiológica se define como potencialmente patógenos a todos los serotipos de STEC. El criterio microbiológico en evaluación establecería que ante la detección de los genes *stx* + *eae*, *aggR* y *aaiC*, se debe realizar el aislamiento y la caracterización del microorganismo. Si se identifica un serotipo de *E. coli* (*stx* positivo + *eae*, *aggR* o *aaiC*) asociado con enfermedades severas (colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico) se procede al rechazo del lote.

Actualmente la Argentina se encuentre realizando tareas de estudio para determinar cepas y su grado de riesgo para el consumidor.

Discusión y Conclusión.

Está demostrado que existe una problemática vinculada a la *Escherichia coli* a nivel nacional provocando pérdidas económicas a la industria cárnica Argentina.

Podemos ver que es altamente probable de acuerdo a la literatura científica que la bacteria pueda formar biofilms imposibilitando su remoción.

Hipótesis 2. La industria cárnica posee autocontroles para *Escherichia coli* O157:h7, sin embargo no los realiza para las *e.coli* NO O157;

Generalidades

Existen en la actualidad 193 establecimientos habilitados por SENASA faenadores de carne bovina (grafico 1 RR), y 193 establecimientos elaboradores de hamburguesas y chorizos (productos de alto riesgo) de los mismos 31 plantas de faena exportan con destino Unión Europea.

El total de los establecimientos debe cumplir con la **CIRCULAR 3834/2004** (actualmente en vigencia) donde se establecen medidas de control para la mitigación del riesgo de aparición de *E.Coli* O157:H7 en los alimentos de Origen Animal con carácter preventivo en plantas de faena (*E.coli* genérica), sobre media reses, en recortes, trimming y en carne picada.

En el **año 2004** el Instituto Nacional de Alimentos (INAL) realiza una revisión de la bibliografía y la normativa nacional e internacional sobre la materia, a fin de elaborar recomendaciones, tomando en consideración antecedentes internacionales tales como los del: Codex Alimentarius, USDA/FSIS, ICMSF, FDA, FAO, Unión Europea, Health Canada"s, España, Australia y Nueva

Zelandia, Reino Unido y ANVISA (Brasil) elaboraron la **Resolución Conjunta 79/2004 y 500/2004**, esta incluye la detección de la bacteria *Escherichia Coli* O 157:H7, entre otras, en productos como carne picada y preparados a base de carne picada tales como chacinados frescos embutidos o no embutidos y otras preparaciones a base de carne picada (albóndigas, empanadas, pasteles, arrollados o similares). Incluye el art. 156 tris, sustituye art 255 y 302 del Código Alimentario Argentino el método analítico utilizado es **USDA/FSIS**;

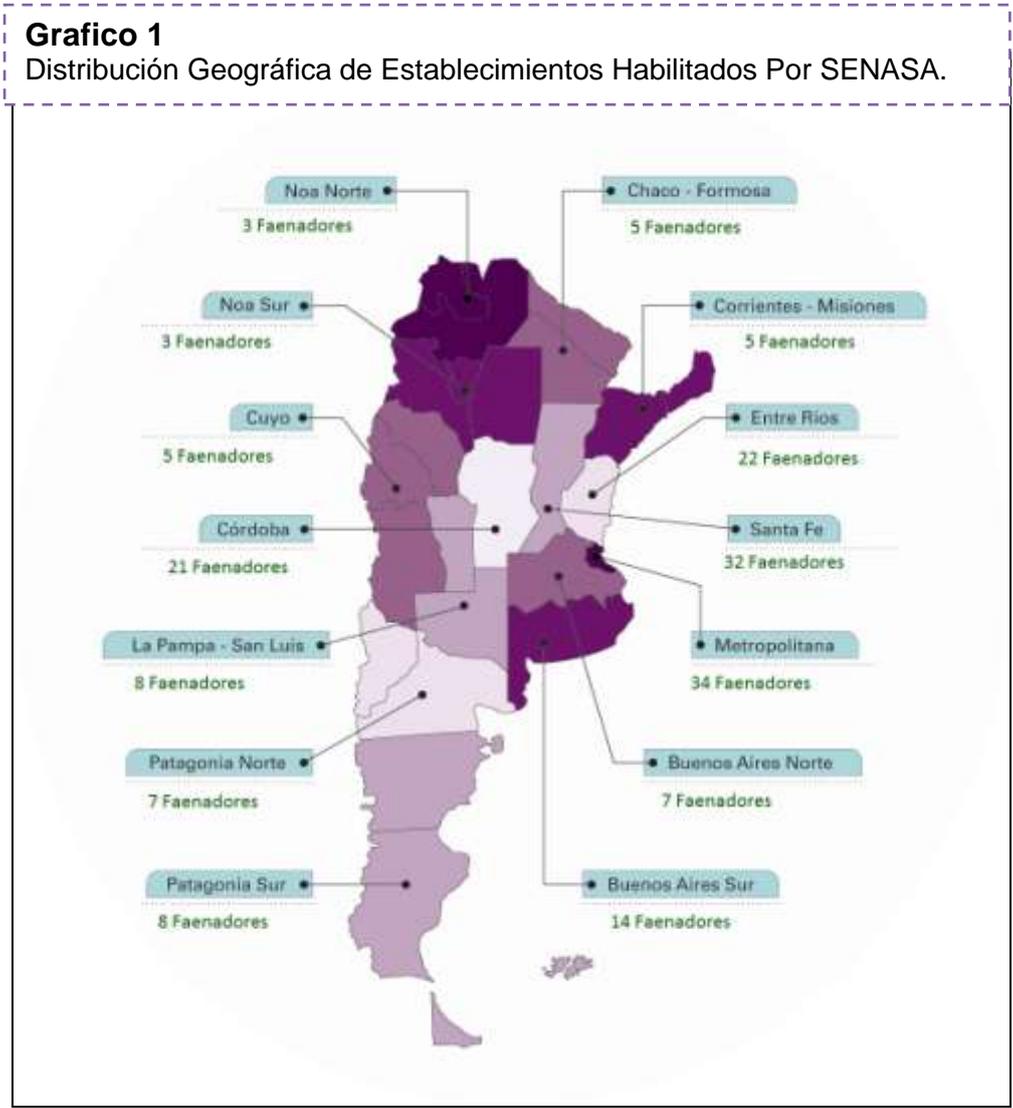


Grafico realizado por RR. Datos extraídos de la Oficina de Estadísticas SENASA. Dic 2013

Sin embargo no existe en la actualidad marco regulatorio para el *E.coli* NO O157. De los 193 Establecimientos habilitados para faena 31 están habilitados a exportar a la Unión Europea.

Encuesta de autocontroles

Se realizó una encuesta sobre los controles de VTEC a todos los establecimientos Faenadores (CICLO1) para conocer el estado de situación, autocontroles y los peligros biológicos que eran contemplados en el mismo, de estos resultados se determinó la necesidad de realizar un monitoreo pormenorizado.

La misma fue realizada en el 2012 luego de los primero 12 rechazos de Europa.

ENCUESTA ANEXO I.
RESULTADOS. ANEXO II

Discusión y Conclusión

En un contexto regional donde existen 31 plantas de faena con habilitación para exportar con destino Unión Europea, solo 9 realizan autocontroles para detectar la presencia de *E.coli* no O157, esto representa solo 9,30% del total, considerando escasos los recursos empleados por la industria para su detección. Así mismo no existe normativa que legisle sobre estos serogrupos específicos.

No obstante las 386 plantas habilitadas a nivel nacional por SENASA hacen controles de *Escherichia coli* O157: h7. El CAA incluye en el art. 156 tris, y art 255 y 302 los métodos microbiológicos para la detección de esta cepa altamente patógena en productos cárnicos.

De acuerdo a lo expresado la segunda hipótesis formulada es **afirmativa**, existe en la actualidad un marco regulatorio para una cepa específica de *E.coli* (O157), sin embargo no hay bases para establecer en los controles la búsqueda y detección de las NO O157, quedando a criterio o a una estrategia comercial la búsqueda y las acciones contra estas bacterias emergentes y consideradas patógenas.

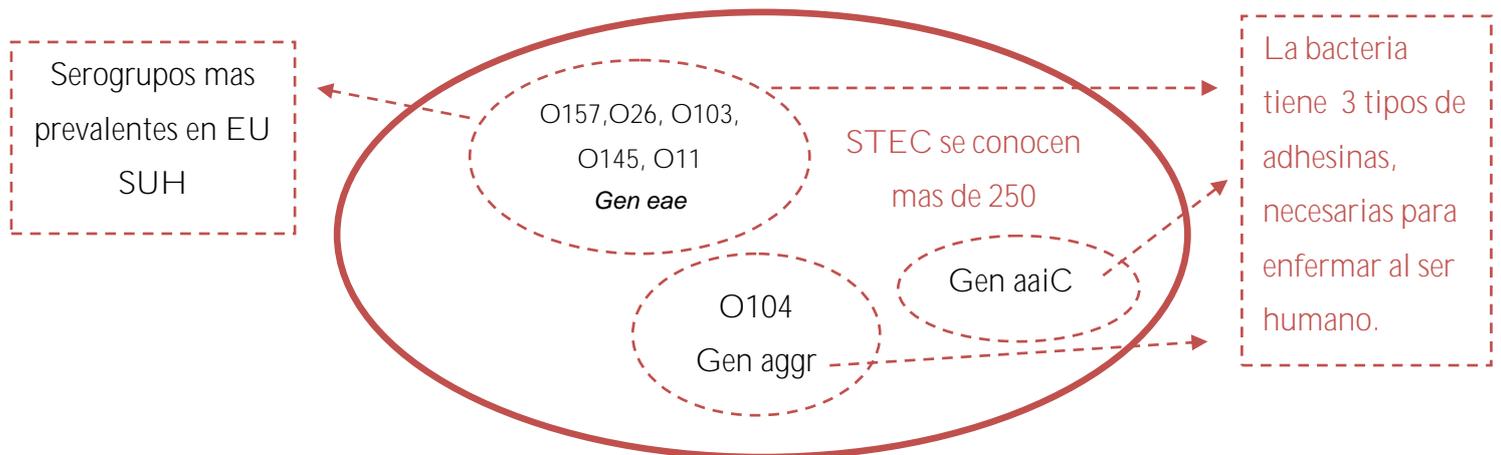
HIPOTESIS 3: El *Escherichia coli* NO O157 es más resistente y tiende a convivir en comunidades bacterianas (biofilms);

1.-Generalidades.

El *Escherichia coli* no O157 pertenece al grupo de *E. coli* verotoxigenicos (VTEC) con capacidad de sintetizar citotoxinas denominadas verocitotoxinas o shiga toxinas (karmali et al 2003), una forma de diferenciar VTEC es mediante la serotipificación, que a menudo es el punto inicial de la caracterización. El serotipo O157:h7 es el mas aislado en casos de SUH, seguido por el O145H, aunque también se han aislado los serotipos O26, O91, O103, O104, O111, O113 entre otros. Debido a que el serotipo no es necesariamente indicativo de la virulencia, estas cepas se pueden clasificar en patotipos según los factores de virulencia que poseen y la enfermedad clínica que producen y alternativamente se pueden agrupar en O157 y no O157. (Nataro J, et al 1998) Los factores de virulencia críticos del VTEC son las verotoxinas VT1 y VT2 que producen muerte celular en los tejidos de los órganos afectados (riñón, intestino, hígado, páncreas y sistema nervioso central). Otros factores de virulencia importante para el VTEC son: una adhesina llamada intimina (codificada por el gen *eae*).

Los genes *vt1* y *vt2* se encuentran codificados en fagos que se insertan en el cromosoma bacteriano, lo que facilitara la transmisión horizontal de la

información a bacterias no patógenas, pudiendo transformarlas en VTEC (Blaser MJ et al 2004).



2. Reservorios animales y vías de transmisión.

La mayoría de los brotes se producen por el consumo de alimentos contaminados, carne mal cocida, vegetales de hoja y agua contaminados, leche no pasteurizada, frutas, salames, mayonesa y yogurt.

En el último tiempo, Fremax y cols (2008) en números estudios reflejan la importancia del medioambiente como fuente de contagio, también en Argentina han corroborado que el bovino es el principal reservorio de VTEC (Padola 2004, Meichtri EC 2004; Mercado EC, Rodriguez SM 2004; Parma 1998).

Se estableció que la prevalencia de VTEC en bovinos de pastoreo de la Pampa húmeda es del 32.8% mientras que en animales de feedlot la prevalencia de VTEC asciende al 63% (Parma, 2004)

3. VTEC en el medio ambiente.

Diferentes estudios de Franz y cols (2007) así como de LeJeune y cols. (2001) presentan datos que confirman la presencia de VTEC no –O157 en el medio ambiente, y su capacidad de adaptación ante condiciones adversas. La supervivencia de Ecoli O157 frente a condiciones de estrés en medios ácidos y diferentes temperaturas ha sido estudiada por muchos investigadores, pero poco se conoce sobre el efecto de estrés en otros serotipos.

4. VTEC en acero inoxidable.

Ryn y Beuchat (2008) han estudiado los efectos del biofilm en el acero inoxidable así como su resistencia al cloro. La contaminación cruzada de los alimentos puede ocurrir en plantas procesadoras de alimentos y durante la posterior manipulación y preparación.

El *E.coli* O157 puede formar biofilm en el acero inoxidable, la *E.coli* es conocida por producir exo polisacáridos que pueden provocar una barrera física (Grant, WD, IW Sutherland, y JF Wilkinson. 1969) protegiendo las células del estrés ambiental, esta estructura actúa como un anteadhesivo afectando la unión de las células en la superficie del acero inoxidable.

El acero inoxidable es moderadamente hidrófilo, el apego y el desapego de los *E.coli* O157 están conectados por la hidrofobicidad, carga superficial y la producción de capsulas (Hassan et al, 2003).

Por otra parte el cloro, se usa como desinfectante para matar patógenos y alterantes microorganismos en los alimentos así como para controlar la formación de biofilm, sin embargo este estudio deja en observancia que el tratamiento con cloro a concentración alta 300ppm no elimina el *Ecoli*, si disminuían rápidamente dentro del minuto, posteriormente se mantenían constante, esto podría indicar que las células situadas mueren inmediatamente como resultado del contacto con el cloro libre, pero las células de abajo sobrevivieron debido al retardo en su difusión.

5. Estrategias de supervivencia: Formación de biofilms no-O157

Ya hemos hablando en el principio del trabajo de la definición y los patógenos capaces de formar biofilms en medios nutricionalmente deficientes (agua, suelo y superficies inertes), a lo cual podemos decir que los biofilms son comunidades bacterianas que viven adheridas a superficies mediante fimbrias y exo polisacáridos producidos por la mismas bacterias, esta comunidad esta posiblemente compuesta por bacterias de diferentes géneros y especies implicando una interacción coordinada de muchas células al unísono siguiendo una serie de etapas definidas y dependientes de las condiciones ambientales.(ver marco teórico).

La fimbria curli junto con la celulosa son los componentes mayoritarios de la matriz extracelular del biofilm. Parma y cols. (2009) hicieron 14 aislamientos VTEC respecto a su fenotipo curli mediante cultivo en placas de Rojo Congo, las muestras fueron tomadas en medioambiente de tambo y mostraron diferentes fenotipos relacionados con el lugar de aislamientos, por ejemplo hisopados de superficies solidas presentaron fenotipo productor de fimbria, mientras que los obtenidos del agua de los bebederos de los animales y del suelo de corrales no la expresaron, aun cuando todos los aislamientos poseían la información genética para hacerlo. Entonces la expresión de determinado fenotipo de fimbria curli estaría determinada por la superficie disponible para adherirse. La baja prevalencia de VTEC en muestras ambientales podría deberse en parte a la capacidad de formar el biofilm.

Con respecto a este estudio realizado por Pharma se utilizaron métodos basado en PCR que pueden detectar específica y sensiblemente *e.coli* O157 y otras VTEC aún en bajas concentraciones.

5. Discusión y conclusiones

De acuerdo a diversos estudios podemos confirmar el ganado bovino como el principal reservorio de VTEC y se han identificado los serotipos más prevalentes. Se ha estudiado el rol de los bebederos y de los suelos de los corrales como vías de transmisión de O157 para los animales, sin embargo el aislamiento de VTEC en los ambientes de producción ha sido muy bajo y no se ha determinado si la infección de los animales se produce por contacto directo (animal-animal) o por compartir un medioambiente contaminado. Los estudios realizados por Parma y cols. Demostraron la capacidad de ciertos serotipos de sobrevivir a condiciones estresantes como PH acido, presencia de ácidos

orgánicos y diferentes temperaturas, por lo tanto las estrategias de supervivencia de VTEC en el medioambiente podrían estar relacionadas a su adaptación a condiciones adecuadas a través de la formación de biofilms, esto podría enmascarar los resultados de las pruebas de laboratorio con el consiguiente riesgo para la salud pública, considerando que Argentina es el país de mayor incidencia de SUH a nivel mundial.

Es necesario seguir dilucidando cuales son los mecanismos por los que VTEC sobrevive en el medioambiente y en los materiales en contacto con alimentos (ejemplo: mesadas de acero inoxidable), fuera de su reservorio natural.

HIPOTESIS 4: La reacción y acción en el nivel industrial no contempla la formación de biofilms como responsables de la contaminación y su control queda reducido a los procesos de higiene.

1. Generalidades

Los biofilms pueden formarse en todo tipo de superficies en la industria alimentaria, incluyendo plástico, cristal, madera, metal, y sobre los alimentos (Chmielewky y Frank, 2003).

Hasta acá hemos demostrado a través de los trabajos científicos que el biofilm puede contener microorganismos patógenos y presentar una mayor resistencia a la desinfección, estos incrementan las probabilidades de contaminar la carne, (objeto de estudio) y provocar infecciones alimentarias, de esta manera podemos decir que el biofilm es un evidente riesgo para la salud.

Es un problema en la industria alimentaria la insuficiente desinfección en las superficies o en los instrumentos en contacto con alimentos por la supervivencia de microorganismos patógenos.

En el caso de la carne, se ha detectado presencia y unión de distintos microorganismos a las superficies cárnicas, especialmente en la de pollo.

La industria alimentaria tiene programas de limpieza y desinfección (POES) que se aplican de manera obligatoria en todos los establecimientos habilitados por SENASA por el Decreto 4238/68 Capitulo XXXI).

2. Rol de la microbiología en la industria alimentaria.

En un establecimiento que procesa alimentos se utilizan los criterios microbiológicos para determinar la aceptabilidad de los alimentos. Asimismo, su empleo está dirigido al desarrollo y verificación para las medidas de control de la higiene. En la industria cárnica hay desarrollo de intervenciones microbiológicas para mejorar la calidad del producto, por ejemplo, la utilización de ácidos orgánicos en la carcasa, es imposible lograr una carne estéril y por eso es favorable que exista una intervención microbiológica sobre las carcasas, mas allá del plan APPCC implementado.

Otro punto a analizar es analizar todo el comportamiento higiénico de la planta. Estos programas deben ser armados con planes de muestreos que sustenten el análisis y le dé un valor estadístico a los resultados.

2.1. Acido láctico al 2%

Estudios de evidencia sólida han demostrado que el ácido láctico reduce el recuento de enterobacterias de origen natural en carne y carcasas en un grado variable. Las reducciones son en general significativas en comparación con las carnes no tratadas. Según el estudio que se realizó en un establecimiento argentino habilitado el ácido láctico reduce la prevalencia de *Escherichia coli* verotoxigenica en carcasas.

Con respecto a la seguridad toxicológica para las personas, el dictamen de la EFSA concluye que los tratamientos permitidos (2% a 5% p/p a temperatura de hasta 55° aplicadas en pulverización o nebulización), no suponen ningún problema de seguridad.

Sobre el riesgo ambiental, el sistema científico señala que la concentración de ácido láctico en el punto de entrada al sistema de tratamientos de aguas residuales se puede considerar insignificante, y no se considera necesario realizar evaluación de riesgo ambiental (EFSA 2013)

2.1.2 Validaciones en establecimiento argentino exportador.

Este estudio se realizó en un establecimiento que tuvo rechazos en puertos fronterizos UE de la Provincia de Córdoba.

¹⁸Se aplica al 2% a temperatura ambiente (20° a 25°) con una campana pulverizadora que da un efecto neblina.

Picos pulverizadores.



Se realiza en dos fases luego de la división de la res y al pasar la media a despostada.

Para este estudio se tomaron muestras en tres puntos sobre la media una con tratamiento y sobre otra media sin tratamiento de ácido láctico, para efectuar la validación del método.

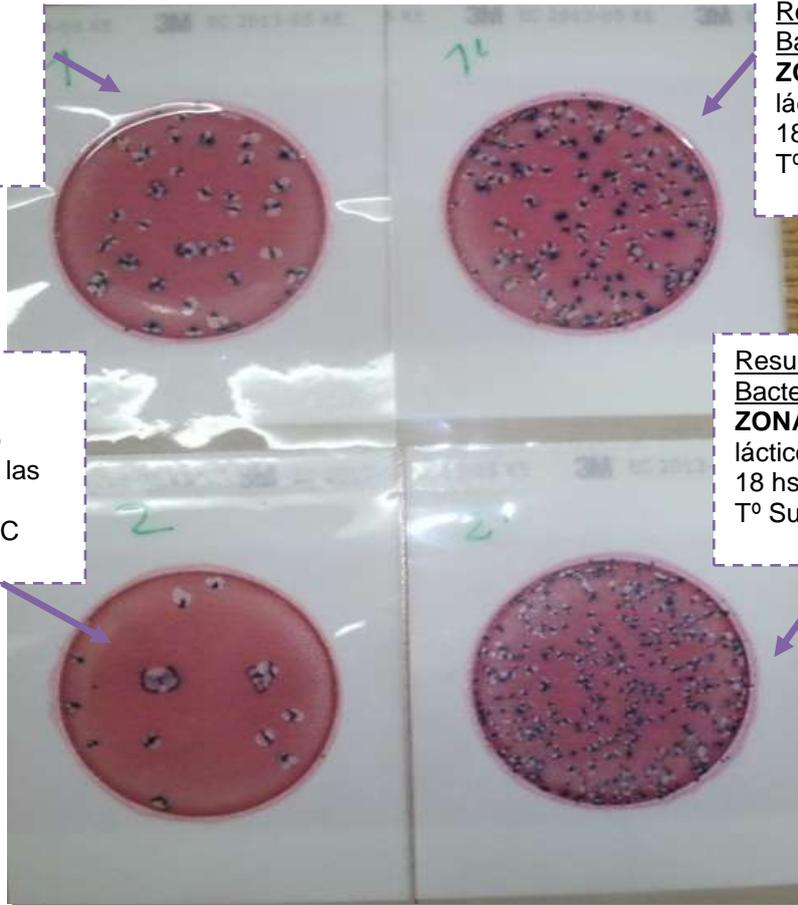
¹⁸ Fotografías R. Roller 2013

Resultado Bacteriológico
ZONA 1 (con ácido láctico) Muestreo a las 18 hs de faena
T° Superficial 8.5 ° C

Resultado Bacteriológico
ZONA 1 (Sin ácido láctico) Muestreo a las 18 hs de faena
T° Superficial 8.7 ° C

Resultado Bacteriológico
ZONA 2 (con ácido láctico) Muestreo a las 18 hs de faena
T° Superficial 6.3 ° C

Resultado Bacteriológico
ZONA 2 (Sin ácido láctico) Muestreo a las 18 hs de faena
T° Superficial 7.5 ° C



Zona 1
(aspersión con
Acido Láctico.

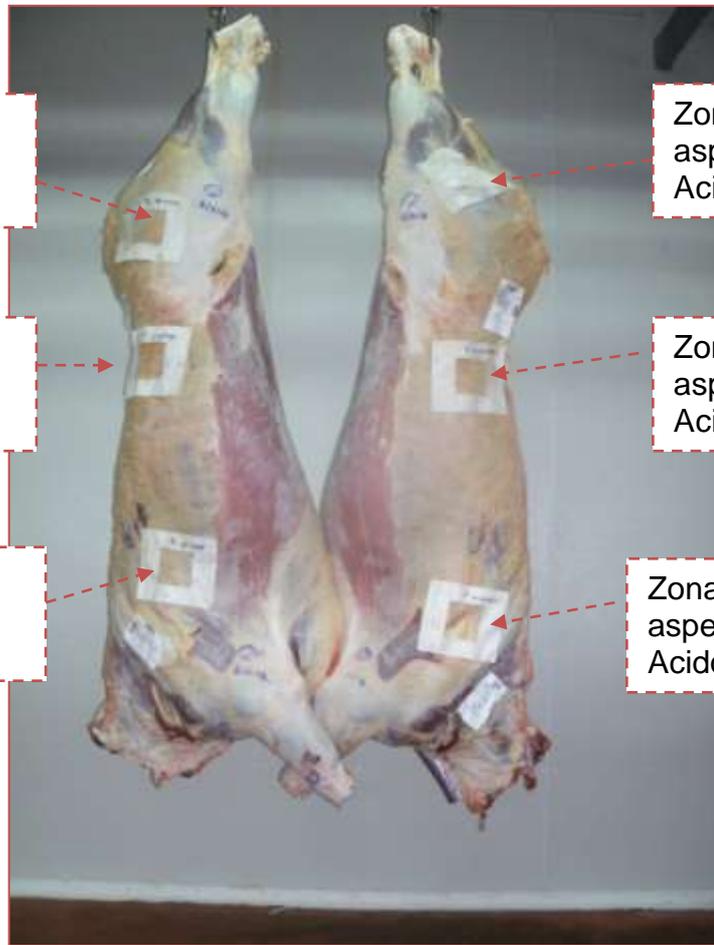
Zona 1 (Sin
aspersión con
Acido Láctico.

Zona 2
(aspersión con
Acido Láctico.

Zona 2 (Sin
aspersión con
Acido Láctico.

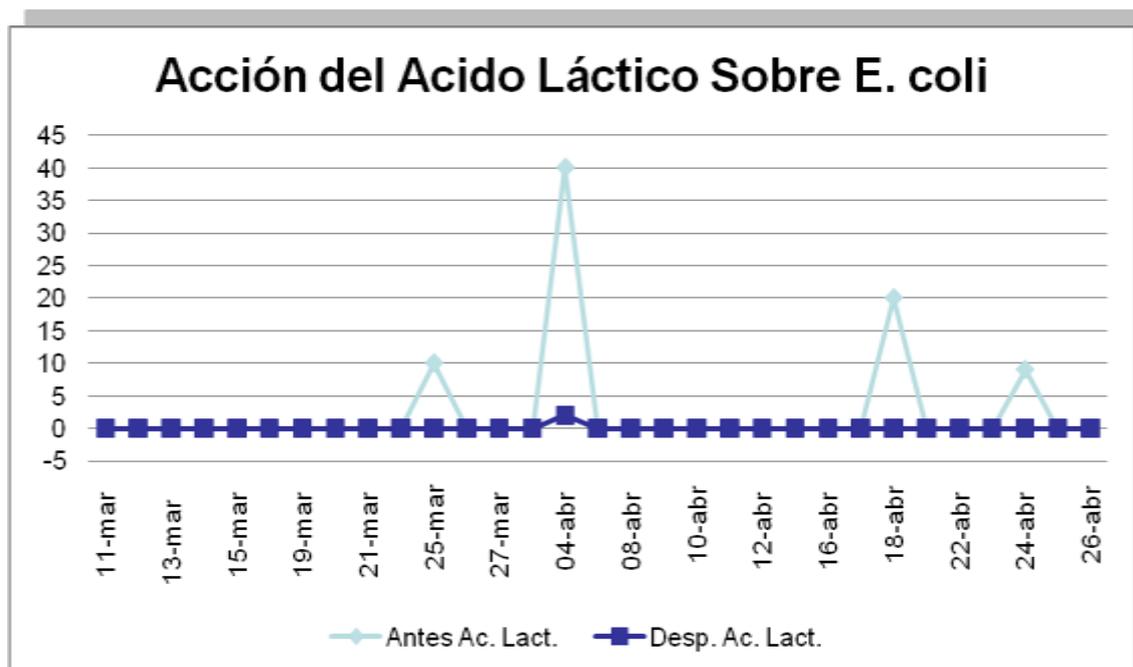
Zona 3
(aspersión con
Acido Láctico.

Zona 3 (Sin
aspersión con
Acido Láctico.



Resultados:

Muestra 1 (Aspersión con ácido Láctico al 2%) 18hs de Maduración. T° Superficial 8.5°C 3.2 cm ²	Muestra 1` (Sin aspersión con ácido Láctico.) 18hs de Maduración. T° Superficial 8.7°C 31 cm ²	Reducción Bacteriológica expresada en log₁₀ 3 log.
Muestra 2 (Aspersión con ácido Láctico al 2%) 18hs de Maduración. T° Superficial 6.3°C 1.2 cm ²	Muestra 2` (Sin aspersión con ácido Láctico.) 18hs de Maduración. T° Superficial 7.5°C 32 cm ²	Reducción Bacteriológica expresada en log 3 log.
Muestra 3 (Aspersión con ácido Láctico al 4%) 72hs de Maduración. T° Superficial 3.4°C 0.6 cm ²	Muestra 3` (Sin aspersión con ácido Láctico.) 72hs de Maduración. T° Superficial 3.6°C 1.1 cm ²	Reducción Bacteriológica expresada en log₁₀ 1 log.



19

2.1.3 Conclusiones de la aplicación de Acido láctico.

- ✓ La aplicación de Acido Láctico a una concentración del 2% , en una solución en agua preparada a temperatura ambiente (20°C a 25 °C) logra disminuir la contaminación fecal medida con los indicadores Coliformes / *E. coli* genérica entre dos y tres ciclos logarítmicos, inclusive se puede observar claramente esta disminución en las zonas 1 y 2 con mayor carga contaminante.

- ✓ La aplicación del ácido láctico al 2% se puede extender a otras operaciones puntuales como el rociado luego de la operación de atado de culata para lograr reducciones de carga bacteriana
- ✓ Se utiliza ácido láctico para la desinfección de guantes, utensilios y mesas de operadores para asegurar que la carga bacteriana se mantenga controlada, y evitar contaminaciones cruzadas

3. Intervenciones Físicas específicas de la Industria Cárnica.

3.1 Steam vacuum sobre cueros en reses.

Este sistema utiliza agua caliente, vapor de agua y vacío para descontaminar áreas específicas de la carcasa (García B. 2006). Es frecuente la existencia de manchas de restos fecales en la carcasa, estas deben eliminarse por un corte superficial con un cuchillo o de manera mecánica con la técnica del steam vaccuming, en este caso el agua a 82° a 85° produce una agitación de la superficie tratada removiendo e inactivando las bacterias, el vapor limpia y desinfecta de modo continuo el aparato de mano utilizado y aumenta la temperatura del agua mientras que el vacío elimina el agua residual y las suciedades contaminantes.



Luego de la aplicación puede notarse en una inspección visual, una reducción importante de suciedad.

No se utiliza de modo permanente por lo tanto no se considera un PCC, sin embargo el establecimiento en cuestión lo utiliza en el 100% de la producción, llegando a resultados satisfactorios en la reducción de la carga bacteriana.

Se realizó una validación de la reducción, se realizaron recuentos de *Coliformes* Totales y *E. coli* ufc/cm², sobre el cuero, antes y después de la aplicación del Steam Vacuum . (Cuadro 1)

Cuadro 1

Fecha de toma de muestra	Antes del Steam Vacuum		Después del Steam Vacuum	
	Coliformes	Escherichia Coli	Coliformes	Escherichia Coli
20-mar	120	120	6	0
21-mar	MNPC	MNPC	8	8
22-mar	100	100	4	3
25-mar	200	190	11	9
26-mar	180	180	8	8
03-abr	MNPC	MNPC	8	7
04-abr	190	160	9	7
05-abr	160	160	8	8
08-abr	140	130	7	6
09-abr	MNPC	MNPC	12	11
10-abr	170	160	9	7
11-abr	170	170	8	8
12-abr	190	190	9	8

Imagen de placa de Petri, antes y después del steam vacuum sobre cuero.



Se tomaron muestras ano/pecho, y capadura/peceto, antes y después de la aplicación del Steam vaccum, sobre dos cueros seleccionados al azar en una superficie de 100 cm³

Muestra	ufc/cm ² Coliformes totales		Reduccion	ufc/cm ² Enterobacterias		Reduccion
	Antes de vapor	Después de Vapor		Antes de vapor	Después de Vapor	
Zona Ano	1400	10	99,3%	1400	16	98,80%
Zona Pecho	100	11	89%	160	31	80,6

Muestra	ufc/cm ² Coliformes totales		Reduccion	ufc/cm ² Enterobacterias		Reduccion
	Antes de vacio/Vapor	Después de Vacio/Vapor		Antes de vacio/Vapor	Después de Vacio/vapor	
Zona Capadura	61	<2	100%	140	<2	100%
Zona Peceto	60	<2	100%	80	<2	100%

3.1.2 Conclusiones sobre la aplicación de steam vaccum en cueros.

- ✓ Los equipos steam vaccum lograron disminuir la contaminación fecal medida con los indicadores Coliformes / *E. coli* genérica como mínimo dos ciclos logarítmicos, haciendo contables también en varios casos las colonias de placas que previo al steam vaccum, eran incontables.
- ✓ Las BPM en la playa de faena son el pilar fundamental, siendo las operaciones de limpieza de las medias con equipos steam vaccum un complemento necesario, favorable, adecuado y efectivo para la higiene y sanidad del producto

3.2 Steam Vacuum en medias reses y cuartos.



DISCUSION Y CONCLUSIONES

Argentina es un país de reconocida trayectoria exportadora de carne bovina al mundo sin embargo desde 30 de mayo de 2012 hasta el 31 de Octubre de 2013 la Unión Europea ha rechazado 38 embarques de carne de bovinos

(fresca y refrigerada) de cortes anatómicos de alta calidad, exportados desde Argentina por hallazgo de ***Escherichia Coli*** verotoxigenica.

Numerosos estudios confirman que el bovino es el principal reservorio de *Escherichia coli*.

Nuestra población tiene un consumo de carne en su dieta del 77% (IPCVA).

Del análisis realizado en este trabajo, podemos decir que existen acciones en una determinada población de establecimientos cárnicos. En un nivel nacional hay controles de Microorganismos patógenos estipulados por el Código Alimentario Argentino.

Los Establecimientos exportadores con plan APPCC (Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control) tienen en su análisis de peligros contemplados a *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp*, *Pseudomonas spp*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus spp*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* de manera planctónicas pero en la evaluación de riesgo no se contempla la posibilidad de que las mismas se relacionen formando comunidades y adhiriéndose a estructuras, superficies, otros organismos o sobre el alimento.

Toda la cadena de cárnica (producción, transporte de materias primas, procesado, almacenamiento y distribución) tienen diversos aspectos relacionados con el **desarrollo de biofilms** (Veran J y cols,2006), el principal problema sanitario es que al resistir a muchos tratamientos de limpieza y desinfección convencionales, los microorganismos alojados pueden hacerse persistentes en la planta y comportarse como reservorios de patógenos, que en algún momento pueden transferirse al alimento, antes, durante o después del procesado.

Sabiendo que la formación del biofilm no es un proceso aleatorio sino que sigue una sistemática que permite su predicción (ver Marco teórico: fases), gracias a la tecnología hoy podemos conocer su morfología, pero no su saneamiento, por lo tanto se tiene que hablar de un enfoque preventivo no permitiendo que pasen de la etapa de unión reversible. Planes de Saneamiento preventivos previos pueden convertirse en una estrategia de eliminación, dando efectividad al plan.

Aunque se identificaron importantes fuentes de incertidumbre que deberían ser reducidas en futuros trabajos de investigación, el presente trabajo puede ser empleado en evaluaciones cuantitativas de riesgo del tipo “de la granja a la mesa” para reflejar todas las fuentes de transmisión de patógenos al humano.

AGRADECIMIENTOS

La realización y el tema de este trabajo fue inspirado por el Dr. Carlos Vicari (SENASA) que me supo transferir la importancia del Biofilm en la industria cárnica, por su paciencia y tiempo dispensado y su dedicación ejemplar.

Al Dr. German Suberbie (SENASA) que me transfirió la problemática del *Escherichia coli*, haciendo de ella mi “live motive” académica y no dejando que

la investigación se transforme en un merito personal si no un eslabón mas de un objetivo de todos: La Salud Publica.

A mi Tutor Dr. Horacio Sanz que la validó con su interés.

Bibliografía

- Instituto de Agrobiotecnología y Recursos Naturales y Departamento de Producción Agraria. Universidad Pública de Navarra. **Íñigo Lasa Uzcudun**. http://www.semicrobiologia.org/pdf/actualidad/SEM37_14.pdf
- **Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P.** (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.
- **Mah, T.F., and O'Toole, G.A.** (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9: 34-39
- O'Toole, G.A., and Kolter, R. (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 28: 449-461.
- Biofilm un enemigo poco evidente. Laboratorios Rocha Uruguay <http://laboratoriosmidet.com/perosurf.pdf>
- FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS POR “ESCHERICHIA COLI” Y SU CORRELACIÓN CON FACTORES DE VIRULENCIA: PREVENCIÓN Y ACTIVIDAD DE ANTIMICROBIANOS FRENTE A ORGANISMOS PLANCTÓNICOS Y ASOCIADOS A BIOPELÍCULAS.
- **Rodney M. Donlan**, Biofilm Laboratory, Division of Healthcare Quality Promotion, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Mailstop C16, 1600 Clifton Road, N.E., Atlanta, GA 30333, USA; fax: 404-639-3822;
- **Karmali M**, Mascarenhas M; Shen S, et al Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J. Clin. Microbiol.* 200;41:4930-40.
- **Ryu, J.H. y Beuchat, L.R.** (2005). Biofilm Formation by *Escherichia coli* O157:H7 on Stainless Steel: Effect of Exopolysaccharide and Curli Production on Its Resistance to Chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, 7, pp:247-254.
- **Grant, WD, IW Sutherland, y JF Wilkinson.** 1969. Exopolisacárido ácido colánico y su ocurrencia en *las enterobacterias*. *J. Bacteriol* 100:1187 -1193.
- **Hassan, AN, y JF Frank.** 2003. Influencia de la hidrofobicidad de agente tensoactivo sobre el desprendimiento de *Escherichia coli* O157: H7 de la lechuga Int. . *J. Food Microbiol* **87**: 145 -152. **CrossRef Medline**
- **Ministerio de Salud de la Nación.** Código Alimentario Argentino actualizado. Ley 18.284. *On line*: <http://www.anmat.gov.ar/CODIGO/CAA1.HTM>.
- **Parma AE, Sanz ME, Blanco JE, Blanco J, Viñas MR, Blanco M, Padola NL, Etcheverría AI.** 2000. Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. *Eur J Epidemiol* 16: 757–762.
- **Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Deza N, Leotta GA.** 2006. Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión. *Medicina* (Buenos Aires), 66 (Supl.III): 27–32.
- Microbial Contamination after Sanitation of Food Contact Surfaces in Dairy and Meat Processing Plants Jarmila Schlegelová, Vladimir BaBák Martina HolaSoVá, Lucie KoNStaNtiNoVá. <file:///H:/Facultad/Tesina/65-2009%20Jaglic.pdf>

- **Verran J, P Airey, Packer A, Whitehead KA.** 2008. Retención microbiana en las superficies e implicaciones para la contaminación de los alimentos en contacto con alimentos abiertos. *Adv Appl Microbiol.* 64: Capítulo 8, 223-246.
- **Chinen I., Otero JL, Miliwebsky E, Roldán ML, Chillemi GM, Baschkier A,** et al. (2003) Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from calves in Argentina. *Res. Vet. Sci.* 74: 283-286
- **Karmali MA, Petric M, Lim C, Cheung R, Arbus GS** (1985) Sensitive method for detecting low numbers of Verotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of Verotoxin. *J. Clin. Microbiol.* 22: 614-619.
- **Rivas M, Sosa-Estani S, Rangel J, Caletti MG, Valles P, Mead P, et al. (2003)** Risk factor associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection, Argentina. A case control study. 5th International Symposium and Workshop on "Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infections". Edinburgh, UK.
- **Wells JG, Shipman LD, Greene KD, Sowers EG, Green JH, Cameron DN,** et al. (1991) Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *J. Clin. Microbiol.* 29: 985-989.
- World Health Organization (1998) Zoonotic Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC), World Health Organization, Department of Communicable Disease Surveillance and Response WHO/CSR/APH/98.8. Berlin, German
- **Weiner, R., S. Langille y E. Quintero.** 1995 . Estructura, función e inmunológica del exopolisacáridos bacterianos. *J. . Ind. Microbiol* **15** :339 - 346
- **Vidal, O., R. Longin, C. Prigent-Combaret, C. Dorel, M. Hooreman y. P. Lejeune** 1998 . Aislamiento de un *Escherichia coli* K-12 cepa mutante capaz de formar biopelículas sobre superficies inertes: la participación de una nueva *ompR* . alelo que aumenta la expresión de curli *J.Bacteriol.* **180** : 2442 - 2449.
- **Stewart, PS, J. Rayner, F. Roe y WM Rees.** 2001 . La penetración de biopelículas y eficacia de la desinfección de hipoclorito alcalino y chlorosulfamates. *J. Appl. . Microbiol* **91** : 525 -532.
- **Ryu, J.-H., H. Kim, y LR Beuchat.** 2004 . El apego y la formación de biopelículas por *Escherichia coli* O157: H7 en el acero inoxidable como la influencia de la producción de exopolisacáridos, disponibilidad de nutrientes, y la temperatura de *J. Food Prot.* **67** : 2123 -2131.
- **Olsen, A., A. Arnqvist, M. Hammar, y S. Normark.** 1993 . La regulación ambiental de la producción curli en *Escherichia coli* . *Infect. . Agentes Dis* **2** : 272 -274.
- **Kusumaningrum, HD, G. Riboldi, WC Hazeleger y RR Beumer.** 2003 . La supervivencia de los agentes patógenos transmitidos por los alimentos en superficies de acero inoxidable y la contaminación cruzada de los alimentos. *Int. . J. Food Microbiol* **85** : 227 -236.

ANEXO I modelo de encuesta realizada.

Relevamiento de establecimientos habilitados por SENASA relacionado a los autocontroles de *Escherichia coli* verotoxigénico (VTEC/STEC) no-O157

Establecimiento N°:

- 1- ¿El establecimiento se encuentra efectuando análisis de autocontrol de VTEC/STEC no-O157 en productos cárnicos?
(Colocar una cruz donde corresponda)

SI

NO

Si la respuesta es afirmativa, indique los años en que se realizaron tales autocontroles de VTEC/STEC no-O157 en productos cárnicos, y si los mismos fueron realizados en el laboratorio propio de la planta o en un laboratorio externo.
(Colocar una cruz donde corresponda)

2012

2011

2010

2009

Laboratorio propio

Laboratorio externo

- 2-¿Sobre qué tipo de productos efectúa los controles analíticos de VTEC/STEC no-O157?
(Hacer un círculo en la letra que corresponda al/los producto/s analizado/s)

- a- Carcasas bovinas
- b- Carne picada
- c- Carne mecánicamente separada
- d- Cortes bovinos
- e- Otros (aclarar cuál/es a continuación)

3-¿Cuál es la frecuencia de la toma de muestra por tipo de producto, la cantidad de unidades colectadas por cada muestra y el volumen de cada una de las unidades?

4-¿Cuál es el número de muestras analizadas para detección de VTEC/STEC no-O157, en cada tipo de producto (de acuerdo a lo respondido en 2)?

5-¿Cuál es la técnica analítica utilizada para la detección de VTEC/STEC no-O157?
(Hacer un círculo en la letra que corresponda al/los métodos/s utilizado/s)

- a- PCR convencional
- b- RT-PCR (PCR en Tiempo Real). Si utiliza RT-PCR: cuál es el equipo utilizado?
(Indicar marca y modelo)
- c- Métodos inmunoquímicos, (aclarar cuál/es a continuación)
- d- Cultivo tradicional
- e- Otros (aclarar cuál/es a continuación)

6- ¿Cuál es el criterio aplicado para considerar que una muestra analizada es positiva para VTEC/STEC no-O157? (Por favor, describir: si analiza las muestras por PCR o RT-PCR, considera la muestra positiva cuando hay detección de gen/es *stx*, o cuando hay detección de genes *stx* y *eae*, o cuando detecta un serogrupo específico. Indicar también si procede al aislamiento de la cepa de VTEC/STEC no-O157)

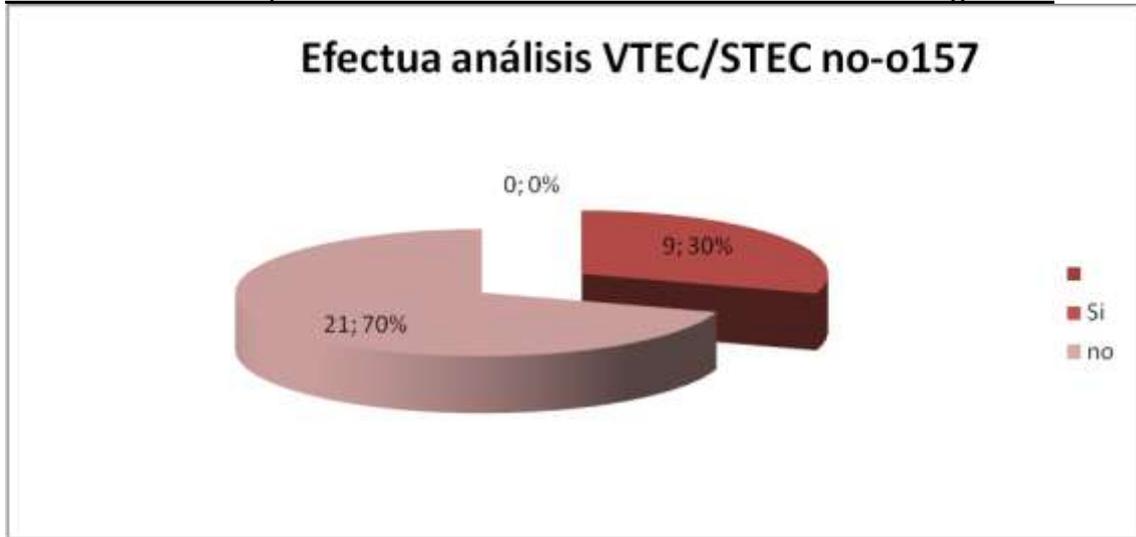
7-¿Cuál es el porcentaje de resultados positivos obtenidos (de acuerdo al criterio aplicado y descrito en 5) en cada tipo de producto analizado (de acuerdo con la respuesta a 2), y si utilizara más de una técnica de detección, con cada técnica utilizada?

ANEXO II

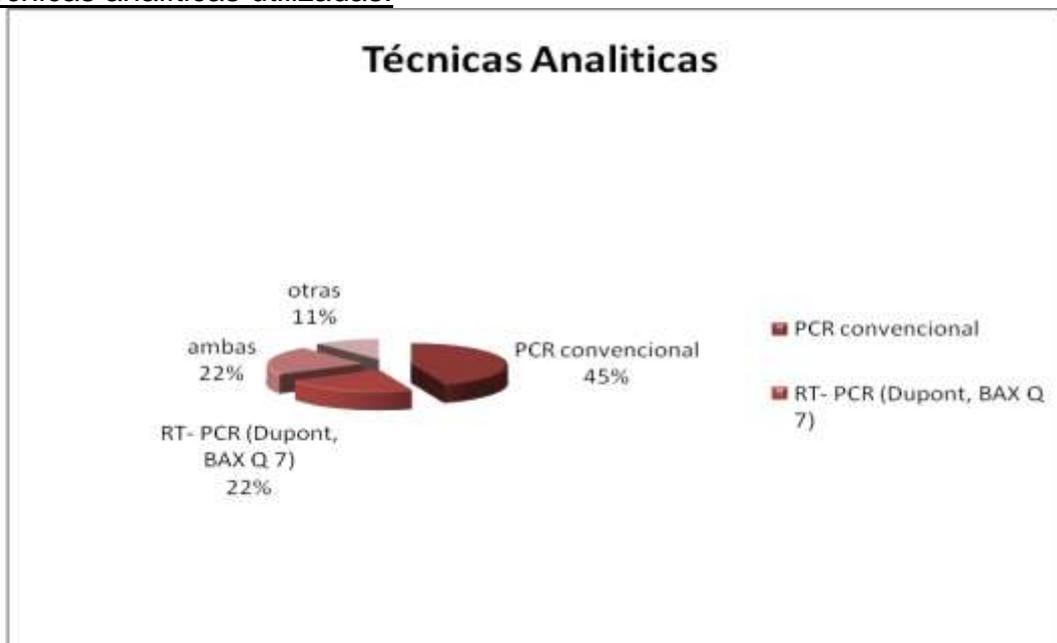
Relevamiento de Establecimientos habilitados por SENASA relacionado a los autocontroles de *Escherichia coli* verotoxigénico (VTEC/STEC) no-0157
Se realiza sobre 31 plantas ciclo I

Gráficos

Establecimientos que efectúan análisis de *Escherichia coli* verotoxigenica.



Técnicas analíticas utilizadas.



Establecimientos que tienen laboratorios propios para realizar autocontroles

