

**VERIFICACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DEL PROGRAMA DE
LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN EN ESTABLECIMIENTOS DE VENTA
AL DETALLE Y DELICATESSEN REALIZANDO PRUEBAS
MICROBIOLÓGICAS Y DE BIOLUMINISCENCIA DE ATP**

Por

Lisandy González Soto

Tesis sometida en el cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

en

CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2008

Aprobado por:

Lynette E. Orellana, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

José R. Latorre, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Edna Negrón, Ph.D.
Presidenta, Comité Graduado

Fecha

Teodoro Ruiz, Ph.D.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Edna Negrón, Ph.D.
Coordinadora del Programa CITA

Fecha

ABSTRACT

Effectiveness of the cleaning and sanitation procedures was verified in seven supermarkets and five bakeries in Mayagüez, Rincón and Hormigueros towns. Microbiological tests performed included aerobic plate count (APC), coliform's total count, *Escherichia coli*, and ATP Bioluminescence (non-microbiological) tests. Samples were taken from food contact surfaces (slicer and its table) and non-contact surfaces (environmental samples) from the refrigerator's door handle and the floor drainage in two time periods: before starting operations in the morning (AO) and after four hours of operations (DO). The statistical analysis results from the T test showed that there were no significant differences ($P \leq 0.05$) AO and DO in the direct contact and non-contact surfaces in supermarkets and bakeries for the microbiological analysis. In general, APC values demonstrated that the establishments did not meet with the standards for the studied surfaces. In the coliform test, *Escherichia coli* was found in 2 of 96 collected samples that infers that the personnel that works in these establishments complies with the personal good hygiene practices like washing their hands constantly. The application of ATP bioluminescence needs further studies in order to validate its usefulness as a verification tool for cleaning and sanitation by inspectors, supervisors and/or managers. No relationship was found between colony forming units (CFU) and relative light units (RLU). The study demonstrated the need to develop and implement standard sanitary operating procedures (SSOP's) and monitoring and verification procedures at retail and deli establishments.

RESUMEN

Se verificó la efectividad de los procedimientos de limpieza y desinfección en siete supermercados y cinco panaderías de los pueblos de Mayagüez, Rincón y Hormigueros. Se efectuaron pruebas microbiológicas que incluyeron un contaje total aeróbico (por sus siglas en inglés APC), recuentos de coliformes totales, *Escherichia coli* y pruebas de bioluminiscencia de ATP (prueba no microbiológica). Se muestrearon superficies de contacto directo con los alimentos (rebanadora y su mesa) y de no contacto (muestras ambientales) tomadas del mango de la puerta de la nevera y el drenaje a dos intervalos de tiempo: antes de comenzar operaciones en la mañana (AO) y después de cuatro horas de trabajo (DO). Los resultados obtenidos del análisis estadístico de prueba T mostraron que no existe diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre AO y DO en las superficies de contacto directo e indirecto de supermercados y panaderías para los análisis bacteriológicos. En general los valores para APC demostraron que los establecimientos no cumplían con los estándares para las superficies estudiadas. En la prueba de coliformes, *Escherichia coli* sólo se encontró en 2 de las 96 muestras realizadas por lo que se podría inferir que el personal de estos establecimientos cumple con las prácticas higiénicas personales tales como el lavado de manos. La prueba de bioluminiscencia de ATP requiere de más estudio para poder determinar su utilidad como herramienta para verificar la limpieza y desinfección por el personal cargo, inspectores y/o gerentes. No se pudo establecer una relación entre las unidades formadoras de colonia (CFU) y unidades relativas de luz (RLU). Los resultados demuestran la necesidad de desarrollar e implementar procedimientos operacionales estándares sanitarios y procedimientos de monitoreo y verificación en establecimientos de venta al detalle y delicatessen.

Derechos de Autor Reservados©
Lisandy González Soto

2008

DEDICATORIA

A ti mi Dios Todo Poderoso por darme la fuerza para realizar este trabajo. Si he llegado hasta aquí es gracias al aliento de vida, inspiración y fortaleza que me has brindado. A mi compañero de siempre y de lucha del día a día, mi esposo. ¡Gracias por estar siempre a mi lado! A la estrella que un día inesperado empezó a brillar en nuestras vidas para iluminarnos el resto de la existencia, nuestro hijo Ian Jexiel Miranda González.

A mis padres que siempre con todo su **AMOR** hacen que las cosas sean cada día mejor. Lo que soy hoy es gracias a ustedes. A mis hermanas por todo su apoyo. A ellos gracias por brindarme todo su amor y comprensión. Sin su ayuda no lo hubiese logrado.

Para todos ustedes éste es mi regalo.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a los miembros de mi comité graduado por su interés en formar parte de este equipo de trabajo. Gracias Dr. José R. Latorre por ser parte del mismo. A la Dra. Lynette E. Orellana por aportar sus conocimientos en la parte práctica y por su orientación en el desarrollo de este proyecto. En especial, le ofrezco mil GRACIAS a la Dra. Edna Negrón por confiar en mí y aceptarme a ser parte de este proyecto, por siempre estar ahí especialmente en mis dificultades. Por enseñar a sus estudiantes que la universidad no solo es cuestión de notas y promedios, sino de forjar líderes como parte de ese profesional completo. Gracias por su cooperación, guía y enseñanzas durante todo este tiempo.

Al Programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) del Recinto Universitario de Mayagüez de la Universidad de Puerto Rico por aceptarme a ser parte de su grupo de estudiantes graduados, por prestarme sus instalaciones, equipos y ayuda. A sus empleados la Sra. Ivette Vissepó (Bessie) y al Sr. Miguel A. Ruperto (Don Rupert) por su disponibilidad y apoyo cuando más los necesité. Don Rupert le agradezco su ayuda técnica, sus consejos, por ser mi paño de lágrimas en esos momentos de dificultad. **Nunca lo olvidaré.** En especial a mis grandes amigos de CITA. A la Prof. María de L. Plaza gracias por ser una gran amiga.

Extiendo mi agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna manera lograron que este proyecto fuera realidad. Una de ellas el Agro. Jorge Santiago por su ayuda en cada uno de los muestreos. Quiero agradecer al Dr. Ernesto O. Riquelme por su ayuda brindada en el análisis estadístico de la tesis. Los supermercados y panaderías de los pueblos de Mayagüez, Rincón, Hormigueros y a sus empleados por abrirme las puertas para la realización de esta investigación. Por último, al Programa de Salud Ambiental del

Departamento de Salud, a la Sra. Rita M. Goytia (Directora de la División de Higiene de Alimentos), al Director Regional de Mayagüez, Sr. Edyins Rodríguez y a la inspectora Evelyn Bosque por su colaboración en la realización de las visitas durante la etapa experimental.

Muy en especial quiero agradecer al Servicio de Inocuidad en Inspección de los Alimentos (por sus siglas en inglés FSIS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos por brindar los fondos necesarios para llevar a cabo esta investigación (**FSIS Project Number FSIS-C-16-2005**). Sin su apoyo económico no hubiera sido posible este proyecto.

A todos mis amigos y amigas: Lizbeth, Samara y Arnaldo. Porque le dan a la palabra amistad un significado diferente y especial. Ustedes forman parte de esa alegría especial de la vida.

No puedo dejar de dar gracias, especialmente a mi familia porque siempre han creído en mí. A mis padres por sus oraciones y apoyo incondicional. A mi madre Josefina Soto por alentarme a no desvanecer y a seguir luchando contra viento y marea. A mi padre Anderson González por estar a lo largo de este camino. A ustedes por ser la luz y mi motivación para realizar esta etapa en mi vida. A mis hermanas Johany y Joyliz por estar junto a mí. A mi esposo por su paciencia y ánimos para realizar mis sueños y mis metas. Porque mis sacrificios fueron los tuyos. Por ofrecerme mí más preciado regalo de vida e inspiración, nuestro hijo Ian Jexiel. ¡Te Amo!

Finalmente e igual de importante agradezco a Dios y a la Virgen María quienes han sido mi soporte, mi compañía durante día y noche y por permitirme gozar de buena salud para completar esta investigación. ¡Gracias por todas las cositas lindas que han llegado a mi vida y por todas sus bendiciones!

¡A todos infinitas gracias!

TABLA DE CONTENIDO

Abstract	ii
Resumen	iii
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Tabla de Contenido	viii
Lista de Tablas	x
Lista de Gráficas	xii
Lista de Figuras	xiii
Lista de Apéndices	xiv
Introducción	1
Revisión de Literatura	5
Materiales y Métodos	14
Recolección de las Muestras	14
Procesamiento de las Muestras	17
Análisis Bacteriológicos	17
Determinación de Recuento Total Aeróbico (APC)	17
Determinación de Coliformes Totales y <i>Escherichia coli</i>	19
Pruebas de Bioluminiscencia de ATP	20
Análisis Estadístico	21
Resultados y Discusión	22
Conclusiones	44

Recomendaciones	45
Bibliografía	46
Apéndice	51

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Enfermedades entéricas de notificación obligatoria en Puerto Rico reportadas a la División de Epidemiología, Años 2004-2006 (Departamento de Salud de Puerto Rico).	3
Tabla 2. Recuento de bacterias aeróbicas en la rebanadora y la mesa (superficies de contacto directo) de los supermercados antes de operaciones (AO) y después de operaciones (DO).	25
Tabla 3. Recuento de bacterias aeróbicas en la rebanadora y la mesa (superficies de contacto directo) de las panaderías antes de operaciones (AO) y después de operaciones (DO).	25
Tabla 4. Recuento de bacterias aeróbicas en el mango de la puerta de la nevera y el drenaje (superficies de contacto indirecto) de los supermercados antes de operaciones (AO) y después de operaciones (DO).	26
Tabla 5. Recuento de bacterias aeróbicas en el mango de la puerta de la nevera y el drenaje (superficies de contacto indirecto) de las panaderías antes de operaciones (AO) y después de operaciones (DO).	26
Tabla 6. Densidad de coliformes totales en la rebanadora y la mesa (superficies de contacto directo) de los supermercados antes de operaciones (AO) y después de operaciones (DO).	33
Tabla 7. Densidad de coliformes totales en la rebanadora y la mesa (superficies de contacto directo) de las panaderías antes de operaciones (AO) y después de operaciones (DO).	33
Tabla 8. Densidad de coliformes totales en el mango de la puerta y el drenaje (superficies de contacto indirecto) de los supermercados antes de operaciones (AO) y después de operaciones (DO).	34
Tabla 9. Densidad de coliformes totales en el mango de la puerta y el drenaje (superficies de contacto indirecto) de las panaderías antes de operaciones (AO) y después de operaciones (DO).	34
Tabla 10. Densidad de <i>Escherichia coli</i> en la rebanadora y la mesa (superficies de contacto directo) de los supermercados antes de operaciones (AO) y después de operaciones (DO).	36
Tabla 11. Densidad de <i>Escherichia coli</i> en la rebanadora y la mesa (superficies de contacto directo) de las panaderías antes de operaciones (AO) y después de operaciones (DO).	36

Tabla 12. Densidad de <i>Escherichia coli</i> en el mango de la puerta y el drenaje (superficies de contacto indirecto) de los supermercados antes de operaciones (AO) y después de operaciones (DO).	37
Tabla 13. Densidad de <i>Escherichia coli</i> en el mango de la puerta y el drenaje (superficies de contacto indirecto) de las panaderías antes de operaciones (AO) y después de operaciones (DO).	37
Tabla 14. Medidas de ATP (RLU) obtenidas en las pruebas de bioluminiscencia de las superficies de contacto directo e indirecto en los supermercados y panaderías utilizando un luminómetro.	39

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Promedio del recuento de bacterias aeróbicas en la rebanadora y la mesa (superficies de contacto directo) de los supermercados (S) y panaderías (P) antes de operaciones (AO) y después de operaciones (DO).	27
Gráfica 2. Promedio del recuento de bacterias aeróbicas en el mango de la puerta de la nevera y el drenaje (superficies de contacto indirecto) de los supermercados (S) y panaderías (P) antes de operaciones (AO) y después de operaciones (DO).	29
Gráfica 3. Resultados de las pruebas de bioluminiscencia de ATP (Relative Light Units (RLU's) en %) que pasaron, fallaron y están en precaución de la rebanadora y la mesa (contacto directo) en los supermercados y panaderías antes de comenzar operaciones (AO) y después de cuatro horas de trabajo (DO).	40
Gráfica 4. Resultados de las pruebas de bioluminiscencia de ATP (Relative Light Units (RLU's) en %) que pasaron, fallaron y están en precaución del mango de la puerta de la nevera y el drenaje (contacto indirecto) en los supermercados y panaderías antes de comenzar operaciones (AO) y después de cuatro horas de trabajo (DO).	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Superficie de contacto directo muestreada: rebanadora.	16
Figura 2. Superficie de contacto directo muestreada: mesa.	16
Figura 3. Superficie de contacto indirecto: mango de la puerta de la nevera.	16
Figura 4. Superficie de contacto indirecto: drenaje.	16
Figura 5. Muestra de bacterias aeróbicas en una placa Petrifilm.	18
Figura 6. Muestra de coliformes totales y <i>E. coli</i> en una placa Petrifilm.	20

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice 1. Método utilizando Petrifilm (3M Microbiology) para la determinación de recuento total aeróbico.	52
Apéndice 2. Método utilizando Petrifilm (3M Microbiology) para la determinación de coliformes totales y <i>Escherichia coli</i> .	53
Apéndice 3. Método utilizado en las pruebas de bioluminiscencia de ATP (hisopo y un luminómetro modelo System SureII).	54
Apéndice 4. Análisis estadísticos de prueba T para los recuentos de bacterias aeróbicas en la rebanadora, la mesa, el mango de la puerta y el drenaje de los supermercados y panaderías antes de comenzar operaciones (AO) y después de cuatro horas de trabajo (DO).	55
Apéndice 5. Análisis estadísticos de prueba T para la densidad de coliformes totales en la mesa, el mango de la puerta y el drenaje de los supermercados y panaderías antes de comenzar operaciones (AO) y después de cuatro horas de trabajo (DO).	57
Apéndice 6. Análisis estadísticos de prueba T para la densidad de <i>Escherichia coli</i> en la mesa y en el drenaje de los supermercados antes de comenzar operaciones (AO) y después de cuatro horas de trabajo (DO).	58
Apéndice 7. Fotos tomadas el mismo día del muestreo en los supermercados y panaderías antes de realizar las pruebas.	59
Apéndice 7.1. Rebanadora muestreada con pedazos de jamón antes de comenzar operaciones en la mañana (AO) en la Panadería E.	59
Apéndice 7.2. Rebanadora muestreada con pedazo de jamón antes de comenzar operaciones en la mañana (AO) en el Supermercado J.	59
Apéndice 7.3. Pedazo de jamón encontrado en la rebanadora antes de comenzar operaciones en la mañana (AO) en el Supermercado K.	60
Apéndice 7.4. Residuos de alimentos (pedazos de jamón rebanado y de carne) encontrados en el fregadero antes de comenzar operaciones en la mañana (AO) en el Supermercado J.	60
Apéndice 7.5. Ingredientes, utensilios y vaso de “foam” (para café) se encontraron encima de la tabla de picar antes de comenzar operaciones en la mañana (AO) en la Panadería E.	61

Apéndice 7.6. Mesa muestreada contenía residuos de alimentos antes de comenzar operaciones en la mañana (AO) en el Supermercado B.	61
Apéndice 7.7. Drenaje muestreado tenía residuos de alimentos y papel antes de comenzar operaciones en la mañana (AO) en el Supermercado J.	62
Apéndice 7.8. Bandeja (puesta encima de la mesa) que se utiliza para colocar la carne en los establecimientos de venta al detalle recoge agua condensada del sistema de enfriamiento antes de comenzar operaciones en la mañana (AO) en el Supermercado J. Se observan en la bandeja residuos de carne molida y sangre. Las salpicaduras que se producen pueden causar contaminación cruzada en la mesa.	62
Apéndice 7.9. Piezas de un equipo secándose al aire en un carrito de compra antes de comenzar operaciones en la mañana (AO) en el Supermercado K. Esto es un ejemplo de contaminación cruzada.	63
Apéndice 7.10. Fregadero ocupado por bandejas que habían sido utilizadas (estaban sucias), piezas de equipos y cajas vacías (anteriormente contenían carne y sangre) en el Supermercado C después de comenzar operaciones (DO). Esto sugiere que no siguen el protocolo adecuado para limpieza y desinfección ni tampoco para el fregadero. La pluma del fregadero fue reparada con plástico (esto puede ser un nicho de contaminación).	63
Apéndice 7.11 Jamón sometido a abuso de temperatura y expuesto a cualquier contaminación en la rebanadora después de comenzar operaciones (DO) en el Supermercado C.	64
Apéndice 7.12. Químicos no rotulados y/o botellas re-utilizadas de detergentes de uso doméstico de contenido dudoso en la Panadería E.	64
Apéndice 7.13. Químicos no rotulados y/o botellas re-utilizadas de detergentes de uso doméstico almacenados en un lugar inapropiado (colgando de la tubería del lavamanos) en la Panadería E.	65
Apéndice 7.14. Alimento en la nevera expuesto a cualquier contaminación en el Supermercado C.	65
Apéndice 7.15. Jamón rebanado sin empacar junto a un pedazo de carne de res crudo en el Supermercado I (puede implicar contaminación cruzada).	66
Apéndice 7.16. Montaña de hielo, sangre y basura en el refrigerador del Supermercado I.	66

Apéndice 7.17. Drenaje tapado con sangre en uno de los refrigeradores del Supermercado I.	67
Apéndice 7.18. Puerta corroída por el moho en la Panadería H.	67
Apéndice 7.19. Agua condensada del sistema de enfriamiento formada en el techo del Supermercado I.	68
Apéndice 7.20. Agua condensada del sistema de enfriamiento formada en el techo cae encima de una mesa en el Supermercado I. Esto puede ocasionar contaminación cruzada.	68
Apéndice 7.21. Plafón del techo acústico del área de proceso fuera de lugar en el Supermercado I.	69
Apéndice 7.22. Compactadora adyacente a la puerta de la carnicería del Supermercado C.	69
Apéndice 7.23. Canal acumula agua sucia de la compactadora que está cerca de la puerta de la carnicería y del pasillo donde se coloca mercancía en el Supermercado C.	70
Apéndice 7.24. Agua sucia que sale de la compactadora acumulada en un canal en el Supermercado C.	70
Apéndice 7.25. Pasillo (al lado de la compactadora) donde se coloca mercancía y cajas vacías en el Supermercado C.	71

INTRODUCCIÓN

Existen muchas condiciones de peligro que causan enfermedades que son transmitidas por los alimentos contaminados en los establecimientos de venta al detalle. Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) son el mayor problema de salud pública a nivel internacional (FAO/WHO, 1993). Cuando las personas consumen alimentos que contienen peligros como bacterias, virus, sustancias químicas, u objetos extraños, éstos pueden causar enfermedades.

Los alimentos pueden presentar tres tipos de peligros: peligros biológicos, químicos y físicos (González, 2004). Los peligros biológicos están asociados con la mayoría de las enfermedades transmitidas por el consumo de alimentos contaminados con microorganismos (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2006). Entre los microorganismos se encuentran las bacterias, virus, parásitos, mohos y levaduras. Hay que mencionar que muchos de estos microorganismos son beneficiosos, ya que son utilizados para la producción de sabores y texturas en diferentes alimentos (pan, productos lácteos como el yogurt y quesos, bebidas fermentadas como el vino, sidra y cerveza). A los microorganismos que causan enfermedades se les denomina patógenos. Entre los patógenos de mayor importancia se encuentran *Escherichia coli*, productora de la toxina Shiga, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi* y *Listeria monocytogenes*.

El otro tipo de peligro es el químico. Los peligros químicos pueden ir desde toxinas naturales (setas venenosas, toxinas presentes en pescados y mariscos), producidas por microorganismos, residuos de drogas, aditivos no aprobados y compuestos químicos. Los peligros físicos son objetos que pueden lastimar si son ingeridos. Algunos artículos como vidrio, madera, piedra, metales filosos, efectos personales (como las prendas) pueden provocar ahogamiento, asfixia, laceraciones u otro tipo de daño. Cuando los alimentos son

contaminados con agentes patógenos, contaminantes químicos u otros, aumentan los riesgos para la salud de los consumidores y esto puede representar grandes cargas económicas para las diversas comunidades y naciones afectadas.

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ej. Salmonelosis, Shigelosis, Campylobacteriosis, Yersiniosis, Listeriosis, *Escherichia coli* O157:H7, Hepatitis A) son la causa más importante en la reducción del crecimiento económico (FAO/WHO, 1993). El costo anual de estas enfermedades de origen alimentario en los Estados Unidos desde el punto de vista de dolor y sufrimiento, reducción de productividad y costos médicos, se estima entre 10 a 83 billones de dólares (Food Code 2001 y Supplement 2003).

Los estudios indican que ocurren 76 millones de enfermedades, 325,000 hospitalizaciones y 5,000 muertes anualmente en los Estados Unidos a causa de estas enfermedades transmitidas por los alimentos (González, 2004; Mead *et al.*, 1999; Widdowson *et al.*, 2005). Según el Departamento de Salud, los casos principales de ETA confirmados en Puerto Rico en el 2006 fueron: 774 casos de Salmonelosis, 85 casos de Hepatitis A, 43 casos de Shigelosis y 18 casos de Campylobacteriosis (Tabla 1). En los últimos 15 años se ha prestado mayor atención al papel que juegan las bacterias y virus en las ETA (Bell *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1998; Michino *et al.*, 1999). Muchas investigaciones enfatizan que la conducta de los administradores, manipuladores y del personal en general del servicio de alimentación puede reducir el riesgo de los episodios producidos por las ETA (McCabe-Sellers y Beattie, 2004).

Tabla 1. Enfermedades entéricas de notificación obligatoria en Puerto Rico reportadas a la División de Epidemiología, Años 2004-2006 (Departamento de Salud de Puerto Rico).

Enfermedad	Número de casos		
	2004	2005	2006
Amebiasis	2	0	1
Campylobacteriosis	37	26	18
Ciguatera	12	12	20
Cólera	0	0	0
<i>E. coli</i> 0157:H7	2	2	0
Giardiasis	302	275	276
Hepatitis A	67	68	85
Listeriosis	0	1	0
Salmonelosis	536	692	774
Shigelosis	36	9	43
Yersiniosis	0	0	3

Fuente: Sistema de Vigilancia Enfermedades de Notificación Obligatoria

Se pueden prevenir y controlar los brotes causados por alimentos contaminados, identificando las fuentes y los factores que contribuyen a que estos patógenos se encuentren en establecimientos de venta al detalle y delicatessen. Existen numerosas fuentes de contaminación, incluyendo alimentos, ambiente, equipo, empleados, clientes y vendedores. El conocer los factores que permiten al patógeno contaminar, crecer y dispersarse es esencial para identificar las medidas a implementar para establecer un programa efectivo de prevención/control. Existen tres formas importantes de controlar patógenos en el ambiente de establecimientos de venta al detalle y delicatessen: prevenir la contaminación cruzada, practicar una limpieza y desinfección adecuada y controlar el tiempo y la temperatura. A veces es difícil controlar la presencia de bacterias en el área de procesamiento y evitar la reintroducción de las

mismas al producto terminado. Esto se conoce como la contaminación post-proceso (Mazzotta, 2001).

Listeria monocytogenes es un microorganismo psicrófilo que puede sobrevivir y multiplicarse a bajas temperaturas y el cual representa un gran reto a la industria de alimentos listos para consumo y a establecimientos de venta al detalle. Por lo tanto, métodos efectivos de desinfección deben implementarse para evitar la propagación de este tipo de bacteria. Así como también es vital la verificación de los programas de control para constatar que estén funcionando correctamente.

El objetivo principal de este estudio es verificar la efectividad de los procedimientos de limpieza y desinfección en establecimientos de venta al detalle y delicatessen. El segundo objetivo es evaluar si el uso de las pruebas de bioluminiscencia de ATP (como método rápido) puede ser una herramienta que pueda utilizar el Inspector, Personal a Cargo, Supervisores, y/o Gerentes para verificar las condiciones higiénicas en los establecimientos.

En Puerto Rico hay poca información sobre las medidas que se toman para el control de patógenos en establecimientos de venta al detalle y delicatessen. Los resultados obtenidos en esta tesis brindarán información sobre la efectividad del programa de limpieza y desinfección bajo el cual están operando estos establecimientos en los municipios de Mayagüez, Rincón y Hormigueros del área oeste de Puerto Rico.

REVISIÓN DE LITERATURA

La limpieza y desinfección en la producción de los alimentos es tan importante como la verificación de la efectividad de estos procesos (Slade, 2002). Este asunto ha recibido una atención mayor en los últimos tiempos con la emergencia de enfermedades transmitidas por los alimentos con patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella*. Como parte de un programa de limpieza y desinfección es importante conocer las fuentes de contaminación, identificar aquellos lugares que se pueden convertir en nichos o focos de contaminación, las estrategias de muestreo que incluyen los lugares y la frecuencia del mismo, así como también los métodos de muestreo y análisis (Slade, 2002). De esta manera se puede establecer un buen programa de limpieza y desinfección y determinar la efectividad del mismo. Identificar las fuentes de contaminación de patógenos en estos establecimientos tendrá un impacto directo en la efectividad del programa.

Hoy en día se conocen que son diversos los factores que contribuyen a que los patógenos contaminen los alimentos. Un estudio descriptivo realizado por la Universidad del Estado de Ohio logró identificar los puntos de control necesarios para mantener un alimento inocuo y reducir el número de casos y brotes de enfermedades transmitidas por ellos. Éstos fueron: 1) practicar la higiene personal, 2) cocinar los alimentos adecuadamente, 3) evitar la contaminación cruzada, 4) mantener los alimentos bajo temperaturas seguras y 5) rechazar alimentos de fuentes inseguras (Medeiros *et al.*, 2003).

El control inadecuado de la temperatura, la contaminación cruzada y/o la limpieza y desinfección inadecuada se han identificado como los principales factores de riesgo que contribuyen a la contaminación, crecimiento y diseminación de la mayoría de los patógenos. La temperatura del alimento es uno de los factores más importantes para la preservación del

producto (Raccach y Henningsen, 1997). Las guías federales recomiendan que los alimentos refrigerados de deli se mantengan a 41°F (5°C) o menos. Un alimento que ya ha sido cocido y que desea servirse caliente se debe mantener a una temperatura $\geq 135^{\circ}\text{F}$ (57°C). La práctica de mantener los alimentos a temperatura adecuada hasta el momento de ser consumidos pretende mantener la calidad e inocuidad microbiológica (González, 2004). Lamentablemente, algunos patógenos como *Listeria monocytogenes* pueden crecer de manera lenta a temperaturas de refrigeración. Así que si un producto es contaminado y es refrigerado durante un período largo de tiempo, existe la posibilidad de que esta bacteria crezca a niveles altos como para causar enfermedad.

La contaminación cruzada es una de las causas principales de ETA. Ésta ocurre cuando los microorganismos son transferidos de una superficie sucia a otra limpia, contaminando equipos y alimentos inocuos (Tompkin, 2002). La contaminación cruzada puede proceder de alimentos, empleados, equipos, ambiente (aire) y superficies de trabajo no saneados adecuadamente. Un ejemplo de ésta puede ocurrir por la condensación del agua. El agua condensada en los sistemas de aires acondicionados (o sistemas de enfriamiento) puede caer en los productos. Esta es una manera en que los alimentos pueden ser contaminados. La preocupación por esta contaminación es mayor cuando ocurre en los alimentos listos para consumo.

Sneed y colaboradores (2004) realizaron un estudio en 40 “Instituciones de Vivienda Asistida” para determinar la calidad microbiológica de alimentos que estuvieron en contacto directo con superficies como tablas de picar, mesas de trabajo, cuchillos y otros equipo de cocina, además de otras superficies de contacto indirecto que podrían ocasionar contaminación cruzada en el alimento (mangos de la puerta del refrigerador o del congelador). Para determinar la calidad microbiológica se realizaron pruebas como el recuento total aeróbico,

Enterobacteriaceae e identificación de *Staphylococcus aureus*. Se encontró que solo dos instituciones cumplían los estándares para las superficies estudiadas en cada una de las tres pruebas. El estudio concluyó que pocas “Instituciones de Vivienda Asistida” cumplían los criterios para el conteo de placa aeróbica, y casi tres cuartos de las instalaciones no lo cumplían en las tablas de picar, por lo cual la contaminación cruzada de estas superficies puede dar lugar a la contaminación del alimento. Por lo tanto, se requiere una mayor atención en el adiestramiento y la supervisión del personal a cargo, con el fin de reducir o eliminar la contaminación cruzada (Odumen *et al.*, 1997).

El tercer factor que contribuye a la probabilidad de presencia de patógenos en los ambientes de venta al detalle son la limpieza y desinfección inadecuada de las superficies en contacto con los alimentos (los equipos) y las superficies de contacto indirecto. Una limpieza y desinfección inadecuada permite que microorganismos puedan crecer a niveles inaceptables en los equipos y en el ambiente del establecimiento. Los microorganismos que permanecen en el equipo y en el ambiente por largos períodos de tiempo pueden producir biopelículas, o una delgada capa viscosa invisible en las superficies (Hamilton, 2002). Esta capa puede evitar que los desinfectantes lleguen a las bacterias o que sean detectadas. El peligro de las biopelículas, es que las bacterias en ellas pueden romperlas y transferirse a los alimentos o a las superficies en contacto con los alimentos.

Una vez identificados los factores que contribuyen a la contaminación, crecimiento y diseminación de patógenos se deben tomar medidas para controlarlos. Existen tres medidas importantes en el control de los patógenos en el ambiente de establecimientos de venta al detalle de alimentos, que incluyen: prevenir la contaminación cruzada, practicar una limpieza adecuada y controlar tiempo y temperatura. Una vez que estas prácticas adecuadas estén implementadas, es necesario verificar que éstas estén trabajando y la efectividad de las mismas.

De esta manera se pueden realizar medidas correctivas de ser necesario. Existen diferentes estrategias de verificación para asegurar un manejo de riesgos sistemático y consistente, monitoreando que se cumpla con la normatividad, asegurando la inocuidad del producto y mejorando su calidad: registro de datos, evaluaciones periódicas de los controles críticos, auditorías externas, evaluación del desempeño de los empleados y pruebas microbiológicas.

Las pruebas microbiológicas son una forma de verificar cuan efectivos son los programas de limpieza y desinfección en controlar la entrada, propagación y crecimiento de patógenos que causan enfermedades alimentarias. Muchas veces estas pruebas son realizadas al ambiente, en las superficies en contacto directo o indirecto con los alimentos o en los productos de las áreas de alimentos listos para comer. Estos muestreos pueden ser realizados pre-operación, durante la operación y post-operación (Russell, 2001-2002). Una vez los sistemas de inocuidad alimentaria están implementados, regularmente se conducen las pruebas y se comparan los resultados para que de esta forma se determine cuan efectivo es el programa.

Los organismos indicadores se definen como bacterias que son utilizadas como una señal de calidad o higiene en agua, alimentos y en ambientes de procesamiento (Tortorello, 2003). Un organismo indicador es un organismo o comunidad ecológica tan estrictamente asociada a condiciones particulares que su presencia es indicativo de la existencia de estas condiciones (Merriam-Webster, 2003). Históricamente estas condiciones han sido relacionadas a la salud pública y la preocupación de falta de sanitización (Tortorello, 2003). A través de los años el uso de los organismos indicadores ha sido ampliamente utilizado para proveer evaluaciones de la calidad en adición de la seguridad. Los organismos indicadores son componentes importantes en un programa de pruebas microbiológicas conducido por agencias reguladoras y las industrias de alimentos (Tortorello, 2003). Los indicadores más comúnmente utilizados en establecimientos de venta al detalle y delicatessen son el recuento total aeróbico,

E. coli y coliformes totales o pruebas genéricas para *Listeria* spp. Si se quiere ser más específico se puede muestrear para el patógeno *Listeria monocytogenes*.

El APC ha sido utilizado extensamente como pruebas indicadoras de calidad. Aunque las aplicaciones del APC son diversas, no debe ser utilizada como indicador de seguridad, pues no hay generalmente una correlación entre APC y la presencia de patógenos o sus toxinas (Tortorello, 2003). El APC puede ser útil para medir las condiciones de la materia prima, la eficacia de los procedimientos (tratamiento de calor), las condiciones de higiene durante el proceso, condiciones sanitarias de equipo y utensilios, en el perfil de tiempo por temperatura durante el almacenaje y la distribución (Huss, 1994).

Hoy en día los coliformes son utilizados como indicadores de higiene o contaminación después del proceso por las agencias gubernamentales y las industrias (Gilbert *et al.*, 2000). El grupo de coliformes no tienen una distinción taxonómica válida, pero es funcionalmente definida por la fermentación de lactosa en la prueba de coliformes (Kornacki y Johnson, 2001). Los coliformes pueden ser definidos como bacilos gram-negativos, oxidasa negativo, aerobios o anaerobios facultativos no formadores de esporas con la habilidad de crecer en presencia de sal que fermentan la lactosa y producen ácido y gas en 48 hrs a 37°C (Rompre *et al.*, 2002). Los géneros con esta descripción son el grupo de las bacterias *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia* spp. y *Klebsiella* spp. (Jay, 1994).

Escherichia coli conocida anteriormente como *Bacterium coli commune*, fue identificada por el pediatra Theodoro Escherich cuando intentaba aislar el agente etiológico del cólera en el año 1885 (Escherich, 1885). Una vez esta bacteria fue aislada y estudiada se determinó que es un bacilo anaerobio facultativo y que predominaba en el intestino. Este microorganismo pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. El uso de este microorganismo fue el primero que se propuso como índice de contaminación fecal por Franz Schardinger en el

1892 ya que se pudo aislar más fácilmente que cualquiera de los microorganismos patógenos transmitidos por el agua (Schardinger, 1892). Smith (1895) propuso que se realizaran pruebas de este microorganismo para utilizarlo como índice de la potabilidad del agua. Sin embargo, el criterio para *E. coli* fue confuso, ya que otras bacterias como *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. y *Klebsiella* spp. presentaban características fenotípicas y bioquímicas similares a ésta.

E. coli es utilizado como indicador de sanidad que puede indicar que hay contaminación fecal en el alimento (De Caloni y Fernández-Coll, 1983). Si la presencia de *E. coli* se detecta luego del procesamiento del alimento, esto es indicativo que los procesos de saneamiento no están funcionando y/o que el control de temperatura es inadecuado (Buchanan, 1991).

La rápida detección de patógenos y otros contaminantes microbiológicos en los alimentos es crítica para asegurar la salud de los consumidores. Los métodos tradicionales para detectar patógenos que causan enfermedades transmitidas por los alimentos a menudo requieren tiempo prolongado en el crecimiento en los medios de cultivo, seguido por el aislamiento, la identificación bioquímica, y en ocasiones serológica (CFSAN, 2001). Los avances recientes en la tecnología hacen que la detección e identificación sea mucho más rápida, más conveniente, sensitiva, y más específica que análisis convencionales. Estos nuevos métodos a menudo se les llama "métodos rápidos", un término subjetivo usado libremente para describir varias pruebas que incluyen kits bioquímicos miniaturizados, pruebas de anticuerpo, las pruebas basadas en DNA, y análisis que son modificaciones de las pruebas convencionales para acelerar el análisis (CFSAN, 2001). Algunos de estos análisis también se han automatizado para reducir manipulaciones con manos. Con pocas excepciones, casi todos los análisis usados para detectar patógenos específicos en alimentos pueden requerir crecimiento en un medio de enriquecimiento antes del análisis (CFSAN, 2001).

Uno de los métodos rápidos que es utilizado como método alternativo para el aislamiento e identificación de bacterias que ha sido analizado colaborativamente y que se encuentra incluido dentro de los métodos oficiales de análisis publicados por la AOAC y otros organismos internacionales es el uso de placas Petrifilm (Sneed *et al.*, 2004). El método Petrifilm es muy eficaz cuando es utilizado para verificar el saneamiento como parte de los puntos críticos de control en equipos y en otras pruebas ambientales (Russell, 2001-2002). Las placas Petrifilm son un medio de cultivo listo para ser empleado en cualquier momento para analizar el producto, productos en proceso y/o monitoreo de superficies y ambientes. Su diseño exclusivo incluye una película cubierta con nutrientes y un agente gelificante en frío. El método de placas Petrifilm es simple y consume menos tiempo en la preparación de la muestra que los métodos convencionales (Ho *et al.*, 2001).

En Corea (Ho *et al.*, 2001) un estudio fue realizado para comparar la efectividad y aplicabilidad del método en placa de Petrifilm para la enumeración de microorganismos aerobios y coliformes en muestras de carnes. Para realizar la comparación se utilizaron 303 muestras de carne (incluyendo carne de cerdo, ave y res) que fueron obtenidas de diferentes almacenes minoristas. Se hizo una comparación del coeficiente de correlación (R) entre los métodos convencionales y el método en placa con Petrifilm mediante análisis de regresión lineal. El coeficiente de correlación en las muestras fue 0.99 (cerdo), 0.95 (res) y 0.94 (ave) en la prueba de APC y 0.83 (cerdo), 0.96 (res) y 0.81 (ave) en la prueba de coliformes. Basados en la alta correlación en el conteo total de microorganismos, es posible reemplazar los métodos convencionales con el método de las placas Petrifilm. El conteo de coliformes por lo general mostró un R alto, excepto en las muestras de cerdo, las cuales estaban sujetas a más contaminación. Los resultados sugirieron que las placas Petrifilm pueden reemplazar los

métodos convencionales en los análisis de microorganismos midiendo la contaminación en los productos cárnicos.

En otro estudio similar en España (Priego *et al.*, 2000) se comparó entre las placas Petrifilm serie 2000 y los métodos tradicionales (“Violet Red Bile Agar”) para el conteo de coliformes en alimentos (huevo, habichuelas verdes congeladas, un dulce, entre otros). El coeficiente de correlación ($r = 0.860$) obtenido para el conteo de coliformes (log CFU/g) en una amplia variedad de alimentos demostró que la correlación entre los métodos es claramente comparable. Se determinó que el método Petrifilm provee resultados en períodos cortos de incubación (12 horas), haciendo posible que este método rápido se adapte perfectamente al sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control (conocido por sus siglas en inglés como HACCP) permitiendo el control de calidad microbiológica del proceso. A través del uso de placas Petrifilm se reduce espacio en el laboratorio, se reducen los costos y se ahorra tiempo (Dawkins *et al.*, 2005).

Otro método rápido (no es una prueba microbiológica) que ha sido aceptado en las industrias que procesan alimentos es la prueba de bioluminiscencia de ATP (León y Albrecht, 2004). Esta prueba se utiliza para verificar la efectividad de los programas de limpieza y desinfección. La bioluminiscencia por ATP es una alternativa a los procedimientos de control de calidad microbiológico tradicionales que proporciona resultados rápidos a través de una operación sencilla: se toma la muestra con un hisopo, se activan los reactivos en el hisopo, se agita para que se mezclen, se introduce el hisopo en el instrumento (luminómetro) y en 15 segundos se obtiene un resultado (Burgos *et al.*, 2002). Este sistema se emplea para la supervisión de control de calidad y el programa de peligros y puntos críticos de control de equipos, superficies, muestras de agua y otros medios ambientales (Madl, 1997). La determinación inmediata de limpieza es una manera rápida para las compañías de verificar sus

niveles de limpieza en líneas de producción, detectando residuos de productos y contaminación. La técnica de detección está basada en la reacción ATP (Trifosfato de adenosina) presente en todos los organismos vivos y en los alimentos. El ATP es la molécula de energía universal que se encuentra en todos los animales, vegetales, bacterias, mohos y levaduras. Cuando el ATP se combina con los reactivos (luciferina y luciferasa) se produce una reacción que emite luz. La cantidad de luz emitida es proporcional a la cantidad de ATP presente. Mediante un luminómetro portátil se mide la cantidad de fotones emitidos en URL o Unidades Relativas de Luz que es proporcional a la cantidad de ATP presente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de las Muestras

Se escogieron doce establecimientos de venta al detalle y delicatessen de los municipios de Mayagüez, Rincón y Hormigueros, entre éstos 7 supermercados y 5 panaderías. Los establecimientos fueron escogidos basados en el itinerario de inspección del Departamento de Salud y donde se permitiera la entrada al mismo. Al evaluar el itinerario se seleccionaron los lugares pertenecientes a franquicias o cadenas distintas. Los establecimientos desconocían que se realizaría un muestreo. El mismo día de visitar los establecimientos antes de proceder a tomar las muestras se realizó una inspección visual de las áreas a muestrear.

Cada lugar fue muestreado en cuatro superficies: rebanadora y su mesa (contacto directo con los alimentos) y el mango de la puerta de la nevera y el drenaje (no contacto). Se llevaron a cabo pruebas de Recuento Total Aeróbico, de Coliformes totales y *Escherichia coli* (análisis bacteriológicos) en cada superficie para verificar la efectividad del programa de limpieza y sanitización en los establecimientos antes de comenzar operaciones en la mañana (AO) y después de cuatro horas de trabajo (DO) (tratamientos experimentales). El Reglamento General de Salud Ambiental #6090 en su Capítulo II, Artículo 1, Sección 1.00 adopta las recomendaciones de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) incluídas en el Código de Alimentos (Food Code) en todas sus partes como guía para el programa de limpieza e higiene en los EPSA (Establecimientos que Preparan y Sirven Alimentos) (se encuentra detallado en el capítulo 4, partes 4-6 y 4-7 del Food Code (CFSAN, 2005). Se realizaron pruebas de bioluminiscencia de ATP (prueba no microbiológica) AO y DO en cuatro superficies (rebanadora, mesa, mango de la puerta de la nevera y el drenaje) en cada establecimiento. En los supermercados fueron muestreados los cuartos de carnes y en las

panaderías el área de deli. Las muestras tomadas en dos períodos distintos AO fluctuaba entre las 5:00 a.m. y 7:00 a.m. y DO aproximadamente entre 9:00 a.m. a 11:00 a.m. Esto significaba que el establecimiento que comenzara la producción a las 5:00 a.m. era muestreado por segunda vez a las 9:00 a.m. El que comenzara a las 6:00 a.m. la segunda visita era a las 10:00 a.m. y así sucesivamente.

Se tomaron cuatro muestras de diferentes áreas de cada establecimiento utilizando técnicas asépticas: dos de ellas fueron tomadas de la rebanadora y su mesa (superficies en contacto con los alimentos) y las otras dos del mango de la puerta de la nevera y el drenaje (superficies ambientales o no contacto). Las muestras de contacto directo fueron obtenidas con la técnica de esponja en bolsas estériles Whirl-Pak (Nasco) para muestreos ambientales (Figura 1 y 2) y las de contacto indirecto con la técnica del hisopo (Dacron) en tubos de ensayo de 10 ml que contenían caldo Lethen (Difco) (Figura 3 y 4). Las bolsas y los tubos de ensayo fueron previamente rotulados. Se utilizaron los métodos descritos para la toma de muestras con esponjas e hisopos Dacron en “Swabbing for Sampling the Environment and Equipment” (3). Las muestras fueron transportadas al laboratorio de microbiología en neveras portátiles con “cold packs”.



Figura 1. Superficie de contacto directo muestreada: rebanadora.



Figura 2. Superficie de contacto directo muestreada: mesa.



Figura 3. Superficie de contacto indirecto muestreada: mango de la puerta de la nevera.



Figura 4. Superficie de contacto indirecto muestreada: drenaje.

Procesamiento de las Muestras

Una vez en el laboratorio las muestras fueron colocadas bajo condiciones de refrigeración y se procesaron en un período menor de cuatro horas luego de haber sido recolectadas. Las muestras procesadas con el método de esponja se les añadieron 225 ml de caldo letheen al llegar al laboratorio. Ambas muestras fueron homogenizadas.

Análisis Bacteriológicos

A partir de las muestras homogenizadas se hicieron las diluciones seriadas en tubos de ensayo que contenían 9 ml de caldo letheen desde 10^{-1} a 10^{-6} . La enumeración de las bacterias se llevó a cabo según descrito en el Bacteriological Analytical Manual (CFSAN, 2001). El aislamiento y la identificación de las bacterias se realizaron empleando métodos rápidos que se encuentran incluidos dentro de los métodos oficiales de análisis publicados por la AOAC y otros organismos internacionales.

Determinación de Recuento Total Aeróbico (APC)

Para llevar a cabo el recuento total de organismos aerobios se utilizaron placas Petrifilm (3M Microbiology) las cuales son un medio de cultivo listo para ser empleado (Apéndice 1). Éste contiene nutrientes útiles, un agente gelificante soluble en agua fría y un tinte indicador de color rojo que hace fácil el recuento de las colonias. Estas placas son utilizadas para el recuento de la población total existente de bacterias aeróbicas en productos, superficies, etc.

De las diluciones seriadas preparadas (10^{-1} - 10^{-6}) con una pipeta perpendicular a la placa, se colocó 1 ml en el centro de la película cuadrículada inferior de las láminas. Esto se realizó en duplicado. Se liberó la película superior dejando que cayera sobre la dilución. Con el lado rugoso mirando hacia abajo se colocó el disco de dispersión (o esparcidor) sobre la

lámina cubriendo totalmente la muestra. Se ejerció una presión hacia abajo suavemente sobre el esparcidor desde el centro del mismo para distribuir la muestra uniformemente (Apéndice 1). Se esperó al menos un minuto para que se solidificara el gel. Una vez el gel solidificó se procedió a colocar las muestras en una incubadora (Isotemp Incubator 255D). Las placas fueron incubadas cara arriba en grupos de no más de 20 piezas por 48 hrs (± 3 hrs) a una temperatura de 35 °C (± 1 °C). Luego de la incubación de las placas se enumeraron utilizando un contador de colonias (Bantex Colony Counter 920A). Se contaron todas las colonias rojas sin importar su tamaño o la intensidad del tono rojo en aquellas láminas que tuvieron de 25-250 colonias en su área circular, según el método de la AOAC aprobado para este medio (Figura 5).



Figura 5. Muestra de bacterias aeróbicas en una placa Petrifilm.

Determinación de Coliformes Totales y *Escherichia coli*

El conteo de *Escherichia coli* y de coliformes totales se realizó utilizando Petrifilm (3M Microbiology) (Apéndice 2) los cuales contienen nutrientes de Bilis Rojo Violeta (VRB por sus siglas en inglés), un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de Glucoronidasa que identifica a *E. coli* y un tinte indicador que facilita la identificación de las colonias coliformes gram negativas (no *E. coli*). Se utilizaron las diluciones seriadas preparadas anteriormente para el recuento total aeróbico en la enumeración de coliformes totales y *E. coli*. Se vertió 1 ml de la muestra sobre las láminas por duplicado y se colocó en el centro de la película inferior. La muestra fue distribuida uniformemente colocando el lado no plano del esparcidor desde el centro de éste sobre la lámina ejerciendo una presión ligera hacia abajo. Se esperaron 60 segundos para que el gel solidificara (Apéndice 2). Una vez solidificado el gel se colocaron las láminas en una incubadora a 35 °C (± 1 °C) por 24 hrs (± 2 hrs) para coliformes y 48 hrs (± 2 hrs) para *E. coli*. Luego de transcurrido cada período de incubación, utilizando el contador de colonias se enumeró el crecimiento de las bacterias. Sólo se tomaron en consideración aquellas placas que su crecimiento estuviera entre 25-250 colonias. El conteo que se encuentra fuera de este rango puede dar indicaciones erróneas de la composición bacteriana real de la muestra (CFSAN, 2001). Para indicar la presencia de *Escherichia coli* se tomaron en consideración las colonias color azul con presencia de gas. Las colonias de color rojo y con presencia de gas se tomaron en consideración para el conteo de coliformes totales. El conteo de coliformes totales consistió en la sumatoria de las colonias rojas y azules con presencia de gas, según el método aprobado por la AOAC para el conteo de este medio (Figura 6).

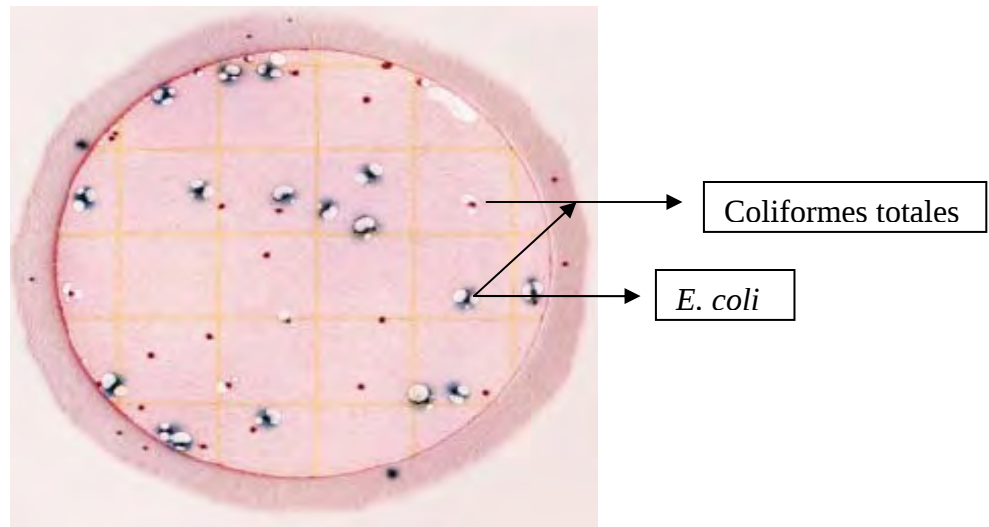


Figura 6. Muestra de coliformes totales y *E. coli* en una placa Petrifilm.

Pruebas de Bioluminiscencia de ATP

Las pruebas de bioluminiscencia de ATP fueron realizadas en cada establecimiento. Las áreas de muestreo corresponden a las mismas realizadas para el análisis bacteriológico. Para las superficies de contacto directo se tomó un área de 4 cm x 4 cm de la rebanadora y 10 cm x 10 cm en la mesa. Las superficies de interés en este estudio fueron la rebanadora, la mesa de la rebanadora (contacto directo); el mango de la puerta de la nevera y el drenaje (contacto indirecto). En el caso de la rebanadora el lugar muestreado fue donde se colocaba el jamón a ser rebanado y en el caso de la mesa se muestreó el centro de la mesa. Para obtener la muestra se utilizó un hisopo (Ultra Snap de Hygiena) pre-humedecido. Se tomó la muestra cubriendo el área de izquierda a derecha, de arriba hacia abajo y diagonalmente. Se insertó el hisopo en el tubo. Se activó la válvula (Snap ValveTM) y se comprimió para que el reactivo líquido bajara y se procedió a agitar. Por último se introdujo el hisopo en el luminómetro (System Sure II) y en 15 segundos se obtuvieron los resultados (Apéndice 3).

Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos en los análisis bacteriológicos fueron analizados con la prueba T (muestras apareadas) utilizando ANOVA (Infostat, 2006) para determinar si existen o no diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre las muestras tomadas antes de la producción (AO) y luego de cuatro horas de trabajo (DO) para las superficies de contacto con los alimentos y las muestras ambientales en cada establecimiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las observaciones obtenidas en esta tesis brindan información sobre las prácticas bajo las cuales están operando los establecimientos de venta al detalle y delicatessen muestreados en los pueblos de Mayagüez, Rincón y Hormigueros. Al realizar una inspección visual el mismo día del muestro en los cuartos y áreas de trabajo de cada establecimiento antes de comenzar las operaciones (AO) se apreció que algunas de las superficies o lugares no estaban limpios tanto en los supermercados como en las panaderías (se suponía que debían estar limpios y sanitizados del día anterior). Había presencia de residuos de alimentos (pedazos de jamón seco) en las rebanadoras (Apéndices 7.1, 7.2 y 7.3). Los fregaderos no estaban limpios conteniendo residuos de alimentos (Apéndice 7.4). Algunas tablas de picar tenían ingredientes y utensilios encima (Apéndice 7.5) y no estaban limpias conteniendo residuos de alimentos (Apéndice 7.6). El drenaje estaba tapado con pedazos de alimentos y papel (Apéndice 7.7). Las bandejas (puestas encima de la mesa) utilizadas para colocar carne en estos establecimientos recogían agua condensada del sistema de enfriamiento. En las bandejas se observaban residuos de carne molida y sangre. Las salpicaduras que se producían podían ser causa de contaminación cruzada en la mesa (Apéndice 7.8). Se encontraron piezas de un equipo secándose al aire en un carrito de compra lo que puede ser un ejemplo de contaminación cruzada (Apéndice 7.9).

En la inspección visual realizada después de cuatro horas de trabajo (DO) se observó que los fregaderos estaban ocupados por bandejas que habían sido utilizadas (estaban sucias), piezas de equipos y por cajas vacías (anteriormente contenían carne y sangre) sugiriendo que no siguen los protocolos adecuados para limpieza y desinfección y uso del fregadero (Apéndice 7.10). Se observó jamón sometido a abuso de temperatura y expuesto a cualquier contaminación en la rebanadora (Apéndice 7.11). Los residuos de alimentos en la rebanadora, en la mesa y el drenaje pueden haber aumentado los conteos microbiológicos (especialmente en

APC) cuando se suponía que fueran bajos o de ningún crecimiento si estas superficies son limpiadas y sanitizadas efectivamente.

Durante el muestreo se observó que en algunos de los establecimientos no se aplicaban buenas prácticas de manufactura, el personal no seguía las buenas prácticas de higiene (no usaban guantes y redecillas) y la estructura física y/o alrededores del lugar parecían estar deteriorados. Entre las prácticas incorrectas se observó el utilizar envases con químicos no identificados, como también detergentes de uso doméstico (Apéndice 7.12) almacenados en un lugar inapropiado (Apéndice 7.13); alimento en la nevera expuesto a cualquier contaminación (Apéndice 7.14); jamón rebanado sin empacar junto a carne cruda de res y cerdo (puede implicar contaminación cruzada) (Apéndice 7.15); la rebanadora ser utilizada para rebanar jamón, mortadella, queso y lechuga sin necesariamente limpiar entre el uso de cada uno de ellos lo que puede ser otro ejemplo de contaminación cruzada; montaña de hielo, sangre y basura en el refrigerador (Apéndice 7.16) y los drenajes del mismo tapados con sangre (Apéndice 7.17), entre muchas otras. Por último, se observó estructura física y alrededores deteriorados: una puerta de un refrigerador en muy malas condiciones prácticamente destruida por el moho (Apéndice 7.18); condensación en el techo del área de trabajo (Apéndice 7.19), donde el agua condensada caía encima de las mesas, equipos y el piso (Apéndice 7.20); plafón del techo acústico del área de proceso fuera de lugar (Apéndice 7.21); área inmediata a una de las carnicerías era un compactador de basura (Apéndice 7.22) que cuando es utilizado descarga agua sucia (Apéndice 7.23) que queda acumulada en un canal (Apéndice 7.24) que trae como consecuencia mal olor, plagas y posible contaminación con los productos almacenados en un pasillo cercano (Apéndice 7.25). Estas prácticas pueden haber afectado de una forma directa o indirecta las muestras.

Los datos recopilados en el recuento total aeróbico se pueden apreciar en las Tablas 2, 3, 4 y 5. Los recuentos totales aeróbicos en las muestras analizadas mostraron valores desde 0.00 hasta 8.93 $\log_{10}$ CFU/ml de bacterias aeróbicas. Hasta el momento no se han determinado unas guías que contengan el criterio microbiológico para las superficies de contacto directo con los alimentos. En general los valores encontrados son considerados en base a la cantidad de unidades formadoras de colonia (CFU) como indicadores de saneamiento. Sin embargo, un límite general microbiano de < 2.0 CFU/ml en superficies sanitizadas de contacto directo ha sido sugerido por la APHA (American Public Health Association) y se ha visto que puede utilizarse como un rango en superficies (Evancho *et al.*, 2001). Los promedios obtenidos en la prueba de recuento totales aeróbicos para la rebanadora y la mesa (superficies de contacto directo) en supermercados y panaderías mostraron valores desde 2.56 a 6.41 $\log_{10}$ CFU/ml (Gráfica 1). La media para la rebanadora de los supermercados AO fue de 2.56 $\log_{10}$ CFU/ml y DO de 3.73 $\log_{10}$ CFU/ml y en las panaderías AO se obtuvo un promedio de 3.91 $\log_{10}$ CFU/ml y 4.30 $\log_{10}$ CFU/ml DO (Gráfica 1); tanto en los supermercados como en las panaderías la rebanadora se encontró fuera del límite dado para esta superficie (2.00 $\log_{10}$ CFU/ml) (Gráfica 1). Se obtuvo una media de 4.55 $\log_{10}$ CFU/ml para la mesa AO en los supermercados y de 6.41 $\log_{10}$ CFU/ml DO y esta misma superficie (mesa) en las panaderías AO el valor fue de 5.53 $\log_{10}$ CFU/ml y 4.95 $\log_{10}$ CFU/ml DO (Gráfica 1). Esta superficie de contacto directo (mesa) se encontró que no cumplía con los parámetros de limpieza porque se salió del límite utilizado (2.00 $\log_{10}$ CFU/ml). El análisis estadístico de prueba T indicó que no existe diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en crecimiento microbiano atribuible a antes y después de operaciones (Apéndice 4) en la rebanadora y la mesa (superficies de contacto directo) de los supermercados y panaderías.

Tabla 2. Recuento de bacterias aeróbicas en la rebanadora y la mesa (superficies de contacto directo) de los supermercados antes de operaciones (AO) y después de operaciones (DO).

Establecimientos (Supermercados)	Rebanadora (AO) (log₁₀ CFU/ml)	Rebanadora (DO) (log₁₀ CFU/ml)	Mesa (AO) (log₁₀ CFU/ml)	Mesa (DO) (log₁₀ CFU/ml)
A	2.91	3.04	8.09	6.53
B	3.67	4.88	5.72	5.17
C	<1	4.93	<1	7.94
G	2.66	4.07	6.68	6.02
I	4.92	5.13	5.01	5.11
J	3.79	4.04	6.36	6.15
K	<1	<1	<1	7.95
Media	2.56	3.73	4.55	6.41

Tabla 3. Recuento de bacterias aeróbicas en la rebanadora y la mesa (superficies de contacto directo) de las panaderías antes de operaciones (AO) y después de operaciones (DO).

Establecimientos (Panaderías)	Rebanadora (AO) (log₁₀ CFU/ml)	Rebanadora (DO) (log₁₀ CFU/ml)	Mesa (AO) (log₁₀ CFU/ml)	Mesa (DO) (log₁₀ CFU/ml)
D	8.57	2.44	7.96	2.56
E	2.72	5.95	4.52	5.89
F	4.93	2.94	5.90	5.54
H	3.33	5.30	4.42	4.60
L	<1	4.89	4.83	6.15
Media	3.91	4.30	5.53	4.95

Tabla 4. Recuento de bacterias aeróbicas en el mango de la puerta de la nevera y el drenaje (superficies de contacto indirecto) de los supermercados antes de operaciones (AO) y después de operaciones (DO).

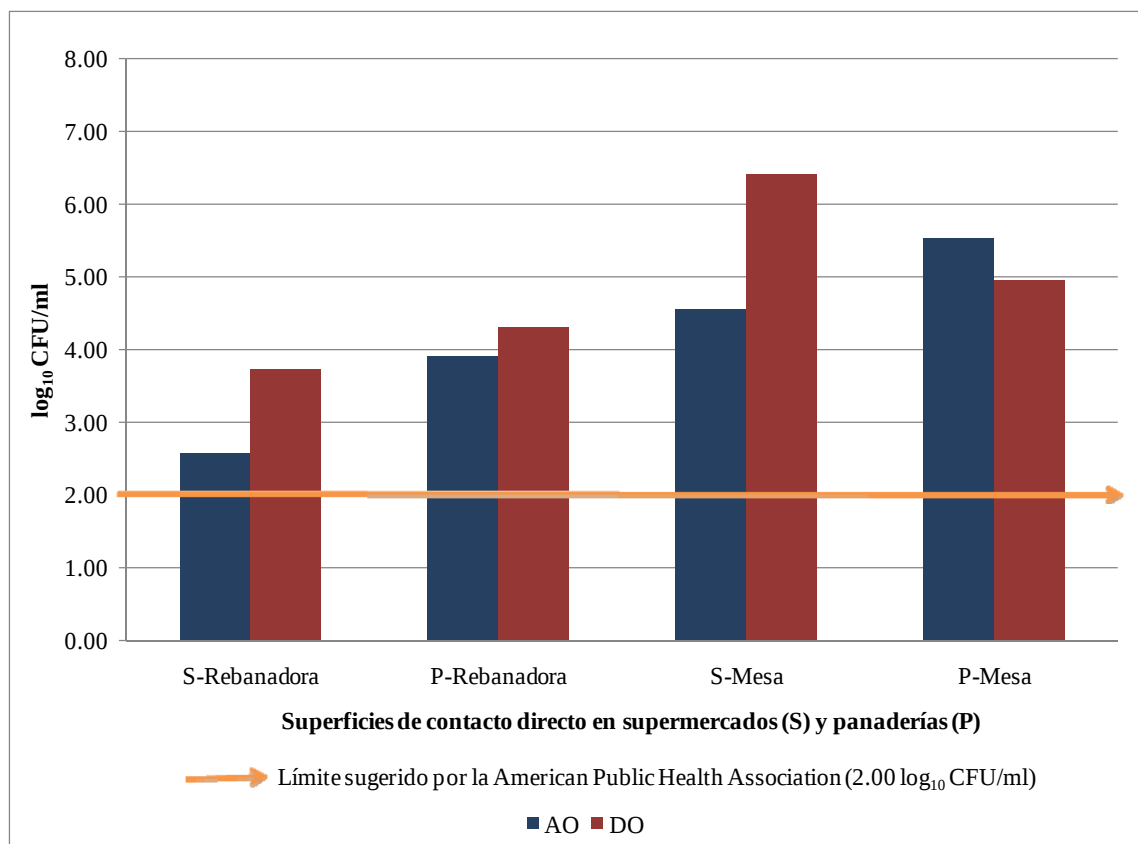
Establecimientos (Supermercados)	Mango Puerta Nevera (AO) (log₁₀ CFU/ml)	Mango Puerta Nevera (DO) (log₁₀ CFU/ml)	Drenaje (AO) (log₁₀ CFU/ml)	Drenaje (DO) (log₁₀ CFU/ml)
A	5.88	2.85	8.48	8.42
B	6.54	5.97	9.14	8.10
C	6.65	5.45	5.70	5.11
G	5.24	4.88	7.69	5.49
I	4.77	5.46	7.40	7.16
J	6.76	8.45	7.98	8.12
K	3.92	3.83	7.02	8.47
Media	5.68	5.27	7.63	7.27

Tabla 5. Recuento de bacterias aeróbicas en el mango de la puerta de la nevera y el drenaje (superficies de contacto indirecto) de las panaderías antes de operaciones (AO) y después de operaciones (DO).

Establecimientos (Panaderías)	Mango Puerta Nevera (AO) (log₁₀ CFU/ml)	Mango Puerta Nevera (DO) (log₁₀ CFU/ml)	Drenaje (AO) (log₁₀ CFU/ml)	Drenaje (DO) (log₁₀ CFU/ml)
D	4.87	<1	8.93	7.96
E	4.80	2.60	8.40	4.43
F	4.68	3.92	4.82	7.74
H	5.91	3.91	ND	ND
L	4.94	4.72	8.75	8.46
Media	5.04	3.03	7.73	7.15

*ND (No determinado) Indica que no se realizó muestreo debido a que no existe ningún tipo de drenaje en el lugar.

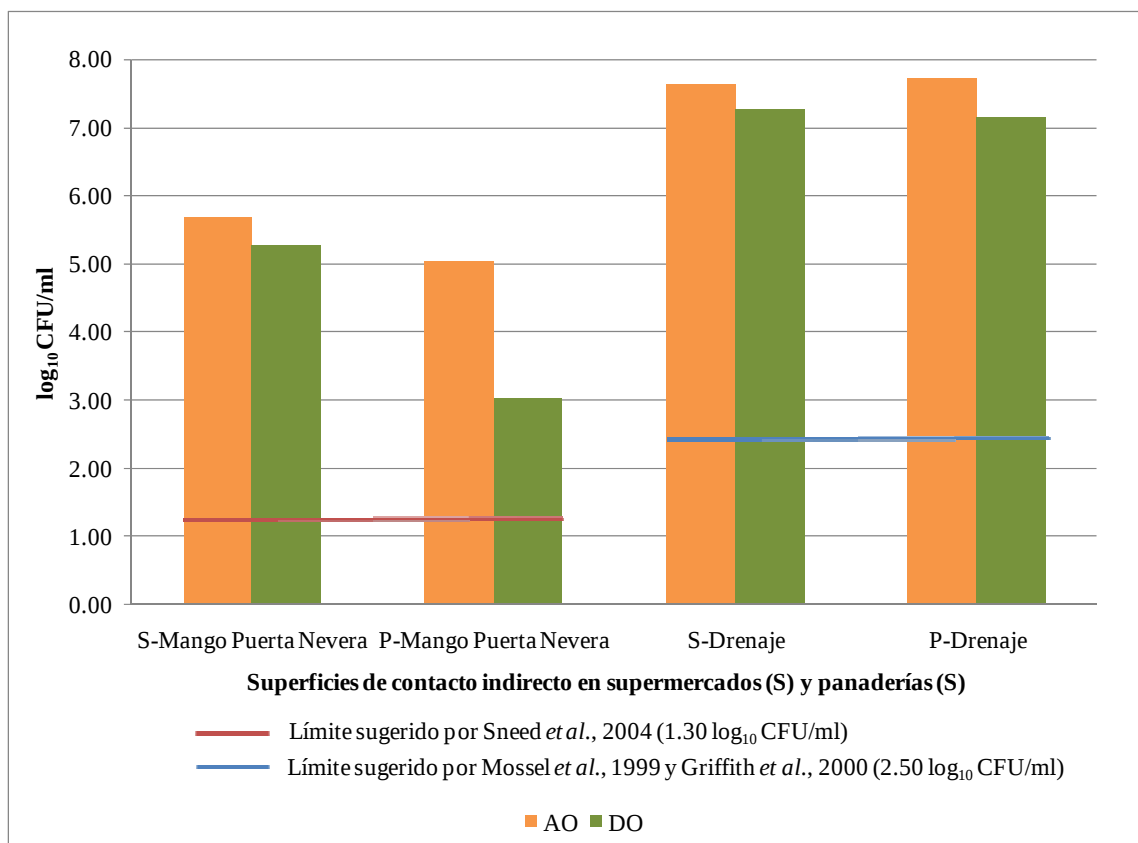
Gráfica 1. Promedio del recuento de bacterias aeróbicas en la rebanadora y la mesa (superficies de contacto directo) de los supermercados (S) y panaderías (P) antes de operaciones (AO) y después de operaciones (DO).



La gráfica 2 muestra los promedios de los supermercados y panaderías en el mango de la puerta de la nevera y el drenaje (superficies de contacto indirecto) AO y DO hallados en la prueba de APC. Los valores encontrados iban desde 3.03 a 7.73 log₁₀ CFU/ml. En el mango de la puerta de la nevera de los supermercados AO (5.68 log₁₀ CFU/ml) se encontró una densidad más alta que DO (5.27 log₁₀ CFU/ml) (Gráfica 2). Esto ocurrió en la misma superficie (mango de la puerta) en las panaderías donde se obtuvo 5.04 log₁₀ CFU/ml AO y 3.03 log₁₀ CFU/ml DO (Gráfica 2). El límite dado para esta superficie de contacto indirecto es de 1.30 log₁₀ CFU/ml (Sneed *et al.*, 2004). Los supermercados y panaderías estuvieron fuera del límite utilizado. En el drenaje, la otra superficie de contacto indirecto muestreada, el límite establecido es de 2.50 log₁₀ CFU/ml (Mossel *et al.*, 1999 y Griffith *et al.*, 2000). En las pruebas del drenaje de los supermercados (7.63 log₁₀ CFU/ml AO y 7.27 log₁₀ CFU/ml DO) y panaderías (7.73 log₁₀ CFU/ml AO y 7.15 log₁₀ CFU/ml DO) (Gráfica 2) ambos no pasaron, ya que se salieron del rango utilizado. El análisis estadístico de prueba T indicó que no existe diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en crecimiento microbiano atribuible a antes y después de operaciones (Apéndice 4) del mango de la puerta de la nevera y el drenaje (superficies de contacto indirecto) en los supermercados y panaderías.

La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos en la rebanadora y la mesa (contacto directo) en los siete supermercados analizados. Entre todas las muestras analizadas la rebanadora y mesa de los establecimientos C y K (Tabla 2) reflejan un crecimiento menor de uno, lo que sugiere que las superficies de éstos se encontraban sanitizadas AO. Las superficies de contacto con los alimentos en los restantes establecimientos presentaron un crecimiento entre 2.66-8.09 log₁₀ CFU/ml. Estos números sugieren que estas superficies no fueron higienizadas adecuadamente.

Gráfica 2. Promedio del recuento de bacterias aeróbicas en el mango de la puerta de la nevera y el drenaje (superficies de contacto indirecto) de los supermercados (S) y panaderías (P) antes de operaciones (AO) y después de operaciones (DO).



Se esperaba que todas las superficies de contacto con los alimentos tuvieran un recuento < 2.0 CFU/ml AO. Solo 5 de las 28 muestras resultaron con este límite, es decir que 17.9% pasó (Tabla 2). Las prácticas en estos establecimientos (supermercados y panaderías) son de limpiar y desinfectar al terminar operaciones al final del día y asumen que al comenzar operaciones en la mañana las superficies están debidamente higienizadas. Los resultados encontrados en este estudio indican que no había una desinfección adecuada, ya que 24 de las 28 muestras realizadas estuvieron fuera de límite (más de 2.0 CFU/ml).

El Código de Alimentos recomienda que las superficies de contacto directo sean limpiadas al menos luego de cuatro horas de trabajo. Al no encontrar diferencia significativa en el crecimiento microbiano AO y DO podría indicar que las superficies de los establecimientos (supermercados y panaderías) al comenzar operaciones en la mañana (AO) no estaban limpias y desinfectadas y que pasadas unas cuatro horas (DO) estaban igual y que por esta razón no se encuentra una diferencia significativa. Se esperaba que pasadas unas cuatro horas de trabajo los números aumentaran considerablemente o por el contrario si sanitizaban efectivamente el conteo iba a hacer similar al conteo de antes de comenzar a trabajar en la mañana.

La Tabla 3 muestra el recuento de bacterias aeróbicas de las superficies de contacto directo en las panaderías. La rebanadora AO de la panadería L es la única que indica un valor $< 1 \log_{10}$ CFU/ml que refleja estar libre de microorganismo. Esta superficie en los establecimientos E, H y L tuvo un aumento en el crecimiento de bacterias lo que sugiere que no sanitizaron luego de cuatro horas de trabajo. En el caso de la panadería D una disminución en la densidad fue observada porque las superficies fueron limpiadas antes de tomar el segundo muestreo. Se percibía un fuerte olor a sanitizante. Una de las 20 muestras resultó estar dentro

del límite de $2.00 \log_{10}$ CFU/ml (Tabla 3), lo que significa que el 5.0% pasó por lo que los resultados sugieren que las superficies no son sanitizadas adecuadamente.

No se encontraron diferencias significativas para las superficies de contacto indirecto (mango de la puerta de la nevera) en supermercados y panaderías (Apéndice 4). Un límite microbiano < 1.30 CFU/ml en el mango de la puerta de la nevera ha sido sugerido por Sneed y colaboradores (2004) en su estudio de evaluación microbiológica en las superficies de “Instituciones de Vivienda Asistida”. Todas las superficies en los establecimientos de venta al detalle AO y DO estaban por encima del límite (1.30 CFU/ml). En las superficies de contacto indirecto los supermercados A, B, C y G reflejan una densidad mayor de bacterias aeróbicas en el mango de la puerta de la nevera y en el drenaje AO (Tabla 4). Las panaderías muestran valores más altos en el mango de la puerta de la nevera y en el drenaje AO (Tabla 5), es decir se observó más crecimiento AO que DO; excepto en el establecimiento F donde el valor de crecimiento resultó ser menor en el drenaje AO ($4.82 \log_{10}$ CFU/ml) que DO ($7.74 \log_{10}$ CFU/ml). En estos establecimientos 1 de las 18 muestras resultó estar dentro del límite ($1.30 \log_{10}$ CFU/ml), o sea solo el 5.6% pasó. En estas muestras del mango de la puerta de la nevera un crecimiento mayor AO puede deberse a que la superficie no haya sido saneada correctamente el día anterior dando base a que proliferen estas bacterias aeróbicas. Un conteo menor DO puede corresponder a que a medida que los empleados entran y salen de la nevera se llevan las bacterias en sus manos (o guantes) transfiriéndolas a otra superficie o al producto.

En este estudio los coliformes fueron analizados dentro de las pruebas microbiológicas. La prueba T no encontró diferencias significativas en la densidad de los coliformes totales en las superficies de contacto directo e indirecto AO y DO dentro de los supermercados y panaderías (Apéndice 5). En la rebanadora AO y DO de supermercados (Tabla 6) y panaderías (Tabla 7) el crecimiento fue $< 1 \log_{10}$ CFU/ml, por lo que el 100% de las pruebas estuvieron

dentro del rango ($2.00 \log_{10}$ CFU/ml). En la mesa se obtuvo 4.40, 2.74, 3.44 y $4.44 \log_{10}$ CFU/ml AO en los supermercados A, B, G e I respectivamente (Tabla 6). En esta misma superficie DO el crecimiento fue $3.54 \log_{10}$ CFU/ml en el establecimiento G y $2.86 \log_{10}$ CFU/ml en el K) (Tabla 6). Un $3.08 \log_{10}$ CFU/ml fue el resultado obtenido en la mesa AO en la panadería F y $4.93 \log_{10}$ CFU/ml en la misma área DO en el establecimiento L (Tabla 7). El restante indicó un crecimiento $<1 \log_{10}$ CFU/ml en las muestras. En la mesa de los supermercados AO y DO 6 de las 14 muestras se encontraron fuera del límite de $2.00 \log_{10}$ CFU/ml (42.9% no pasó) (Tabla 6). En la mesa de las panaderías 2 de las 10 muestras no pasaron, o sea que el 20.0% de las pruebas estuvieron fuera de límite (Tabla 7). En las superficies de contacto directo con los alimentos específicamente la rebanadora de los supermercados y panaderías los resultados obtenidos eran los esperados. Esto significa que estuvieron dentro del límite, ya que en estas solo se trabaja con alimentos listos para consumo. En las mesas de los supermercados 8 de 14 estaban dentro de los límites y en las panaderías 8 de 10 pasaron. Esto puede deberse a que en estos cuartos de procesamiento (supermercados) se trabajan o se utilizan las mesas tanto para alimentos listos para consumo como para carnes crudas, ocasionando que 42.0% excedieran los límites en la mesa de los supermercados. En las panaderías por el contrario no se espera que se trabaje con carnes crudas en las mesas por lo que un 80% pasaron la prueba.

En las superficies de contacto indirecto 2.54, 2.61 y $2.42 \log_{10}$ CFU/ml fue el crecimiento en el mango de la puerta DO en el supermercado C (Tabla 8), AO en la panadería D (Tabla 9) y AO en el L respectivamente (Tabla 9). En el mango de la puerta de la nevera de los supermercados el 100% de las pruebas pasaron (dentro del límite $1.30 \log_{10}$ CFU/ml). Esta superficie en las panaderías 1 de 10 muestras realizadas estuvo fuera de límite. En el drenaje de los supermercados 9 de las 14 muestras no pasaron, lo que significa que un 64% estuvieron

fuera del límite utilizado ($2.5 \log_{10}$ CFU/ml) (Tabla 8). Esta misma superficie muestreada en las panaderías 6 de las 8 muestras tomadas se salieron del límite, es decir que el 75% de las pruebas no pasaron (Tabla 9).

Tabla 6. Densidad de coliformes totales en la rebanadora y la mesa (superficies de contacto directo) de los supermercados antes de operaciones (AO) y después de operaciones (DO).

Establecimientos (Supermercados)	Rebanadora (AO) ($\log_{10}$ CFU/ml)	Rebanadora (DO) ($\log_{10}$ CFU/ml)	Mesa (AO) ($\log_{10}$ CFU/ml)	Mesa (DO) ($\log_{10}$ CFU/ml)
A	<1	<1	4.40	<1
B	<1	<1	2.74	<1
C	<1	<1	<1	<1
G	<1	<1	3.44	3.54
I	<1	<1	4.44	<1
J	<1	<1	<1	<1
K	<1	<1	<1	2.86

Tabla 7. Densidad de coliformes totales en la rebanadora y la mesa (superficies de contacto directo) de las panaderías antes de operaciones (AO) y después de operaciones (DO).

Establecimientos (Panaderías)	Rebanadora (AO) ($\log_{10}$ CFU/ml)	Rebanadora (DO) ($\log_{10}$ CFU/ml)	Mesa (AO) ($\log_{10}$ CFU/ml)	Mesa (DO) ($\log_{10}$ CFU/ml)
D	<1	<1	<1	<1
E	<1	<1	<1	<1
F	<1	<1	3.08	<1
H	<1	<1	<1	<1
L	<1	<1	<1	4.93

Tabla 8. Densidad de coliformes totales en el mango de la puerta de la nevera y el drenaje (superficies de contacto indirecto) de los supermercados antes de operaciones (AO) y después de operaciones (DO).

Establecimientos (Supermercados)	Mango Puerta Nevera (AO) (log₁₀ CFU/ml)	Mango Puerta Nevera (DO) (log₁₀ CFU/ml)	Drenaje (AO) (log₁₀ CFU/ml)	Drenaje (DO) (log₁₀ CFU/ml)
A	<1	<1	<1	<1
B	<1	<1	5.65	3.88
C	<1	2.54	<1	<1
G	<1	<1	5.54	2.59
I	<1	<1	<1	3.54
J	<1	<1	5.60	5.02
K	<1	<1	5.54	5.98

Tabla 9. Densidad de coliformes totales en el mango de la puerta de la nevera y el drenaje (superficies de contacto indirecto) de las panaderías antes de operaciones (AO) y después de operaciones (DO).

Establecimientos (Panaderías)	Mango Puerta Nevera (AO) (log₁₀ CFU/ml)	Mango Puerta Nevera (DO) (log₁₀ CFU/ml)	Drenaje (AO) (log₁₀ CFU/ml)	Drenaje (DO) (log₁₀ CFU/ml)
D	2.61	<1	6.70	5.93
E	<1	<1	5.44	<1
F	<1	<1	<1	4.01
H	<1	<1	ND	ND
L	2.42	<1	6.66	7.97

***ND** (No determinado) Indica que no se realizó muestreo debido a que no existe ningún tipo de drenaje en el lugar.

No se encontraron diferencias significativas para los valores de *E. coli* AO y DO en la rebanadora, la mesa (superficies de contacto directo), el mango de la puerta de la nevera y el drenaje (superficies de contacto indirecto) de los supermercados y panaderías (Apéndice 6). El único resultado obtenido para la prueba de *E. coli* en las superficies de contacto directo (rebanadora y mesa) AO y DO fue $2.54 \log_{10}$ CFU/ml en la mesa AO del supermercado A (Tabla 10). El restante indicó un crecimiento $<1 \log_{10}$ CFU/ml en las muestras (Tabla 10 y Tabla 11). Para las superficies de contacto indirecto, $4.40 \log_{10}$ CFU/ml fue el resultado conseguido en el drenaje AO en el establecimiento B (Tabla 12). El restante indicó un crecimiento $<1 \log_{10}$ CFU/ml en las muestras (Tabla 12 y Tabla 13). En términos generales al no encontrar recuentos altos de *E. coli* se podría inferir que el personal de estos establecimientos cumple con las prácticas higiénicas personales tales como el lavado de manos.

Tabla 10. Densidad de *Escherichia coli* en la rebanadora y la mesa (superficies de contacto directo) de los supermercados antes de operaciones (AO) y después de operaciones (DO).

Establecimientos (Supermercados)	Rebanadora (AO) (log₁₀ CFU/ml)	Rebanadora (DO) (log₁₀ CFU/ml)	Mesa (AO) (log₁₀ CFU/ml)	Mesa (DO) (log₁₀ CFU/ml)
A	<1	<1	2.54	<1
B	<1	<1	<1	<1
C	<1	<1	<1	<1
G	<1	<1	<1	<1
I	<1	<1	<1	<1
J	<1	<1	<1	<1
K	<1	<1	<1	<1

Tabla 11. Densidad de *Escherichia coli* en la rebanadora y la mesa (superficies de contacto directo) de las panaderías antes de operaciones (AO) y después de operaciones (DO).

Establecimientos (Panaderías)	Rebanadora (AO) (log₁₀ CFU/ml)	Rebanadora (DO) (log₁₀ CFU/ml)	Mesa (AO) (log₁₀ CFU/ml)	Mesa (DO) (log₁₀ CFU/ml)
D	<1	<1	<1	<1
E	<1	<1	<1	<1
F	<1	<1	<1	<1
H	<1	<1	<1	<1
L	<1	<1	<1	<1

Tabla 12. Densidad de *Escherichia coli* en el mango de la puerta de la nevera y el drenaje (superficies de contacto indirecto) de los supermercados antes de operaciones (AO) y después de operaciones (DO).

Establecimientos (Supermercados)	Mango Puerta Nevera (AO) (log ₁₀ CFU/ml)	Mango Puerta Nevera (DO) (log ₁₀ CFU/ml)	Drenaje (AO) (log ₁₀ CFU/ml)	Drenaje (DO) (log ₁₀ CFU/ml)
A	<1	<1	<1	<1
B	<1	<1	4.40	<1
C	<1	<1	<1	<1
G	<1	<1	<1	<1
I	<1	<1	<1	<1
J	<1	<1	<1	<1
K	<1	<1	<1	<1

Tabla 13. Densidad de *Escherichia coli* en el mango de la puerta de la nevera y el drenaje (superficies de contacto indirecto) de las panaderías antes de operaciones (AO) y después de operaciones (DO).

Establecimientos (Panaderías)	Mango Puerta Nevera (AO) (log ₁₀ CFU/ml)	Mango Puerta Nevera (DO) (log ₁₀ CFU/ml)	Drenaje (AO) (log ₁₀ CFU/ml)	Drenaje (DO) (log ₁₀ CFU/ml)
D	<1	<1	<1	<1
E	<1	<1	<1	<1
F	<1	<1	<1	<1
H	<1	<1	ND	ND
L	<1	<1	<1	<1

*ND (No determinado) Indica que no se realizó muestreo debido a que no existe ningún tipo de drenaje en el lugar.

Los datos recopilados para la prueba de bioluminiscencia de ATP se aprecian en la Tabla 14 donde las medidas de ATP van desde 0 hasta 8,827 RLU's ("Relative Light Units") (Tabla 14). De acuerdo a las instrucciones del fabricante del luminómetro lecturas menores de 25 indican que la superficie está limpia. Las lecturas con valores entre 26 y 99 advierten de que la superficie no está adecuadamente limpia. Si el valor es mayor de 100, se considera que la superficie está sucia. Estas escalas varían dependiendo del equipo utilizado. El representante del equipo indicó que estas escalas están sujetas al lugar, tipo de superficie y tipo de industria al cual se desea aplicar. De acuerdo a los datos obtenidos más de la mitad (57.1%) de las pruebas realizadas a la rebanadora en los supermercados AO pasaron y se observó un aumento a 85.7% de estas pruebas DO (Gráfica 3). En la rebanadora un 4.3% de las pruebas fallaron AO y 0.0 % DO. El restante se encontraba en el margen de precaución (28.6% AO y 14.3% DO en la rebanadora) (Gráfica 3). En las panaderías un 80.0% de las pruebas que se realizaron en la rebanadora pasaron AO y DO (se mantuvo igual AO y DO). No se encontró pruebas que fallaran AO aumentando a 20.0% DO (Gráfica 3). Ocurrió lo contrario para las pruebas que estuvieron en precaución donde se obtuvo un 20.0% AO y este margen bajó a 0.0% DO. En términos generales se mantiene un porcentaje alto en pruebas que pasaron tomadas de la rebanadora de los supermercados DO y en las panaderías AO y DO (Gráfica 3).

Tabla 14. Medidas de ATP (RLU) obtenidas en las pruebas de bioluminiscencia de las superficies de contacto directo e indirecto en los supermercados y panaderías utilizando un luminómetro.

Establecimientos	Lugares							
	Contacto Directo				Contacto Indirecto			
	Rebanadora (AO)	Rebanadora (DO)	Mesa (AO)	Mesa (DO)	Mango puerta nevera (AO)	Mango puerta nevera (DO)	Drenaje (AO)	Drenaje (DO)
A	19	1	5,081	460	7,034	2	134	824
B	95	2	76	0	4,246	4,280	4,406	3,264
C	9	1	911	770	7,135	7,967	1,235	431
D	23	3	255	0	39	0	8,827	1,184
E	87	10	290	9	508	276	1,751	526
F	5	0	0	12	116	139	0	0
G	102	4	25	2	948	433	2,112	52
H*	3	506	18	674	812	418	ND	ND
I	47	3	3,063	3,315	4,433	5,515	227	3,341
J	2	32	211	3	8,243	8,602	1,231	1
K	5	4	5	3	1,100	4,391	6,548	112
L	0	2	5	5	13	18	370	5,417

*ND (No determinado) Indica que no se realizó muestreo debido a que no existe ningún tipo de drenaje en el lugar.

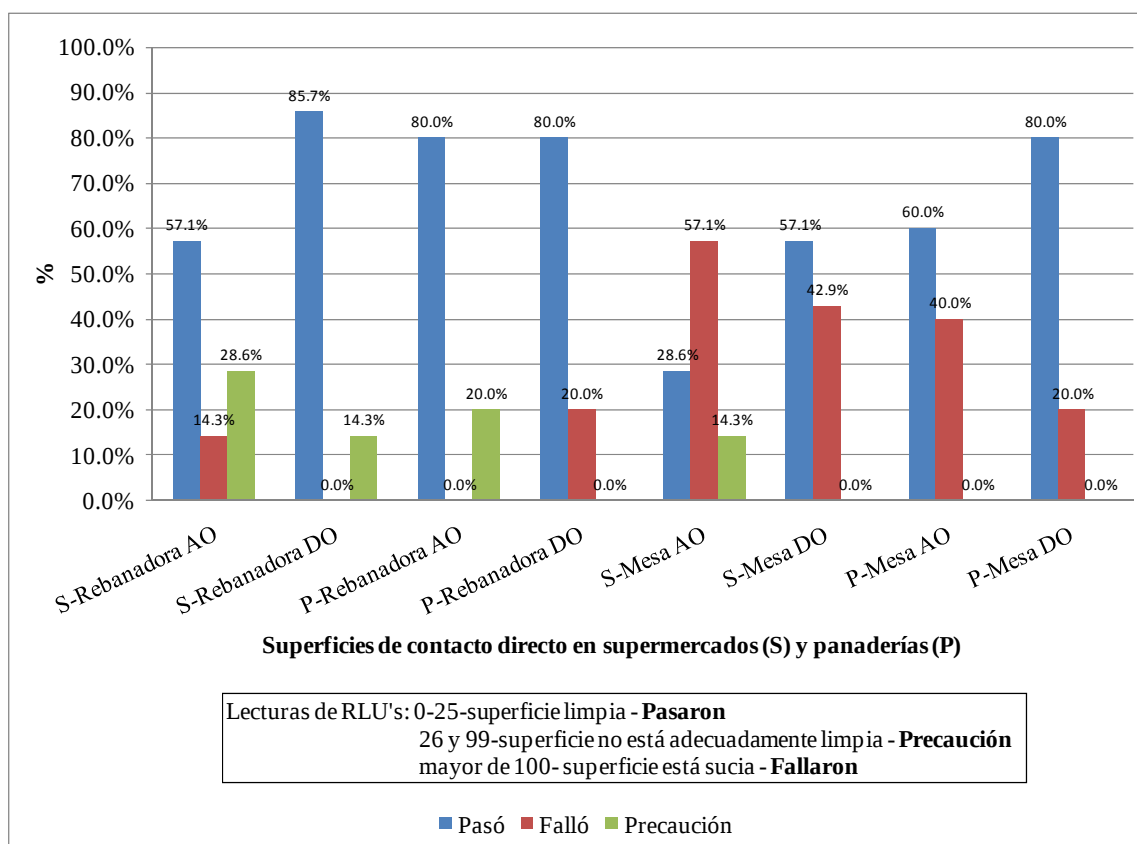
A, B, C, G, I, J, K → Supermercados

D, E, F, H, L → Panaderías

Interpretación de resultados en el luminómetro: Lecturas menores de 25 indican que la superficie está limpia. Las lecturas con valores entre 26 y 99 advierten de que la superficie no está adecuadamente limpia. Si es mayor de 100, se considera que la superficie está sucia.

En la mesa de los supermercados un 28.6% de las pruebas pasaron AO y cuatro horas después aumentaron a 57.1% (Gráfica 3). Un 57.1% de las pruebas fallaron AO disminuyendo a 42.9% DO. En margen de precaución estuvieron 4.3% de las pruebas AO reduciéndose a 0.0% DO (Gráfica 3). Las pruebas en la mesa de las panaderías AO el 60.0% pasaron donde estas aumentaron a 80.0 % DO (Gráfica 3). El 40.0% de las pruebas fallaron AO donde este margen bajó a 20.0% DO. No se encontró pruebas en precaución AO y DO (Gráfica 3).

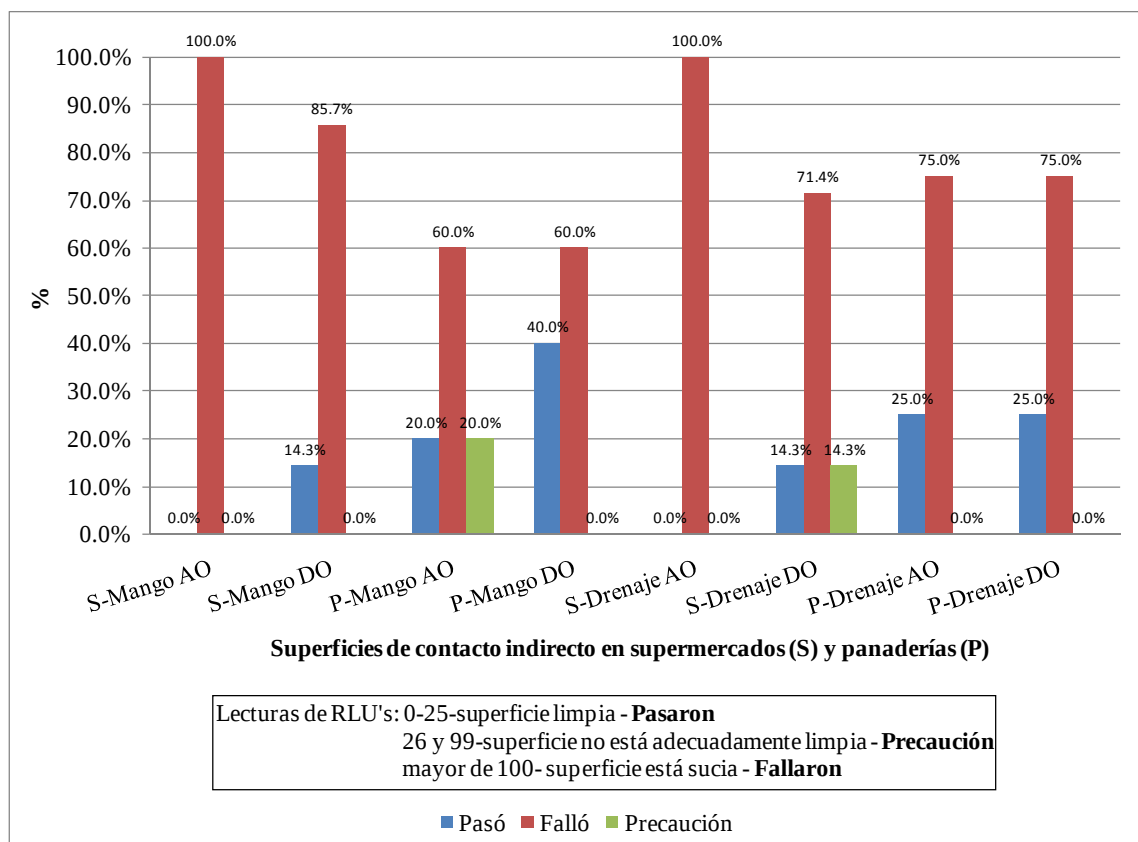
Gráfica 3. Resultados de las pruebas de bioluminiscencia de ATP (Relative Light Units (RLU's) en %) que pasaron, fallaron y están en precaución de la rebanadora y la mesa (contacto directo) en los supermercados y panaderías antes de comenzar operaciones (AO) y después de cuatro horas de trabajo (DO).



En el mango de la puerta de la nevera y en el drenaje (superficies de contacto indirecto) siempre 60.0% o más de las pruebas fracasaban AO y DO en supermercados y panaderías (Gráfica 4). Esto puede sugerir que la limpieza y desinfección de estos lugares es pobre donde resulta que las mismas están sucias AO y DO (Gráfica 4). De acuerdo a los datos obtenidos el 100.0% de las pruebas realizadas al mango de la puerta de la nevera en los supermercados fallaron AO (Gráfica 4). Después de cuatro horas de trabajo el 85.7 % fallaron y el restante pasó. En las panaderías un 60.0% de las pruebas realizadas fallaron AO, el 20.0% pasaron y el resto se mantuvo en precaución (Gráfica 4). En esta superficie el porcentaje de pruebas que pasó DO se mantuvo igual que AO. El restante de las pruebas pasaron (40.0%).

En el drenaje de los supermercados el 100.0% de las pruebas fallaron AO (Gráfica 4). Después de cuatro horas de trabajo esto disminuyó a 71.4%, 14.3% de las pruebas pasaron y el restante estaba en precaución. En el drenaje de las panaderías un 75.0% de las pruebas fallaron y 25.0 % pasaron AO y DO, es decir no hubo cambio para AO y DO (Gráfica 4). Cuando se comparan estas gráficas (3 y 4) en términos generales más de la mitad de las pruebas realizadas a la rebanadora y a la mesa pasaban AO y DO donde por el contrario en el mango de la puerta de la nevera y el drenaje los porcentajes altos se encuentran en las pruebas que fallaron AO y DO. Esto era lo esperado.

Gráfica 4. Resultados de las pruebas de bioluminiscencia de ATP (Relative Light Units (RLU's) en %) que pasaron, fallaron y están en precaución del mango de la puerta de la nevera y el drenaje (contacto indirecto) en los supermercados y panaderías antes de comenzar operaciones (AO) y después de cuatro horas de trabajo (DO).



En un estudio realizado por Román (2008) se verificó la efectividad del procedimiento de sanitización en una planta procesadora de atún utilizando la bioluminiscencia de ATP y el recuento total aeróbico. En el estudio no se encontró diferencia significativa para los valores obtenidos después de la sanitización y antes de la producción. Tampoco pudo establecer una correlación entre $\log_{10}$ CFU/ml vs los RLU. Velázquez y Feirtag (1997) y Green *et al.* (1999) encontraron que ingredientes activos como el hipoclorito de sodio, detergentes ácidos no formadores de espuma e hidróxido de sodio (soda cáustica) han presentado que dan falsos positivos o falsos negativos. En esta tesis no se recopiló la información necesaria de los desinfectantes utilizados por los establecimientos para concluir si esta es una de las causas para no encontrar relación. Es éste uno de los factores que hay que considerar ya que con la presencia de estos ingredientes activos los valores de RLU pudieran haber sido aumentado o disminuido.

Hay que mencionar que no se consideró al tomar las muestras si las superficies estaban húmedas o secas. Se observó que algunas superficies estaban húmedas y otras secas. Por ser el agua esencial para el crecimiento microbiano, nichos pueden haberse desarrollado en la superficie húmeda (Musgrove *et al.*, 2004 y Gregerson, 2005). La presencia de esta agua podría haber afectado de alguna forma los valores de CFU o RLU. Los valores de CFU pueden haber sido afectado por las biopelículas y los valores de RLU al aumentar o disminuir su señal por la mezcla de agua y sanitizante (Román, 2008).

CONCLUSIONES

- Los resultados de este estudio demuestran que los programas de limpieza y desinfección no son aplicados efectivamente.
- Aún cuando se esperaba que AO las superficies estuvieran limpias las observaciones visuales, las pruebas microbiológicas y de bioluminiscencia de ATP realizadas demostraron que no era así.
- No existe diferencia significativa antes de las operaciones (AO) y después de cuatro horas de trabajo (DO) en las superficies de contacto directo e indirecto con los alimentos en supermercados y panaderías desde el punto de vista microbiológico.
- No se pudo establecer una relación entre las unidades formadoras de colonia (CFU) y unidades relativas de luz (RLU).
- Con los resultados obtenidos en este estudio no se puede aceptar o descartar el uso de un luminómetro para verificar la efectividad de los procedimientos de limpieza y desinfección en establecimientos de venta al detalle y delicatessen. Los hallazgos sugieren que se requiere un mayor número de muestreos en un mismo establecimiento controlando algunas variables tales como: tipos de agentes de limpieza y desinfección, si las superficies estaban secas o húmedas, entre otros para poder aceptar o rechazar con mayor certeza.

RECOMENDACIONES

- Ampliar este estudio a otras regiones y a establecimientos de cadenas multinacionales para comparar si hay un comportamiento similar. El número de muestras por lugar debe aumentarse para tener una variabilidad más amplia.
- Se deben conocer más detalladamente los programas de limpieza y sanitización llevados a cabo en estos establecimientos para evitar que estos influyan en los resultados a obtenerse y minimizar errores experimentales.
- Utilizar los datos actuales para observar la relación que existe entre otras variables de interés que pudieron no tenerse en cuenta en el presente estudio, como por ejemplo: la variedad de detergentes y desinfectantes utilizados, las áreas de muestreo húmedas o secas, la calidad microbiológica de los alimentos listos para el consumo y su relación con la densidad microbiana final.
- Utilizar cuestionarios para evaluar los conocimientos y las prácticas empleadas por el personal que labora en estos lugares para verificar si hay relación entre la efectividad de los programas de limpieza con el conocimiento de los empleados.
- Compartir estos hallazgos con el Departamento de Salud para poder establecer en conjunto nuevas estrategias de intervención para monitorear más de cerca que los establecimientos tengan una limpieza efectiva.

BIBLIOGRAFÍA

Bell, B. P., M. Goldoft, P. M. Griffim, M. A. Davis, D. C. Gordon, P. I. Tarr. 1994. A multistate outbreak of *Echerichia coli* O157:H7 associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington Experience. JAMA. 272:1349-53.

Buchanan, R. L. 1991. Microbiological criteria food cooked ready to eat shrimp and crabmeat. Food Technol. 4: 157-160.

Burgos, C., L. Murillo, I. Gutiérrez y J. Arias. 2002. Comparación de los métodos de bioluminiscencia y recuento en placa como control de calidad en producto terminado de bebida de malta y refrescos pasteurizados en una empresa de Bogotá D.C. Revista de la Facultad de Farmacia 43: 25-28.

Buttiaux, R. y D. A. Mossel. 1961. The significance of various organisms of fecal origin in foods and drinking water. J. Appl. Bacteriol. 24:353-64.

Buzby, J. C., T. Roberts, C. T. Jordan y J. M. MacDonald. 1996. Bacterial Foodborne Disease: Medical Costs and Productivity Losses. Agricultural Economics Report No. (AER741).

Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN), Food Safety and Inspection Service (FSIS) y Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2001. Draft Assessment of the Relative Risk to Public Health from Foodborne *Listeria monocytogenes* Among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods. U.S. Food and Drug Administration. <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmrisk1.html>.

Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN). 2001. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Bacteriological Analytical Manual (BAM). Eight edition, Revision A. Association of Official Analytical Chemists International. Division of Microbiology, Gaithersburg, MD. <http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>.

Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN). 2001. U.S. Food and Drug Administration (FDA). FDA Food Code (2001) and Supplement to the 2001 FDA Food Code (2003). Department of Health and Human Services. Public Health Service, College Park, MD. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fc05-toc.html>

Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN). 1992. Foodborne Pathogenic Microorganism and Natural Toxins Handbook. U.S. Food and Drug Administration (FDA). <http://www.foodsafety.gov/~mow/intro.html>.

Dawkins, G. S., J. B. Hollingsworth y M. A. E. Hamilton. 2005. Incidences of problematic organisms on Petrifilm aerobic count plates used to enumerate selected meat and dairy products. *J. Food Prot.* 68: 1506-1511.

De Caloni, I. B. y F. Fernández-Coll. 1983. Elaboration, sensory and microbiological evaluation of mofongo. *J. Agri. Univ. P.R.* 67(2):95-99.

Escherich, T. 1885. Die Darmbakterien des Neugeborenen und Sauglings. *Fortschr. Med.* 3:515-522, 547-54.

Evancho, G. M., W. H. Sveum, L. J. Moberg y J. F. Frank. 2001. Microbiological monitoring of the food processing environment. En: F. Pouch Downes y K. Ito (ed.). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 4th Ed., pp. 25-35. American Public Health Association (APHA), Washington, DC.

Evans, H. S., P. Madden, C. Douglas, G. K. Adak, S. J. O'Brien, T. Djuretic, P. G. Wall y R. Stanwell-Smith. 1998. General outbreaks of infectious intestinal disease in England and Wales: 1995 y 1996. *Comm. Dis. Publ. Health.* 1:165-171.

FAO/WHO. 1993. The role safety in health and development. Report of the Joint Expert Committee on Food Safety, Geneva: World Health Organization.

Farber, J. M., E.M. Daley, M. T. Mackie y B. II. Limerick. 2000. A small outbreak of listeriosis potentially linked to the consumption of imitation crab meat. *Microbiol.* 31(2): 100-104.

Gilbert, R. J., J. de Louvois, T. Donovan, C. Little, K. Nye, C. D. Ribeiro. 2000. Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat foods sampled at the point of sale. *Commun. Dis. Public Health.* 3:163-7.

González, V. 2004. Manual Curso Certificado: Inocuidad de Alimentos, Segunda edición. Lección 2 y 3. Servicio de Extensión Agrícola. Recinto Universitario de Mayagüez, Mayagüez, PR.

Green, T. A., S. M. Russell y D. L. Fletcher. 1999. Effect of chemical cleaning agents and commercial sanitizers on ATP bioluminescence measurements. *J. Food. Prot.* 62:86-90.

Gregerson, J. 2005. Clean sweep sanitizers and disinfectants are only as good as the SSOPs that govern their use. *Meat Marketing and Technology.* January. 13: 53-58.

Griffith, C. J., R. A. Cooper, J. Gilmore, C. Davis y M. Lewis. 2000. An evaluation of hospital cleaning regimes and standards. *J. Hosp. Infect.* 45:19-28.

Griffiths, M. W. 1997. Rapid microbiological methods with hazard analysis critical control point. *J. AOAC Int.* 80:1143-1150.

Hamilton, M. A. 2002. Testing antimicrobials against biofilm bacteria. J. AOAC Int. 85:479-485.

Ho Park, Y., K. Seok Seo, J. Sam Ahn, H. San Yoo y S. Pil Kim. 2001. Evaluation of the Petrifilm plate method for the enumeration of aerobic microorganisms and coliforms in retailed meat samples. J. Food Prot. 64:1841-1843.

Huss, H. H. 1994. Assurance of seafood quality. Fao Fisheries Technical Papers-T334. ISBN: 9253034467. pp 169.
<http://www.fao.org/DOCREP/003/T1768E/T1768E00.htm#TOC>.

Jay, J. M. 1994. Microbiología Moderna de los Alimentos. 3ra Edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España Cap. 17:487-97.

Kornacki, J.L. y J.L. Johnson. 2001. Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. En: F. Pouch Downes y K. Ito (ed.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th Ed., pp. 69-82. American Public Health Association (APHA), Washington, DC.

Leon, M. B. y J. A. Albrecht. 2004. Verification of adenosine triphosphate (ATP) bioluminescence to measure levels of cleanliness on plastic food-contact surfaces. Poster 49D-4. IFT Meeting, Nevada.

Lin, F. Y., J. G. Morris, D. Trump, D. Tilghman, PK. Wood. 1998. Investigation of an outbreak of *Salmonella enteritidis* gastroenteritis associated with consumption of eggs in a restaurant chain in Maryland. Am J Epidemiol. 128:839-44.

Madl, L. S. 1997. Sanitation in a flash. Food Processing. Mayo: 100.

Mazzotta, A. S. 2001. Thermal inactivation of stationary-phase and salt-adapted *Listeria monocytogenes* during post process pasteurization of surimi- based imitation crab meat. J. Food Prot. 64: 483-485.

McCabe-Sellers, B. y S. Beattie. 2004. Emerging trends in foodborne illness surveillance and prevention. J. Am Diet Assoc. 104:1708-17.

Mead, P. S., L. Slutsker, V. Dietz y L. F. McCagi. 1999. Food-related illness and death in the United States Emerg Infect Dis, 5:607-25.

Medeiros, L., P. Kendall, V. Hillers, G. Chen y S. Dimascola. 2003. Identification and Classification of Consumer Food-Handling Behaviors for Food Safety Education. The Ohio State University, Columbus, USA, 19: 556-72.

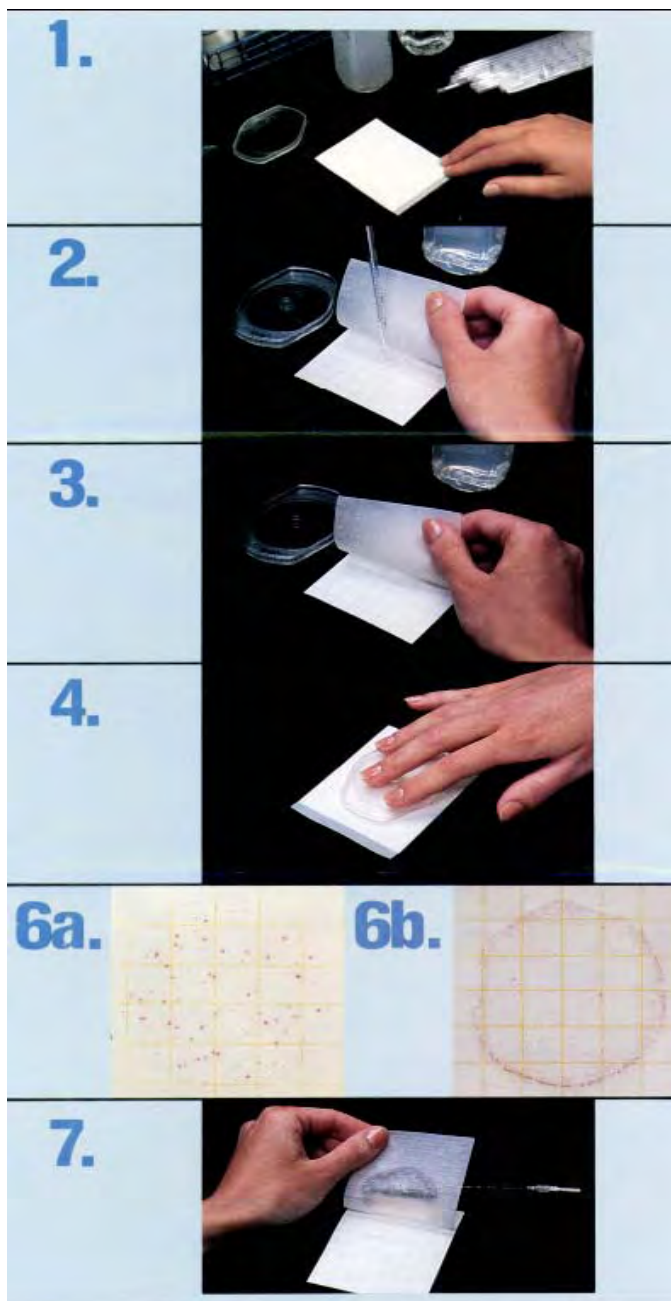
Merriam-Webster Online Dictionary (basado en la versión publicada de Merriam-Webster. 2003. Merriam-Webster's Collegiate® Dictionary, Eleventh Edition, Massachussetts).
<http://www.merriam-webster.com/dictionary/indicator>.

- Michino, H., K. Araki, S. Minami, S. Takaya, N. Sakai. 1999. Massive outbreak of *Echerichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am J Epidemiol.* 150:787-96.
- Mossel, D. A. A., J. T. Jansen y C. B. Struijk. 1999. Microbiological safety assurance applied to smaller catering operations world-wide. *Food Control* 10:195-211.
- Musgrove, M. T., D. R. Jones, J. K. Northcutt, P. A. Curtis, K. E. Anderson, D. L. Fletcher y N. A. Cox. 2004. Survey of shell egg processing plant sanitation programs: effects on non-egg contact surfaces. *J. Food Protect.* 67: 2801-2804.
- Odumen, J., S. Mitchell, D. Alves, A. Lynch, A. Yee, S. Wang, S. Yliadis y G. Febber. 1997. Assessment of the microbiological quality of ready-to-use-vegetables for health-care food service. *J. Food Protect.* 60:954-60.
- Pérez-Rodríguez, F., E. C. D. Todd, A. Valero, E. Carrasco, R. M. García y G. Zurera. 2006. Linking quantitative exposure assessment and risk management using the food safety objective concept: an example with *Listeria monocytogenes* in different cross-contamination scenarios. *J. Food Protection.* 69:2384-2394.
- Poysky, F. T., R. N. Paranjpye, L. C. Lashbrook, M. E. Peterson, G. A. Pelroy y M. W. Eklund. 1993. Selective and differential medium for isolation of *Listeria monocytogenes* from foods. *J. Food Prot.* 56: 326-329.
- Priego, R., L. M. Medina y R. Jordano. 2000. Evaluation of Petrifilm series 2000 as a possible rapid method to count coliforms in foods. *J. Food Prot.* 63: 1137-1140.
- Raccach, M. y C. Henningsen. 1997. The effects of chloride salt on *Yersinia enterocolitica* in meat. *Food Microbiology* 14:431-438.
- Román Rivera, E.U. 2008. The effectiveness of the firefly rapid method in determining sanitation procedures at a tuna processing plant. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, P.R., 12 pp.
- Russell, S. M. 2001-2002. A mini-guide to rapid methods for monitoring sanitation efficiency. *Food Safety Magaz.*
- Russell, S. M. 1995. Sanitation procedures and HACCP. *Broiler Industry*, October, pp 22-38.
- Ryser, E. T., y C. W. Donnelly. 2001. *Listeria*. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4th ed. APHA Publ. Washington, D.C.: 343-356.
- Schardinger, F. 1892. Über das Vorkommen Gährung erregender Spaltpilze im Trinkwasser und ihre Bedeutung für die hygienische Beurtheilung desselben. *Wien. Klin. Wachr.* 5:403-405, 421-23.

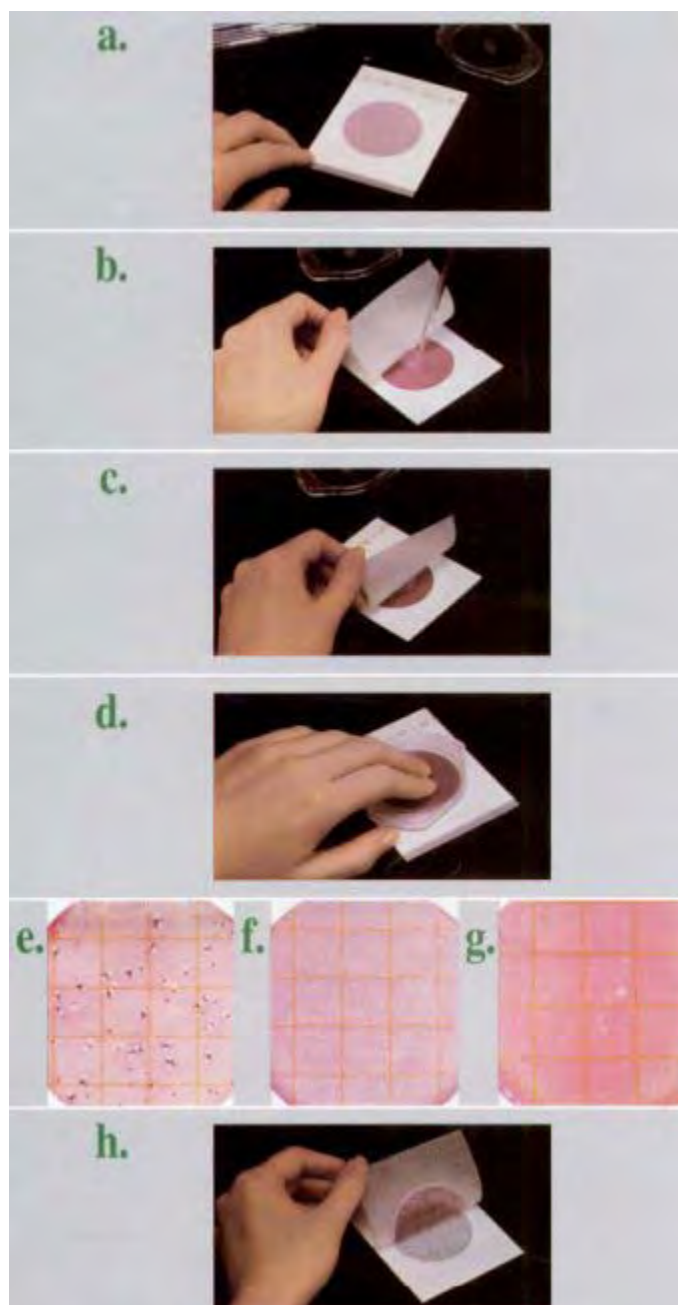
- Silliker, Inc. and Biotrace International, Inc. Food Safety & Quality Solutions. 2005. Swabbing Techniques for Sampling the Environment and Equipment, pp 37-58.
- Slade, P. J. 2002. Verification of effective sanitation control strategies. Food Safety Magaz. Febrero/Marzo, pp 24-29 y 42.
- Smith, T. 1895. Notes on *Bacillus coli commune* and related forms, together with some suggestions concerning the bacteriological examination of drinking water. Amer. J. Med. Sci. 110:283-302.
- Sneed, J., C. Strohbehn, S.A. Gilmore y A. Mendonca. 2004. Microbiological evaluation of foodservice contact surfaces in Iowa assisted-living facilities. J. Amer. Diet. Assoc. 104: 1722-24.
- Stanley, A. 2004. Incidence of *Listeria* in seafood.
<http://www.web.ukonline.co.uk/anthonystanley/dissonline.html>.
- Tompkin, B. A. 2002. Control of *Listeria* in the food-processing environment. J. Food Protect. 65: 709-723.
- Tompkin, R. B., V. N. Scott, D. T. Bernard, W. H. Sveum y K. S. Gombas. Traducido por Fernández, C. y O. A. Oyarzábal. 2001. Pautas para prevenir la contaminación con *Listeria monocytogenes* después del procesamiento. Dairy, Food and Environ. Sanit. 21:381-395.
- Tortorello, M. L. 2003. Indicator organism for safety and quality-uses and methods for detection: Minireview. J. AOAC Intern. 86: 1208-1217.
- USDA/FSIS. 1998. Microbiology Laboratory Guidebook 3rd edition. Chapter 1, 3.
- Velázquez, M. y J. Feirtag. 1997. Quenching and enhancement effects of ATP extractants, cleansers, and sanitizers on the detection of the ATP bioluminescence signal. J. Food. Prot. 60:799-803.
- Widdowson, M., A. Sulka, S. Bulens, S. Beard, S. Cheves, R. Hammonds, E. Salehi, E. Swanson. 2005. Norovirus and Foodborne Disease, United States, 1991-2000. Emerg Infect Dis. 5:95-102.

APÉNDICES

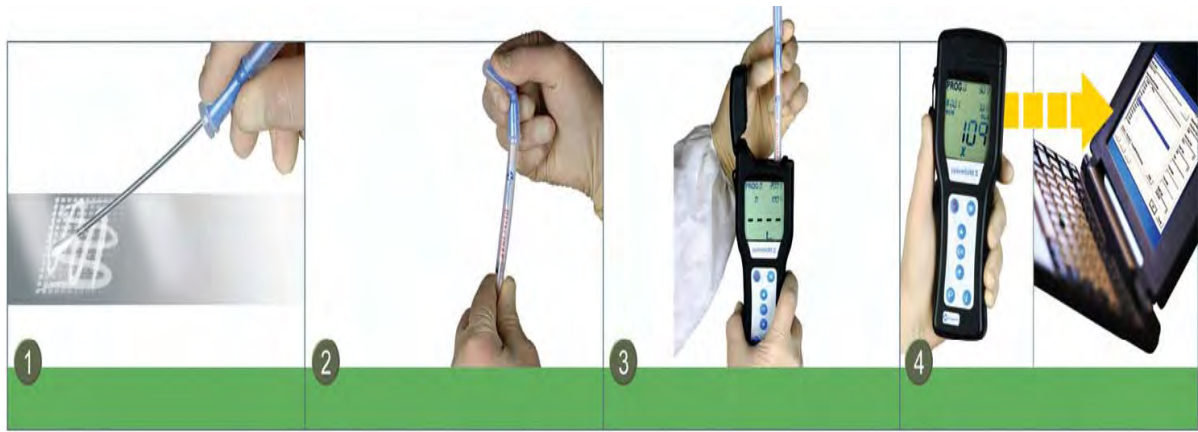
Apéndice 1. Método utilizando Petrifilm (3M Microbiology) para la determinación de recuento total aeróbico.



Apéndice 2. Método utilizando Petrifilm (3M Microbiology) para la determinación de coliformes totales y *Escherichia coli*.



Apéndice 3. Método utilizado en las pruebas de bioluminiscencia de ATP (hisopo y el luminómetro modelo System SureII).



Apéndice 4. Análisis estadísticos de prueba T para los recuentos de bacterias aeróbicas en la rebanadora, la mesa, el mango de la puerta y el drenaje de los supermercados y panaderías antes de comenzar operaciones (AO) y después de cuatro horas de trabajo (DO).

Rebanadora antes y después en los supermercados

Prueba T (muestras apareadas)

Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	T	Bilateral
Reban después	Reban antes	7	1.16	1.75	1.76	0.1296

Rebanadora antes y después en las panaderías

Prueba T (muestras apareadas)

Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	T	Bilateral
Reban después	Reban antes	5	0.39	4.44	0.20	0.8525

Mesa antes y después en los supermercados

Prueba T (muestras apareadas)

Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	T	Bilateral
Mesa después	Mesa antes	7	1.86	4.19	1.17	0.2849

Mesa antes y después en las panaderías

Prueba T (muestras apareadas)

Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	T	Bilateral
Mesa después	Mesa antes	5	-0.58	2.80	-0.46	0.6679

Mango puerta nevera antes y después en los supermercados

Prueba T (muestras apareadas)

Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	T	Bilateral
Mango puerta después	Mango puerta antes	7	-0.41	1.49	-0.73	0.4927

Mango puerta nevera antes y después en las panaderías

Prueba T (muestras apareadas)

Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	T	Bilateral
Mango puerta después	Mango puerta antes	5	-2.01	1.80	-2.49	0.0671

Drenaje antes y después en los supermercados

Prueba T (muestras apareadas)

Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	T	Bilateral
Drenaje después	Drenaje antes	7	-0.36	1.12	-0.86	0.4244

Drenaje antes y después en las panaderías

Prueba T (muestras apareadas)

Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	T	Bilateral
Drenaje después	Drenaje antes	4	-0.58	2.83	-0.41	0.7103

Apéndice 5. Análisis estadísticos de prueba T para la densidad de coliformes totales en la mesa, el mango de la puerta y el drenaje de los supermercados y panaderías antes de comenzar operaciones (AO) y después de cuatro horas de trabajo (DO).

Mesa antes y después en los supermercados

Prueba T (muestras apareadas)

Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	T	Bilateral
Mesa después	Mesa antes	7	-1.23	2.71	-1.20	0.2750

Mesa antes y después en las panaderías

Prueba T (muestras apareadas)

Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	T	Bilateral
Mesa después	Mesa antes	5	0.37	2.88	0.29	0.7880

Mango puerta nevera antes y después en los supermercados

Prueba T (muestras apareadas)

Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	T	Bilateral
Mango puerta después	Mango puerta antes	7	0.36	0.96	1.00	0.3559

Mango puerta nevera antes y después en las panaderías

Prueba T (muestras apareadas)

Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	T	Bilateral
Mango puerta después	Mango puerta antes	5	-1.01	1.38	-1.63	0.1782

Drenaje antes y después en los supermercados

Prueba T (muestras apareadas)

Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	T	Bilateral
Drenaje después	Drenaje antes	7	-0.19	2.03	-0.25	0.8138

Drenaje antes y después en las panaderías

Prueba T (muestras apareadas)

Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	T	Bilateral
Drenaje después	Drenaje antes	4	-0.22	3.99	-0.11	0.9183

Apéndice 6. Análisis estadísticos de prueba T para la densidad de *Escherichia coli* en la mesa y en el drenaje de los supermercados antes de comenzar operaciones (AO) y después de cuatro horas de trabajo (DO).

Mesa antes y después en los supermercados

Prueba T (muestras apareadas)

Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	T	Bilateral
Mesa después	Mesa antes	7	-0.36	0.96	-1.00	0.3559

Drenaje antes y después en los supermercados

Prueba T (muestras apareadas)

Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	T	Bilateral
Drenaje después	Drenaje antes	7	-0.63	1.66	-1.00	0.3559

Apéndice 7. Fotos tomadas el mismo día del muestreo en los supermercados y panaderías antes de realizar las pruebas.

Apéndice 7.1. Rebanadora muestreada con pedazos de jamón antes de comenzar operaciones en la mañana (AO) en la Panadería E.



Apéndice 7.2. Rebanadora muestreada con pedazo de jamón antes de comenzar operaciones en la mañana (AO) en el Supermercado J.



Apéndice 7.3. Pedazo de jamón encontrado en la rebanadora antes de comenzar operaciones en la mañana (AO) en el Supermercado K.



Apéndice 7.4. Residuos de alimentos (pedazos de jamón rebanado y de carne) encontrados en el fregadero antes de comenzar operaciones en la mañana (AO) en el Supermercado J.



Apéndice 7.5. Ingredientes, utensilios y vaso de “foam” (para café) se encontraron encima de la tabla de picar antes de comenzar operaciones en la mañana (AO) en la Panadería E.



Apéndice 7.6. Mesa muestreada contenía residuos de alimentos antes de comenzar operaciones en la mañana (AO) en el Supermercado B.



Apéndice 7.7. Drenaje muestreado tenía residuos de alimentos y papel antes de comenzar operaciones en la mañana (AO) en el Supermercado J.



Apéndice 7.8. Bandeja (puesta encima de la mesa) que se utiliza para colocar la carne en los establecimientos de venta al detalle recoge agua condensada del sistema de enfriamiento antes de comenzar operaciones en la mañana (AO) en el Supermercado J. Se observan en la bandeja residuos de carne molida y sangre. Las salpicaduras que se producen pueden causar contaminación cruzada en la mesa.



Apéndice 7.9. Piezas de un equipo secándose al aire en un carrito de compra antes de comenzar operaciones en la mañana (AO) en el Supermercado K. Esto es un ejemplo de contaminación cruzada.



Apéndice 7.10. Fregadero ocupado por bandejas que habían sido utilizadas (estaban sucias), piezas de equipos y cajas vacías (anteriormente contenían carne y sangre) en el Supermercado C después de comenzar operaciones (DO). Esto sugiere que no siguen el protocolo adecuado para limpieza y desinfección ni tampoco para el fregadero. La pluma del fregadero fue reparada con plástico (esto puede ser un nicho de contaminación).



Apéndice 7.11 Jamón sometido a abuso de temperatura y expuesto a cualquier contaminación en la rebanadora después de comenzar operaciones (DO) en el Supermercado C.



Apéndice 7.12. Químicos no rotulados y/o botellas re-utilizadas de detergentes de uso doméstico de contenido dudoso en la Panadería E.



Apéndice 7.13. Químicos no rotulados y/o botellas re-utilizadas de detergentes de uso doméstico almacenados en un lugar inapropiado (colgando de la tubería del lavamanos) en la Panadería E.



Apéndice 7.14. Alimento en la nevera expuesto a cualquier contaminación en el Supermercado C.



Apéndice 7.15. Jamón rebanado sin empacar junto a un pedazo de carne de res crudo en el Supermercado I (puede implicar contaminación cruzada).



Apéndice 7.16. Montaña de hielo, sangre y basura en el refrigerador del Supermercado I.



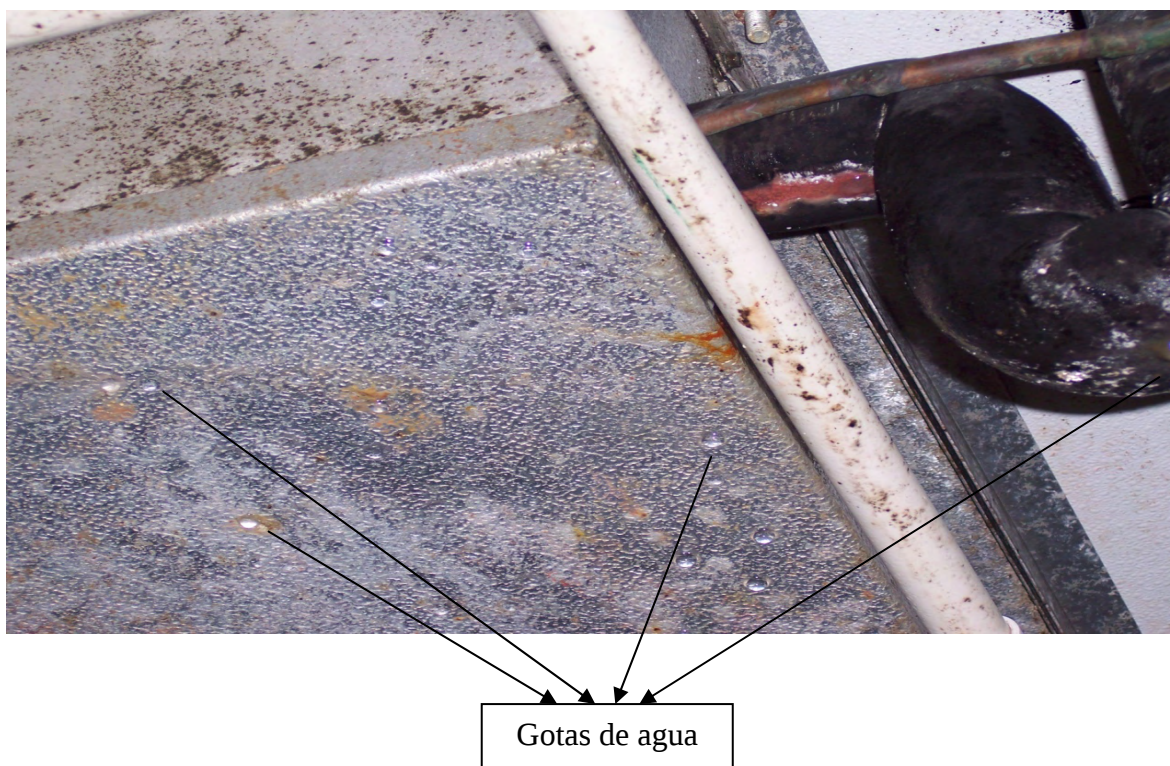
Apéndice 7.17. Drenaje tapado con sangre en uno de los refrigeradores del Supermercado I.



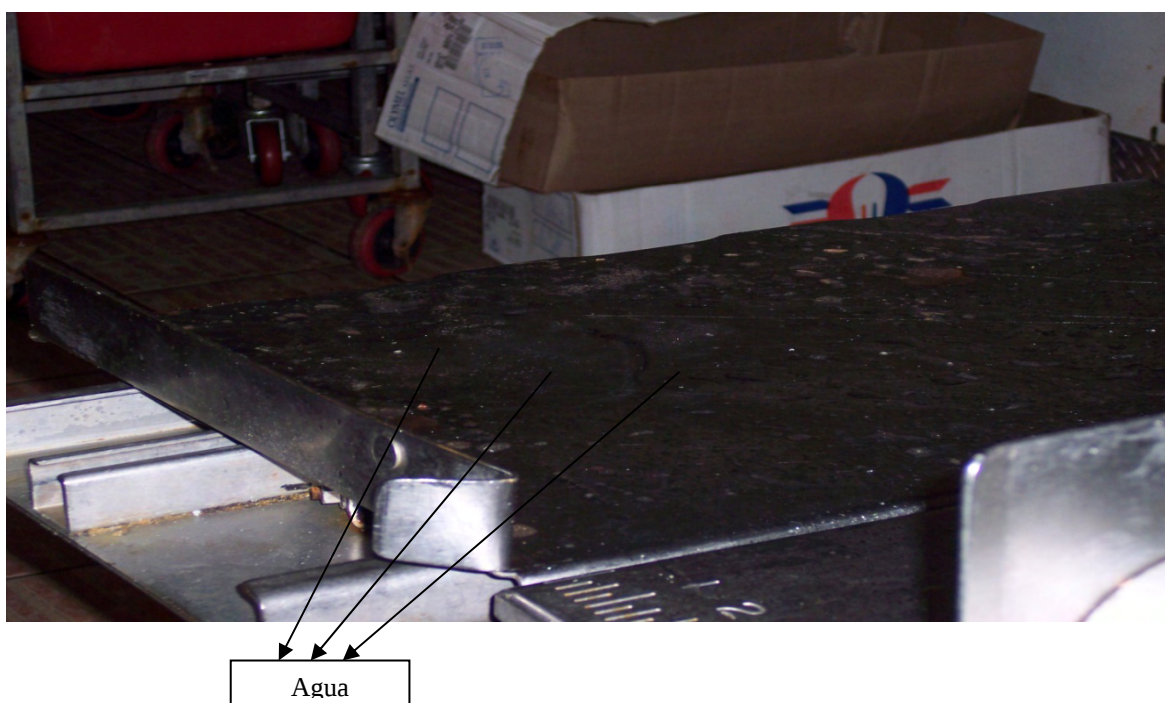
Apéndice 7.18. Puerta corroída por el moho en la Panadería H.



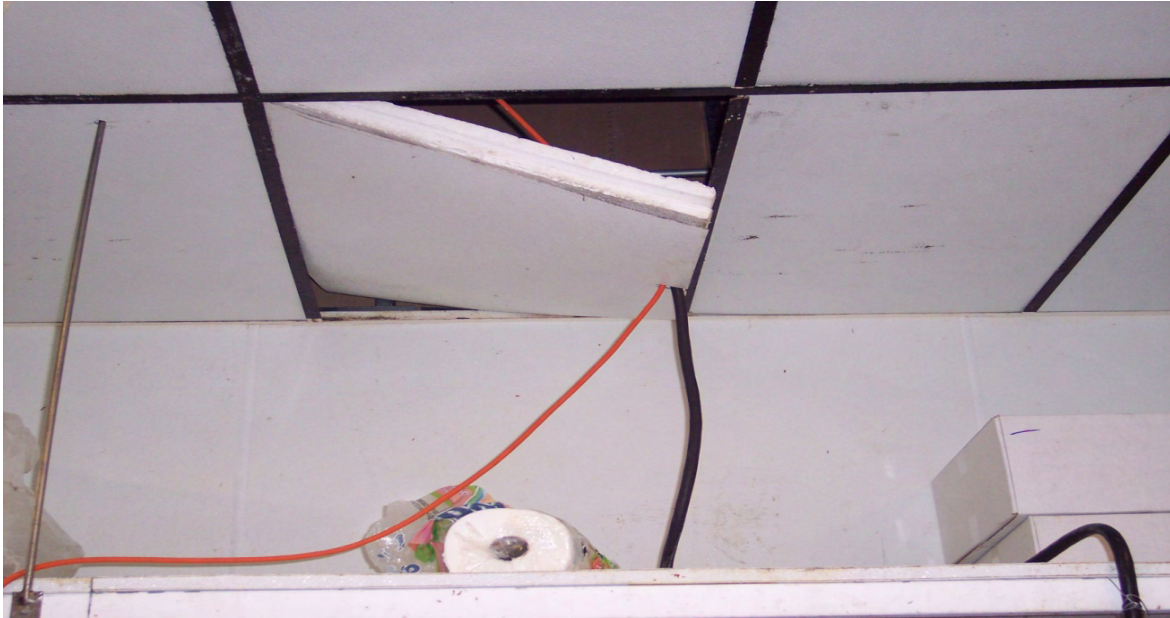
Apéndice 7.19. Agua condensada del sistema de enfriamiento formada en el techo del Supermercado I.



Apéndice 7.20. Agua condensada del sistema de enfriamiento formada en el techo cae encima de una mesa en el Supermercado I. Esto puede ocasionar contaminación cruzada.



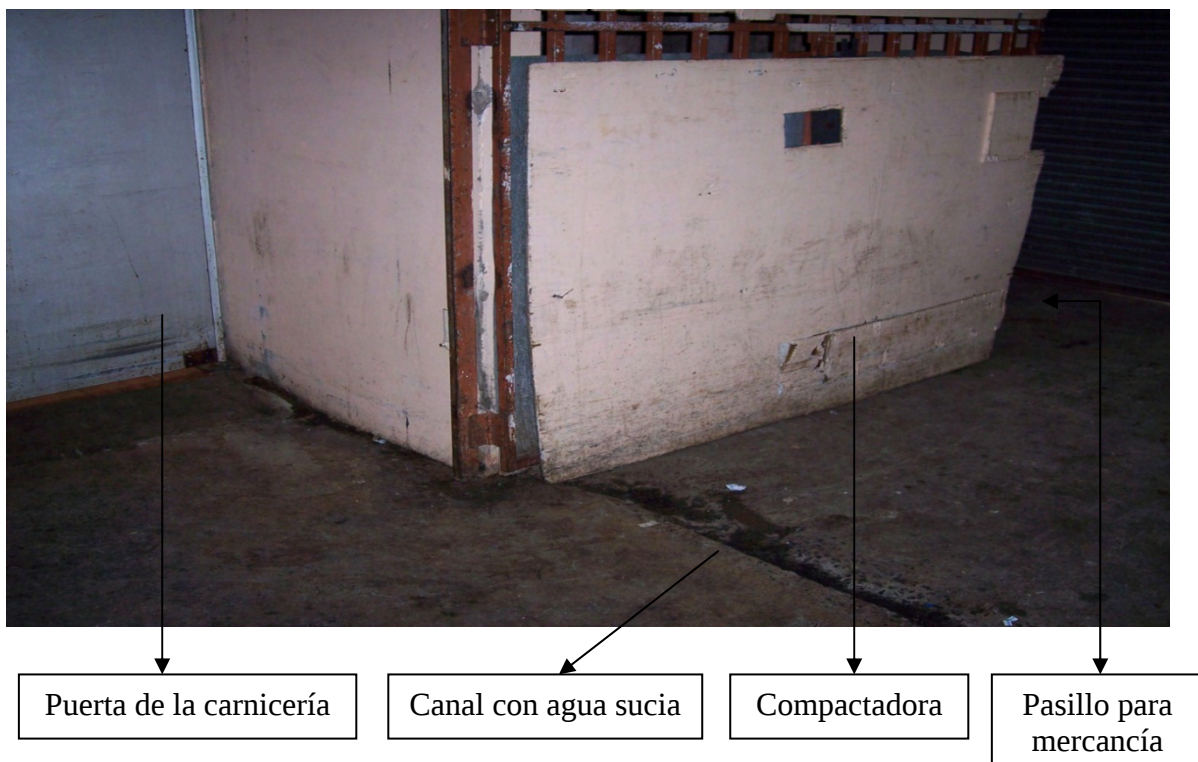
Apéndice 7.21. Plafón del techo acústico del área de proceso fuera de lugar en el Supermercado I.



Apéndice 7.22. Compactadora adyacente a la puerta de la carnicería del Supermercado C.



Apéndice 7.23. Canal acumula agua sucia de la compactadora que está cerca de la puerta de la carnicería y del pasillo donde se coloca mercancía en el Supermercado C.



Apéndice 7.24. Agua sucia que sale de la compactadora acumulada en un canal en el Supermercado C.



Apéndice 7.25. Pasillo (al lado de la compactadora) donde se coloca mercancía y cajas vacías en el Supermercado C.



Compactadora