

**UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA**

**“ALBERTO CAZORLA TALLERI”**



**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LA DESINFECCIÓN EN LOS  
PUNTOS CRÍTICOS ASOCIADOS A FORMACIÓN DE BIOFILMS  
ESTABLECIDOS EN LA CADENA DE PROCESAMIENTO DE CARNE  
DE POLLO**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
BACHILLER EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA**

**AUTORA:**

VALERIE ESTEPHANIE ARROYO TITO

**ASESORA:**

RUTH CRISTOBAL DELGADO

**LIMA - PERÚ**

**2021**

# ÍNDICE

<b>Resumen</b>	2
<b>Abstract</b>	3
<b>Palabras claves</b>	4
<b>Pregunta de investigación</b>	4
<b>Estado del Arte</b>	4
1. Biofilms Bacterianos asociados a carne de pollo	4
1.1 Definición de biofilm	5
1.2 Procesos y factores asociados a la formación del biofilm	5
1.3 Principales microorganismos patógenos y enfermedades asociadas a formación de biofilms en carne de pollo	7
1.4 Presencia de biofilms en la cadena de producción de carne de pollo	9
1.4.1 Efecto del biofilm en la vida útil de la carne de pollo	10
1.4.2 Efecto en la inocuidad del consumo de carne de pollo	11
2. Riesgos en la producción y consumo de la carne de pollo	12
2.1 Puntos críticos en la producción de carne de pollo	13
2.1.1 Peligros microbiológicos	13
2.2 Antecedentes a nivel nacional	16
3. Métodos de control de biofilms en la planta de procesamiento	17
3.1 Métodos convencionales	17
3.2 Métodos alternativos	18
<b>Problema de Investigación</b>	19
<b>Estrategia de abordaje</b>	20
<b>Referencias</b>	22
<b>Anexos</b>	26

## Resumen

Los biofilms son comunidades microbianas adheridas a superficies que se transfieren por contaminación cruzada, al tener contacto directo entre alimentos, utensilios y superficies (1). Son de interés para la salud pública e industria alimentaria porque los forman tanto bacterias ambientales no patógenas y las patógenas (1) (23) y con capacidad para sobrevivir a estreses del procesamiento del alimento, como la desinfección (2). Estos microorganismos patógenos como *E. coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*, así como sus serotipos, son productores de biofilms, presentándose con mayor frecuencia en carnes (1,2) debido a los residuos orgánicos, encontrando condiciones adecuadas para su crecimiento ocasionando la reducción de vida útil del alimento (2) e infecciones transmitidas por alimentos (3).

Por su forma de transferencia, la contaminación cruzada puede ocurrir en cualquier momento de la cadena de producción (1,2), sobre todo en los puntos críticos de las etapas de llenado, corte, marinado y curación (22), como señalan Wagner y colaboradores (23), los cuales pueden representar peligros microbiológicos, químicos y físicos para el alimento (19). Se han realizado estudios sobre los patógenos productores de biofilms antes mencionados en muestras de pollo en Estados Unidos (6), Brasil (15) y China (9), donde muestran su prevalencia en el producto, incluso después de la desinfección. Perú se coloca como uno de los mayores consumidores de pollo en Latinoamérica en el 2018 (18) y frente a la alta demanda (16, 17) se requiere controlar la formación de biofilms para evitar la contaminación de estos productos cárnicos. Los bajos recursos y deficiente salubridad de los países en desarrollo (3) en plantas de producción abre la posibilidad de consecuencias sanitarias mayores a futuro.

Es complejo seguir el rastro del origen de la contaminación porque al propagarse por contacto directo no se puede determinar algún patrón espacial o temporal que pueda asociarse a fallas en el control del procesamiento. Por ello se sugiere obtener muestras para control microbiológico

durante las etapas del proceso mediante pruebas convencionales y/o moleculares para comparar cepas y establecer su procedencia (22) (21) (1). Además, es necesario un esfuerzo continuo para investigar la procedencia de estas bacterias y su incidencia en la contaminación de pollo en plantas de producción (1). Por consiguiente, este trabajo plantea determinar la eficacia del método de desinfección en los puntos críticos asociados a biofilms establecidos en la cadena de procesamiento de carne de pollo.

**Palabras claves:** biofilms, bacterias patógenas, puntos críticos, cadena de procesamiento, carne de pollo

### **Abstract**

Biofilms are microbial communities attached to surfaces that are transferred by cross contamination when direct contact between food, surfaces and utensils takes place (1). They are of interest for public health and for the food industry because they are formed by both non-pathogenic and pathogenic environmental bacteria (1) (23) and they have the ability to survive food processing stresses, such as disinfection (2). These pathogenic microorganisms such as *E. coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella*, as well as their serotypes, produce biofilms, occurring more frequently in meats (1) (2) due to the organic residues which provides the adequate conditions for its growth, causing the reduction of food shelf life (2) and foodborne infections (3).

Due to its transfer form, cross contamination can happen at any time during the production line (1) (2) especially at critical points such as filling, cutting, marinating and curing stages (22), as pointed out by Wagner and collaborators (23), which represent microbiological, chemical and physical hazards for food (19). Studies carried out on the aforementioned biofilm-producing pathogens in the chicken samples in the United States (6), Brazil (15) and China (9) show their

prevalence in the product, even after disinfection. Peru was ranked as one of the largest chicken consumers in Latin America in 2018 (18) and, seeing the growing demand of the consumers, it is necessary to control the formation of biofilms to avoid the contamination of these chicken meat products. Furthermore, the low resources and poor sanitation of the developing countries (3) in production plants opens the possibility of greater sanitary consequences in the future.

It is really challenging to follow the trace of the origin of the contamination given that it is spread by direct contact, so it is not possible to determine any spatial or temporal pattern that may be associated with failures in the control of the product's processing. Therefore, it is suggested to obtain samples for microbiological control during the process's stages through conventional or molecular tests to compare the strains and establish their origin (22) (21) (1). In addition, a continuous effort is necessary to investigate the origin of these bacteria and their incidence in chicken meat contamination in production plants (1). Consequently, this work proposes to determine the efficacy of the disinfection method at critical points associated with biofilms formation in the chicken meat processing chain.

**Keywords:** biofilms, pathogens, critical points, production chain, poultry meat

### **Pregunta de investigación**

¿Es el método de desinfección empleado en planta eficaz para el control microbiológico en los puntos críticos para formación de biofilms establecidos en la cadena de procesamiento de carne de pollo?

### **Estado del Arte**

#### **1. Biofilms Bacterianos asociados a carne de pollo**

Los biofilms son de interés para la salud pública e industria alimentaria por la variedad y resistencia de las bacterias asociadas a su formación y por su fácil propagación a diferentes superficies de contacto con los alimentos para consumo humano. La formación de estos biofilms resulta preocupante porque, la mayoría de bacterias asociadas a estos son patógenos transmitidos por alimentos, siendo uno de los principales impedimentos para garantizar la inocuidad del producto (18,24).

### 1.1 Definición de biofilm

Los biofilms bacterianos son comunidades microbianas que se pueden adherir a distintas superficies (1) por la formación de una matriz compuesta de variadas sustancias poliméricas extracelulares (EPS) producidas por las mismas bacterias, lo que les permite dispersarse por contacto directo o por presencia de pilis (2). Debido a la diversidad microbiana y versatilidad de las comunidades, pueden adaptarse rápidamente a cambios en su ambiente, así como resistir algunos factores de estrés, aumento de temperatura o incluso presencia de antimicrobianos (2). Es así que los biofilms son una fuente persistente de contaminación por bacterias contaminantes patógenas y no patógenas (2). Ocasionan problemas como la corrosión y olores desagradables en los equipos empleados en la cadena de producción de alimentos y en el sector alimentario, reduciendo la vida útil de los productos y causando enfermedades transmitidas por alimentos (3).

### 1.2 Procesos y factores asociados a la formación del biofilm

El proceso de formación del biofilm se divide en 5 pasos principales (Anexo 1). Lo primero en ocurrir es la adhesión de células individuales a diversas superficies abióticas. Esto sucede en 2 pasos: una etapa reversible y otra irreversible (4). La diferencia entre ambas recae en las fuerzas de atracción entre bacterias y superficies. Durante la etapa reversible están involucradas fuerzas

de Van der Waals y electrostáticas (4) así que los microorganismos aún no comienzan con la producción de biofilms y aún podrían desprenderse. Mientras que en la etapa irreversible se presentan fuerzas de interacción como dipolo-dipolo, hidrofóbicas, ión-dipolo, entre otras de corto alcance (4) y una vez que esto sucede la adhesión es definitiva con presencia de EPS (5). Una vez que la adhesión es irreversible, comienza la producción temprana de biofilm que se regula por la densidad de población, la cual, a la vez, está controlada por la señalización molecular entre células (4). Luego, el biofilm madura porque las bacterias crecen y se dividen utilizando los nutrientes presentes en el medio para comenzar a conformar microcolonias (4). Esta maduración significa que la estructura se vuelve organizada (5). Se sintetizan EPS adicionales y las microcolonias crecen y se fusionan formando una capa de células de unos cuantos milímetros de ancho cubriendo la superficie (4). El último paso es la dispersión, donde algunas bacterias se desprenden del biofilm, al regresar a su estado planctónico, para colonizar otras áreas (5) por contacto directo entre distintas superficies, la forma de transmisión más común (1). Es decir, su transferencia es una contaminación cruzada.

Este proceso es afectado por distintos factores que pueden determinar la formación del biofilm en las primeras 2 etapas del procedimiento, la adhesión reversible e irreversible. Las propiedades fisicoquímicas de la superficie a la que se adhieren los microorganismos, como la temperatura, pH, o hidrofobicidad, son factores importantes para formar biofilms, por ejemplo, se ha reportado que los materiales hidrofóbicos son más resistentes a la adhesión bacteriana (5). Otro factor que influye en el grado de adhesión de las bacterias y formación de los biofilms es el tipo de material de superficie. Estudios postulan que los materiales de acero inoxidable, vidrio, caucho, poliuretano, teflón y madera son susceptibles a la formación de biofilms (5), en especial el plástico, que tiende a ser colonizado por *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*, productoras de biofilms resistentes (5). A pesar de esto, *Salmonella* se adhiere mucho más al teflón, seguido del

acero inoxidable (5). Se sugiere que la razón por la que algunas bacterias se adhieren más a unas superficies que a otras puede deberse a las energías libres interfaciales de la superficie (5) o tensión superficial, aunque aún no se cuentan con estudios concluyentes. Asimismo, la aspereza de las superficies es otro factor importante, ya que se ha reportado que los defectos en las superficies se asocian con una mayor adhesión bacteriana porque hay mayor área de superficie y las depresiones en superficies ásperas son ambientes favorables para la colonización (4).

### 1.3 Principales microorganismos patógenos y enfermedades asociadas a formación de biofilms en carne de pollo

Los patógenos principales y más asociados a la formación de biofilms son *E. coli*, *Salmonella* y *Listeria*, así como sus serotipos (1) (2), presentes en distintas áreas. En efecto, en los últimos años se han reportado estos microorganismos asociados a otras bacterias en el deterioro de alimentos comunes como *Lactobacillus* y *Pseudomonas* (2). así como biofilms producidos por *Klebsiella* y *Campylobacter* que se presentan en alimentos listos para comer (4).

La mayoría de microorganismos asociados a formación de biofilms son patógenos transmitidos por alimentos (1). En el caso de *E. coli*, encontramos coexistencia entre el serotipo O157 productora de toxina shiga y la no productora (1). Asimismo, se presentan reportes de biofilms formados por *E. coli* O157:H7 y *S. typhimurium* (1). Esta coexistencia entre distintas bacterias podría acelerar el desarrollo del biofilm y aumentar la prevalencia de patógenos en superficies. Cabe recalcar que es más usual encontrar biofilms de especies mixtas, ya que así son más estables por la comunicación entre células. Además, por su estabilidad, los biofilms de especies mixtas brindan mayor protección a las bacterias contra antimicrobianos, incluyendo desinfectantes (2) (23).

Dado que los biofilms son una fuente persistente de contaminación por bacterias patógenas y contaminantes (1), especialmente en alimentos, están asociados a diversas infecciones crónicas y persistentes (2), es así que se han reportado brotes de enfermedades asociadas a éstos en los últimos años. En 2017, Curtiss y colaboradores aislaron cepas de *E. coli* patógenas de muestras comerciales de carne de pollo en Estados Unidos (6). Primero evaluaron la interacción de estas bacterias con la vejiga y riñón humanos por medio de cultivos en monocapa de líneas celulares de vejiga humana T24 y riñón humano A498 obteniendo como resultado que la invasión de estas bacterias era más efectiva que la del control negativo MG1655. Además, se inoculó intraperitonealmente  $10^8$  UFC de estas bacterias en ratones para analizar la virulencia de las cepas aisladas, estableciendo un modelo de sepsis murina que simula la de los humanos, y el resultado fue que 12 de 14 cepas eran letales, concluyendo que estas bacterias representan un riesgo significativo para la seguridad alimentaria y el consumo de la población (6). Sin embargo, también mencionan que se necesita mayor investigación para determinar el nivel de peligro que representan estas infecciones para los humanos, ya que sus métodos sólo utilizaban modelos animales. Es preciso añadir que en el mismo país, el 2014, la Universidad de Cambridge publicó un compendio que contenía la cantidad de brotes por infección producidos por el serotipo de la *E. coli* no productora de toxina shiga (7) donde mencionan que estas infecciones iban en aumento provocando síndrome urémico hemolítico (SUH), contando 46 brotes en 26 estados. Asimismo, establecen que el 84% de estos brotes se transmitían por alimentos de origen animal, sobre todo carnes. Por ello, el control y análisis sobre estos productos se ha intensificado, pero no solo en Estados Unidos. El 2018, en Seúl, Corea, Hyun Jung Kim y colaboradores analizaron productos comerciales de carne y vegetales, aislando *E. coli* multidrogo resistente (MDR) (8). La mayoría de estas también tenían la capacidad de producir biofilms (8), así que tenían una

protección adicional, y representan un riesgo mayor para la población, visto que las bacterias MDR ocasionan infecciones con un menor rango de antimicrobianos a aplicar.

Como se puede observar, *E. coli* es el microorganismo sobre el que más reportes de infecciones hay, probablemente por ser el indicador más común sobre condiciones higiénicas y sanitarias en la industria (9), pero también hay otros microorganismos preocupantes y *Salmonella* es una de las más habituales, la cual causa salmonelosis, infección similar a la gastroenteritis que no suele requerir mayor tratamiento en pacientes saludables, aunque podría variar si el serotipo que infecta al individuo es *S. typhi* o *S. paratyphi* (10), ocasionando la muerte en algunos casos. El 2018, en Brasil, Sereno MJ. y colaboradores evaluaron la resistencia antimicrobiana en cepas de *Salmonella* aisladas de carcasas de pollo congelado. El resultado fue que todas eran multidrogo resistentes y el 72.7% de éstas producían biofilms (10). Por último, otro estudio sobre *L. monocytogenes* determinó que, del total de 10 cepas analizadas, 6 de estas fueron asociadas a 2 brotes de listeriosis en Estados Unidos (11), que puede causar desde una gastroenteritis febril hasta una enfermedad invasiva mortal con mayor efecto en individuos inmunosuprimidos. Además, *Salmonella* y *L. monocytogenes* suelen formar biofilms mixtos (5). Como se observa, la mayor parte de los casos ocurren en carnes de pollo.

#### 1.4 Presencia de biofilms en la cadena de producción de carne de pollo

Los biofilms confieren resistencia a las bacterias frente a diversas condiciones de estrés (1), tales como ambientes secos, altas temperaturas e incluso la desinfección en zonas de procesamiento industrial (22, 23). Por eso son una de las mayores preocupaciones para la industria de alimentos y sobre todo en carnes, como se observó en la sección anterior. Esto porque los residuos orgánicos producidos por el procesamiento de estas carnes brindan las condiciones adecuadas para la adhesión de bacterias a superficies en contacto con alimentos y forman biofilms que

ocasionan efectos negativos (4). Además, su modo de transmisión es por contacto directo entre alimentos, utensilios y superficies, de modo que la contaminación por bacterias productoras de estas estructuras podría ocurrir en cualquier momento de la cadena de producción (1) (21). Por eso, muchos de los casos de contaminación cruzada en carnes son asociados con equipos y utensilios que presentan biofilms (9).

Como se ha indicado antes, otros estudios (11) han encontrado *L. monocytogenes* en muestras de pollo. Esta bacteria suele adherirse a las superficies en contacto con alimentos con mayor frecuencia a valores de pH neutros y temperaturas de 30°C (4). La mayoría de los serotipos de *Listeria* producen grandes cantidades de biofilms junto con *Salmonella* (5) y se adaptan a diferentes ambientes rápidamente (11). Asimismo, el pollo ha sido identificado como una fuente de *E. coli* enterohemorrágica e infecciones patógenas por el serotipo extra intestinal del microorganismo mencionado. También puede ocasionar diarreas e infecciones que pueden asociarse a la producción de biofilms (9). El serotipo más frecuentemente encontrado en biofilms de especies mixtas es el O157:H7. Se ha demostrado que varias cepas de esta bacteria, por medio de bombas de eflujo en su sistema de defensa, son capaces de tolerar tratamientos con triclosan y cloruro de amonio cuaternario (1).

Esto representa un peligro para los consumidores de carne de pollo, siendo los principales efectos de la formación de biofilms sobre este alimento la reducción de su vida útil y transmisión de enfermedades, como se mencionó anteriormente (2).

#### 1.4.1 Efecto del biofilm en la vida útil de la carne de pollo

Un efecto negativo del biofilm es la reducción de la vida útil de un producto, motivo de preocupación para las industrias alimentarias, especialmente en ambientes de producción y procesamiento (2) (21). Esto significa que los productos duran menos de lo establecido por la

empresa alimentaria que los produce y consumirlo después de ese tiempo podría ocasionar enfermedades en los compradores. Si bien es necesario realizar un control de calidad antes de calificar a los productos como aptos para venta, se suele tomar solo unas cuantas muestras al azar dentro de un grupo en un lote de la producción (12) y si cumplen con los criterios microbiológicos establecidos por cada país se sigue con la cadena de producción y subsecuente comercialización. También podría ocurrir que el mismo control de calidad no es eficiente y por eso ocurren casos como los brotes por *E. coli* en Estados Unidos, o cuando se llevan a cabo análisis en productos comerciales se encuentran patógenos presentes. Igualmente, su modo de transferencia es otra preocupación ya que la contaminación cruzada podría ocurrir al azar en diversos ambientes. Por consiguiente, la limpieza y desinfección regular en equipos, superficies e instalaciones son necesarios para prevenir la contaminación de los productos (5).

Estos daños sobre la carne de pollo podrían representar pérdidas económicas para la empresa productora, como el brote de listeriosis producido el 2009 en Chile en cecina y que después se detectó en otros productos cárnicos de la misma empresa. Debido a esto, los productos fueron retirados del mercado con cuantiosas pérdidas económicas y pérdida de credibilidad del público (13). Así que el objetivo de la industria es desarrollar protocolos de limpieza y desinfección económicos pero efectivos que inhiban la formación de biofilms de estas bacterias en las superficies de las plantas de producción (4) garantizando la inocuidad.

#### 1.4.2 Efecto en la inocuidad del consumo de carne de pollo

La inocuidad se refiere a la garantía de que el alimento consumido no cause algún daño a la salud del individuo (20). Varios países tienen leyes sobre este concepto para los alimentos, como el Perú, que tiene una “Ley de Inocuidad de los Alimentos” desde el 2008. No obstante, los reportes por transmisión de enfermedades a través de alimentos son usuales, como se evidencia

en la sección anterior, y muchos de estos son ocasionados por bacterias productoras de biofilms que las hace más resistentes y persistentes en el alimento (2).

En China, el 2013, Wang H. y colaboradores evaluaron la capacidad para formar biofilms de cepas de distintos serotipos de *Salmonella* previamente aislados de carcasas de pollo simulando distintos ambientes de una planta de procesamiento. Sus resultados indicaron que todas las cepas podían formar biofilms en diferente medida, siendo la mayor productora *S. agona* seguida de la *S. typhimurium* (14). Mientras que, el 2019, Sun Yi y colaboradores analizaron muestras de pollo vendido al por menor, aislando cepas de *E. coli* productoras de biofilms resistentes a 5 desinfectantes distintos: bromuro de cetiltrimetilamonio, cloruro de benzalconio, cloruro de cetilpiridinio, clorhexidina (CHX) y triclosan (9). En Latinoamérica, en Brasil, el laboratorio de Ornitopatología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Ciencia Animal de la UNESP, aisló *Salmonella* productora de biofilm en instalaciones de mataderos de pollos y en sus carcasas, las cuales tenían mayor adhesión en superficies y utensilios de materiales a base de vidrio y acero inoxidable, en especial si presentan ranuras en su superficie (15). También es importante tomar en cuenta los diversos casos de contaminación presentados anteriormente en Estados Unidos.

Como se aprecia en los estudios y reportes, la prevalencia de estas bacterias formadoras de biofilms se da en el pollo y en superficies con deterioro de distintos ambientes (22), donde crecen las bacterias durante la producción de carne de pollo. Esto afecta directamente su calidad microbiológica y descarta la garantía de inocuidad del producto, convirtiéndolo en una fuente de enfermedades transmitidas por alimentos.

## 2. Riesgos en la producción y consumo de la carne de pollo

Luego de presentar reportes y estudios de biofilms sobre la carne de pollo es necesario explicar los riesgos actuales en su producción y consumo tomando en cuenta la información presentada.

El sector avícola mundial se caracteriza por un crecimiento mayor en función a su consumo y comercio en comparación a otros productos debido al aumento de la población y poder de adquisición. Su producción ha ido en aumento debido a que es uno de los sectores con mayor sostenibilidad en el medio ambiente y su precio es accesible para casi todos los sectores socioeconómicos (16). Esto se evidencia al comparar los índices de producción de distintos tipos de carne, a nivel global, durante la emergencia del COVID-19. De acuerdo a la FAO, la carne bovina y de cerdo disminuyeron su producción, mientras que la de pollo continuó en aumento (17). Además, según la Asociación Peruana de Avicultura (APA), el Perú fue el mayor consumidor de pollo per cápita en Latinoamérica el 2018 donde cada habitante consume, en promedio, 47 kilogramos de pollo, mostrando un incremento de 230% con respecto al 2008 (18). Entonces, queda claro la alta demanda de la carne de pollo y que continúa en ascenso. Es por ello importante garantizar su inocuidad mediante el control de la contaminación en su producción y los puntos críticos de su procesamiento, concepto que se explica a continuación.

## 2.1 Puntos críticos en la producción de carne de pollo

Los puntos críticos de control indican los momentos en la cadena de producción que representan el mayor peligro físico, químico y biológico que puede afectar la calidad final del alimento (19) y por ello deben ser controlados adecuadamente. Es por eso que muchas industrias utilizan un sistema de análisis de peligros y puntos críticos (APPC) para el manejo de la inocuidad alimentaria (19). Para identificar estos puntos críticos en las cadenas de producción de los alimentos se llevan a cabo evaluaciones como la realizada por la FAO/OMS sobre *Campylobacter spp* en pollos broiler para identificar posibles vías de contaminación en su producción (19). De forma similar, se han investigado puntos críticos en plantas de producción de carne de pollo en diferentes países (11,21,22). Para continuar con la evaluación de puntos

críticos es necesario conocer los procesos en una planta de procesamiento antes de llegar a los puntos de venta. Estos se muestran en la Figura 1, aunque el diagrama podría modificarse de acuerdo a lo que se observa en una planta in situ en específico, ya que el cuadro fue elaborado en base a otros estudios (21, 23).

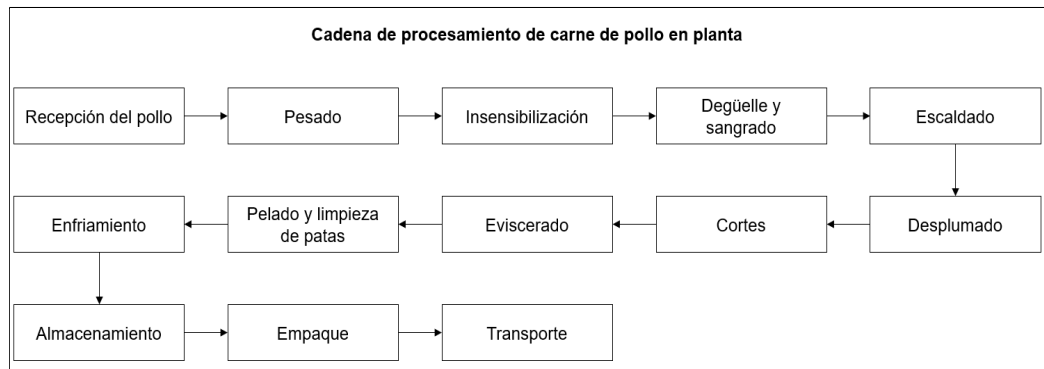


Figura 1.- Cadena de procesamiento de carne de pollo en planta (Fuente: Elaboración propia en base a referencias 21, 23)

### 2.1.1 Peligros microbiológicos

Los peligros microbiológicos suelen ser las mayores preocupaciones para la industria alimentaria ya que incluyen toxinas microbianas, metabolitos tóxicos y microorganismos patógenos (19), los que pueden producir biofilms en la maquinaria y superficies causando una dispersión continua de microorganismos en la carne (20). Por este motivo, el mayor interés del presente estudio sería, específicamente, estos peligros.

En China, Wang H. y colaboradores simulaban diferentes ambientes en plantas de procesamiento de carnes de pollo para determinar en qué superficies se adherían con mayor frecuencia distintos serotipos de *Salmonella* productoras de biofilms (14). También se han realizado evaluaciones in situ para identificar rutas de transmisión y puntos críticos para formación de biofilms. En Estados Unidos se analizaron genes de cepas de *Listeria monocytogenes* de las cuales 4 fueron

aisladas de plantas de procesamiento de carne de pollo y 6 estaban asociadas con 2 brotes de listeriosis (11). El estudio aludido propone un modelo basado en secuencias del profago comK para explicar la rápida adaptación de *Listeria* a diferentes superficies y ambientes dentro de la planta de procesamiento, así como su capacidad de formar biofilms, su persistencia y transmisión a los alimentos. Es decir, ya se presenta un intento por controlar la presencia de microorganismos productores de biofilms. De forma similar, en Singapur, Zwirzitz B. y otros diseñaron un mapa de transmisión de flujo bacteriano, específico para la instalación evaluada en el estudio, para identificar fuentes de contaminación bacteriana con ayuda del secuenciamiento genético del ARNr 16S para relacionar taxones específicos con ambientes particulares de la planta (21). Sus resultados indicaron que cuando el pollo entró a la planta tenía una alta carga microbiana que se vio reducida para cuando llegó a la etapa de eviscerado, aunque aún se detectaban microorganismos potencialmente peligrosos para la salud. Se menciona que estas bacterias serían capaces de sobrevivir a los tratamientos con calor, como es el escaldado, y por eso aún se presentarían en etapas más tardías como el eviscerado. Asimismo, la etapa de evisceración es considerada como punto crítico debido al riesgo por contaminación fecal al extraer las vísceras. A esto se le suma el peligro de la etapa de corte que presenta mayor probabilidad para que ocurra la contaminación cruzada entre utensilios, máquinas y manipuladores por la manipulación continua del pollo y el uso del equipo (21).

Aunque, como menciona el estudio de Zwirzitz B. y colaboradores, estos peligros microbiológicos están presentes desde ambientes previos como el galpón, en el que permanecen las aves hasta que son transportadas a planta. En efecto, Egas R., el 2018, aisló e identificó *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium* y *S. infantis* en el 15,3% de las muestras obtenidas por hisopado de barrido en los galpones de crianza y producción en 8 granjas avícolas (22). Del total de aislados para *Salmonella*, el 72.7% presentaba resistencia fenotípica hacia antimicrobianos

como Ciprofloxacina, Tetraciclina, Fosfomicina, Estreptomina, Cefotaxima, Sulfamethoxazole Trimethoprim, y Florfenicol, siendo la *S. Infantis* la que presentaba mayor resistencia a casi todos estos, excepto a la Ciprofloxacina. Mientras que 97.1% de los aislados de *E. coli* tenían genes de resistencia a betalactamasas tipo AmpC. Entonces, la carga microbiana de los pollos es influenciada desde ambientes previos a la planta, así que la transferencia de microorganismos podría ocurrir desde dichos ambientes y es importante tenerlo presente al realizar análisis de las rutas de contaminación.

Pero, uno de los estudios más relevantes fue realizado en el 2020 en Australia. Su objetivo fue determinar los principales puntos críticos para formación de biofilms en una planta de procesamiento de carnes (23). Recolectaron muestras de diferentes puntos a lo largo del procesamiento antes y después de la desinfección de los ambientes e identificaron 10 puntos críticos, pero, solo en 4 de estos logran identificar el tipo de biofilm formado y su presencia antes y después de desinfectar la maquinaria. Estas 4 etapas son llenado, corte, marinado y curación. Dado que los biofilms poseen tolerancia a procesos de desinfección y su transferencia por contacto directo entre superficies ocasiona contaminación cruzada, se confirma que la presencia de biofilms en ambientes de procesamiento de carnes representa una fuente de contaminación potencial y hábitat para patógenos (23).

## 2.2 Antecedentes a nivel nacional

En el Perú se han realizado estudios sobre los biofilms en la industria de carnes. El 2017 se evaluó la formación de biofilms producidos por *L. monocytogenes* aislados de embutidos en una planta de procesados cárnicos en Chorrillos y su resistencia ante 2 desinfectantes a base de hipoclorito de sodio y amonio cuaternario (24), observándose que el primero reducía mejor la formación de biofilms. Pero, enfocándose en estudios sobre carne de pollo, en el 2019, Conisilla

y Guerra evaluaron la resistencia microbiana y la capacidad de formación de biofilm de cepas de *S. aureus* y *L. monocytogenes*, que fueron aisladas de muestras de pollo y cerdo en mercados de Lima Metropolitana (18), donde la incidencia de *S. aureus* en pollo era 73.3% mientras que la de *L. monocytogenes* fue 13.33% y que las cepas obtenidas de carne cruda tenían mayor capacidad para formar biofilms en contraste a las provenientes de granjas porcinas. Por otro lado, algunos optan por proponer medidas de limpieza y control de biofilms para la industria alimentaria. El 2019, Pietro J. puso a prueba la eficacia de diferentes detergentes sobre superficies en plantas de procesamiento de la industria alimentaria, para el control de biofilms. Además, también pusieron a prueba un spray para detección rápida de biofilms con resultado favorables, el *Biofinder* (25). Sin embargo, los estudios no involucran la evaluación del control de puntos críticos para la formación de biofilms, sino que suelen centrarse en un microorganismo patógeno en específico o proponer formas de controlarlos y detectarlos.

### 3. Métodos de control de biofilms en la planta de procesamiento

Como se observó en la sección anterior, las plantas de procesamiento presentan puntos críticos para formación de biofilms, por eso es importante contar con métodos de control adecuados. La mejor estrategia para su control es prevenir su formación (5).

#### 3.1 Métodos convencionales

Los métodos convencionales se refieren a la limpieza y desinfección química, física o biológica habitualmente empleada en estos lugares (26) y para estos existen protocolos ya establecidos o las mismas empresas crean uno. La limpieza y desinfección contra biofilms debe apuntar a disolver la matriz de EPS para que los desinfectantes puedan acceder a las células bacterianas (5). Aunque, dependiendo del tipo de proceso llevado a cabo en la planta de procesamiento, el

protocolo puede estar sujeto a cambios como el protocolo “CIP”, usado para limpiar un sistema sin la necesidad de desmantelar (5). También se pueden aplicar detergentes o desinfectantes, como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o hipoclorito de sodio ( $NaClO$ ), durante la desinfección en la cantidad necesaria para garantizar su acción (5). En efecto, se ha comprobado la efectividad de  $NaClO$  para la remoción de células productoras de biofilm y matriz de EPS de *S. aureus* y *Enterococcus faecalis* y la del  $H_2O_2$  para la inhibición de biofilm producido por *Vibrio spp.* (5).

### 3.2 Métodos alternativos

La mayoría de los desinfectantes y bactericidas empleados para la limpieza y desinfección en estas industrias son comúnmente probados sobre células planctónicas, y no sobre biofilm, donde las bacterias son más resistentes (1). Así que se han desarrollado métodos de control alternativos más innovadores como agentes antimicrobianos, recubrimientos antimicrobianos y recubrimientos con modificación fisicoquímica de la superficie (26). Los agentes antimicrobianos se refieren a compuestos químicos o biológicos capaces de inhibir o eliminar biofilms entre los que se encuentran ácidos orgánicos, enzimas líticas, aceites esenciales, etc. (26). Pero, estos agentes también pueden estar atrapados en el recubrimiento, que vienen a ser los recubrimientos antimicrobianos, y que esperan a ser liberados en un momento definido al darse una interacción con el medio operativo o simplemente permanecer sobre la superficie para evitar la unión bacteriana, es decir, puede ser compuesto o superficial (26). Un ejemplo son los polímeros unidos por enlace covalente o péptidos antimicrobianos. Por último, está la modificación fisicoquímica de las superficies, muy investigada en los últimos años, ya que conlleva a modificar propiedades como su hidrofiliicidad o carga eléctrica (26) que puede evitar el paso inicial para la formación de biofilms: la adhesión microbiana a la superficie (4). Este método se basa en modificaciones superficiales a nivel químico y morfológico (26).

## **Problema de Investigación**

Los biofilms son una de las mayores preocupaciones para la industria alimentaria y salud pública por 2 razones principales: su resistencia a la desinfección y transferencia por contacto directo, causante de la contaminación cruzada. Estas estructuras tienden a formarse en diferentes ambientes de plantas de la industria debido a los residuos orgánicos dejados por el procesamiento de la carne, encontrando condiciones adecuadas para su crecimiento (2) trayendo como consecuencia la reducción de la vida útil de los productos y enfermedades transmitidas por alimentos (1). A nivel mundial, los reportes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son diversos, pero, en los últimos años, se ha comenzado a asociar la prevalencia de microorganismos patógenos a la resistencia a las condiciones de estrés brindada por los biofilms (25). Estudios como los realizados en Estados Unidos (6), China (9), Corea (8) y Brasil (15) son evidencia de esto.

En efecto, en el 2020 se realizó un estudio en una planta australiana de procesamiento de carnes de pollo y res para identificar los puntos críticos de formación de biofilms, ya que estos lugares tienen numerosos sitios propicios para ello (23). La determinación de los puntos críticos es importante para determinar la prevalencia de estos. Los entornos de procesamiento de alimentos exponen a los microorganismos a distintas situaciones de estrés y los biofilms ayudan a estas bacterias, usualmente patógenas, a sobrevivir. En solo 4 puntos (llenado, corte, marinado y curación) se pudo identificar el tipo de biofilm formado y que persistían incluso después de la desinfección.

Si bien los biofilms se pueden presentar en todo tipo de carnes, este trabajo se enfocará en la carne de pollo primero porque es el más consumido nivel nacional, lo suficiente como para que el Perú fuera uno de los mayores consumidores de pollo en Latinoamérica el 2018 (18), y a nivel

mundial su consumo sigue en aumento, incluso durante la pandemia, superando al resto de carnes (17). Segundo, la carne de pollo ha sido señalada como reservorio de distintas bacterias que terminan afectando la salud de los consumidores tales como *E. coli* enterohemorrágica, *Listeria*, *Salmonella* y algunos de sus serotipos (1,9,11). Como se explicó en la primera parte del trabajo, el número de casos, brotes y reportes de productos de carne de pollo contaminados por bacterias mostró la presencia de biofilms en estos, lo que explica la prevalencia de dichos patógenos ya que el biofilm brinda mayor resistencia a altas temperaturas, lavados y desinfección, además de que la transferencia del biofilm sucede al azar por contaminación cruzada (1). Por último, el Perú, al ser un país en desarrollo, es más propenso a infecciones por biofilms debido a sus reducidos recursos y deficiente salubridad (3), así que el problema sigue creciendo. Estas son las razones por las que es necesario, no solo evaluar la desinfección de forma general en planta, sino que se debe hacer especial hincapié en los puntos críticos para la formación de biofilms, donde reside el riesgo para el alimento y por consiguiente, para el consumidor.

El 2019 comenzaron a probar métodos de detección rápida de biofilms en plantas de procesamiento, pero no asociados a estudios sobre el control microbiológicos de estos puntos críticos en específico en el país. Por eso, el presente trabajo propone evaluar la eficacia de los procesos de desinfección en los puntos críticos asociados a biofilms establecidos en la cadena de procesamiento de carne de pollo en planta abarcando el proceso integral señalado en la Figura 1.

### **Estrategia de abordaje**

Para lograr el objetivo planteado, se identificarán y compararán los microorganismos presentes en la planta de procesamiento en diferentes tiempos de la jornada y los puntos críticos.

Primero, se tomarán muestras de la superficie de la carne de pollo y superficies inertes en los puntos críticos señalados por Wagner y colaboradores en su estudio del 2020 (23) al inicio de la jornada y después del procesamiento del lote del día, siguiendo el proceso integral señalado en la Figura 1. Se emplea la técnica de hisopado de las superficies no removibles, y en el caso de utensilios se realizará la técnica del enjuague. Como solución de enjuague se emplea buffer fosfato. Las muestras de enjuague e hisopado serán trasladadas al laboratorio para su procesamiento manteniendo una cadena de frío de 4 °C. Se sembrará en un medio general, el PC, para el recuento de aerobios mesófilos y luego en caldo cerebro corazón como medio enriquecido. A partir de este caldo se sembrará en agar Sangre, medio enriquecido, y MacConkey, medio selectivo y diferencial, para comenzar a diferenciar los microorganismos aislados. La identificación se realizará mediante pruebas bioquímicas convencionales indicadas en el Manual de Bergey (12).

Luego del aislamiento de las cepas bacterianas, se evaluará la capacidad de formación de biofilm cualitativamente utilizando el método del tubo (27) que consiste en realizar cultivos de los aislados en caldo Trypticase de soya (TSB) ,en tubos de poliestireno e incubarlos por 24 horas a 37°C. Después se realizan 2 lavados con buffer para eliminar las células libres y a las que quedan adheridas se les colorea con safranina por 1 hora. Se retira el exceso de safranina con 2 lavados de buffer fosfato, se deja secar el tubo, y se observará la formación de una película en las paredes y fondo del tubo, que son los biofilms (Anexo 2). Adicionalmente se empleará el agar Rojo de Congo (CRA) (28), donde se sembrarán las cepas aisladas e identificadas como productoras de biofilm e incubadas por 24 horas a 37°C. Una coloración negra en las líneas de siembra será evidencia de cepas productoras de EPS, mientras que una coloración rojiza indica lo contrario (Anexo 3).

Además, se tomarán otras muestras al final de la jornada, post desinfección de la planta, en las superficies en los puntos críticos para formación de biofilms con el método de hisopado y enjuague dependiendo de la superficie. Las muestras serán procesadas siguiendo el proceso ya descrito. Se comparará entre el grupo del inicio de la jornada, después del procesamiento del lote del día y al final de la jornada o post desinfección, dando prioridad a los patógenos, usando el qPCR, método elegido como el más apropiado (Anexo 4) (29, 30), para determinar si las bacterias encontradas son las mismas y así determinar la eficacia de del proceso de desinfección de la planta. Si las bacterias encontradas en los puntos críticos para formación de biofilms resultan ser las mismas antes y después de la desinfección, sobre todo las patógenas, entonces el protocolo de desinfección de esa planta no está siendo eficaz.

### **Referencias:**

1. Wang, R. Biofilms and Meat Safety: A Mini-Review. *International Association for Food Protection* [Internet] Estados Unidos; 2019, 82 (1): 120–127. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-311>
2. Giaouris, E. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Science* [Internet] 2013. 97(3), 298-309. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.05.023>
3. Tasneem, U. et al. Biofilm producing bacteria: A serious threat to public health in developing countries. *Journal of Food Science and Nutrition* [Internet] 2018;1(2):25-31. 10.35841/food-science.1.2.25-31

4. Myszka, K., Czaczyk, K. Bacterial Biofilms on Food Contact Surfaces - a Review. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences [Internet] 2011; 61(3). 10.2478/v10222-011-0018-4
5. Srey, S., Kabir, I., Sang-Do, H. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. Food Control [Internet] 2012;31(2); 572-585. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.001>
6. Mellata, M. et al. Escherichia coli isolates from commercial chicken meat and eggs cause sepsis, meningitis and urinary tract infection in rodent models of human infections. Zoonoses and Public Health. [Internet] Estados Unidos; 2018: 65(1). <https://doi.org/10.1111/zph.12376>
7. Luna, G. et al. Outbreaks of non-0157 Shiga toxin-producing Escherichia coli infection: USA. Cambridge University Press. [Internet] 2014:142;2270-2280.
8. Kim, H. et al. Multidrug Resistance, Biofilm Formation, and Virulence of Escherichia coli Isolates from Commercial Meat and Vegetable Products. Foodborne Pathogens and Disease. [Internet] 2018: 15(2). <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2448>
9. Sun, Y. et al. Disinfectant Resistance Profiles and Biofilm Formation Capacity of Escherichia coli Isolated from Retail Chicken. Microbial Drug Resistance. [Internet] China; 2019: 25(5). <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0175>
10. Sereno, MJ. et al. Antimicrobial Susceptibility and Biofilm Production by Salmonella sp. Strains Isolated from Frozen Poultry Carcasses. Brazilian Journal of Poultry Science. [Internet] 2017;19(1). <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2016-0268>
11. Verghese, B. et al. comK Prophage Junction Fragments as Markers for Listeria monocytogenes Genotypes Unique to Individual Meat and Poultry Processing Plants

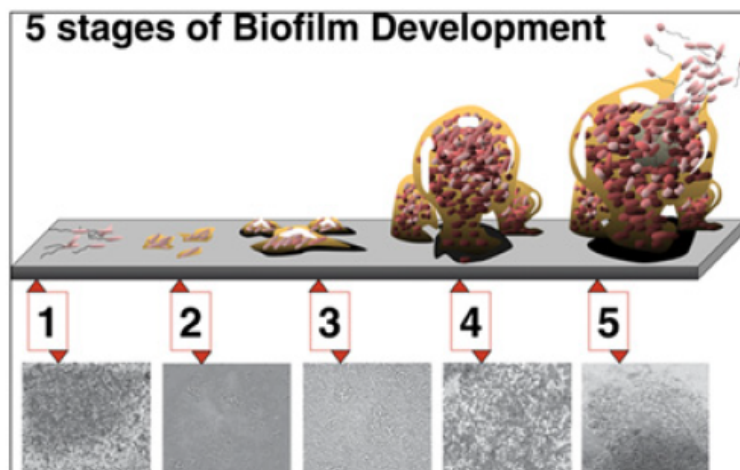
- and a Model for Rapid Niche-Specific Adaptation, Biofilm Formation, and Persistence. American Society for Microbiology [Internet] 2011. 10.1128/AEM.00546-11
12. Norma de criterios microbiológicos para los alimentos y bebidas de consumo humano. Ministerio de Salud. Dirección General de Salud Ambiental [Internet] 2008 [Consultado 8 de agosto de 2020] Pg. 15 – 17.
  13. Schöbitz, R., Ciampi, L., Nahuelquin, y. *Listeria monocytogenes*, un peligro latente para la industria alimentaria. *Agro Sur*. [Internet] Chile; 2009: 37 (1);1-8. <https://doi.org/10.4206/agrosur.2009.v37n1-01>
  14. Wang, H. et al. Biofilm Formation of *Salmonella* Serotypes in Simulated Meat Processing Environments and Its Relationship to Cell Characteristics. *Journal of Food Protection*. [Internet] 2013;76(10); 1784-1789. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-093>
  15. Dutka, K. et al. Bacteriophage use to control *Salmonella* biofilm on surfaces present in chicken slaughterhouses. *Poultry Science*. [Internet] São Paulo; 2017;96(9); 33392-3398. <https://doi.org/10.3382/ps/pex124>
  16. FAO. Poultry in the 21st Century: Avian Influenza and Beyond. International Poultry Conference [Internet] 2007
  17. FAO. Biannual Report on Global Food Markets: Meat and Meat products. Market summaries [Internet] 2020
  18. Conisilla, A. Guerra, R. Resistencia microbiana y capacidad de formación de biopelículas de cepas de *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* aisladas de carnes frescas provenientes de mercados de Lima Metropolitana. Universidad Nacional Mayor de San Marcos [Internet] 2019.

19. FAO. Buenas Prácticas para la Industria de la Carne. Fundación Internacional Carrefour. [Internet] Roma, 2007.
20. Dervilly, G. et al. Micropollutants and chemical residues in organic and conventional meat. Food Chemistry. [Internet] 2017:232 (1); 218-228. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.013>
21. Zwirzitz, B., Wetzels, S.U., Dixon, E.D. et al. The sources and transmission routes of microbial populations throughout a meat processing facility. Biofilms and Microbiomes. [Internet] 2020:26 (6). <https://doi.org/10.1038/s41522-020-0136-z>
22. Egas, D. Aislamiento e identificación de Salmonella y Escherichia coli productor de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en granjas avícolas de reproductoras pesadas en las provincias de Napo y Pastaza, Ecuador. [Internet] Ecuador: 2018.
23. Wagner, E. et al. Identification of biofilm hotspots in a meat processing environment: Detection of spoilage bacteria in multi-species biofilms. International Journal of Food Microbiology. [Internet] Australia; 2020:328 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108668>
24. Castro, N., Salazar, M. Formación de biopelículas y su resistencia frente a dos desinfectantes en Listeria monocytogenes aisladas de embutidos y superficies. Ciencia e Investigación [Internet] 2017:20(1):15-20. ISSN 1609-9044.
25. Pietro, J. Desarrollo técnico de líneas de productos para limpieza y control de biofilms en la industria alimentaria peruana. Universidad Nacional Agraria La Molina [Internet] 2019.
26. Múgica, R. et al. Nuevos Métodos para el control de Biofilms en la industria alimentaria. 22nd International Congress on Project Management and Engineering. [Internet] 2018.

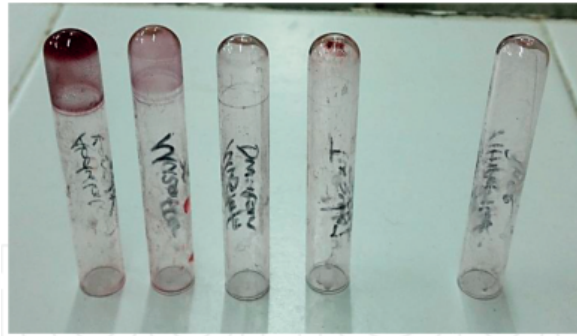
27. Kırmusaoglu, S. The Methods for Detection of Biofilm and Screening Antibiofilm Activity of Agents. Open access peer-reviewed chapter. [Internet] 2019. 10.5772/intechopen.84411
28. Rühmann, B., Schmid, J, Sieber, V. Methods to identify the unexplored diversity of microbial exopolysaccharides. Front. Microbiol. [Internet] 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00565>
29. Palomino-Camargo Carolina, González-Muñoz Yuniesky. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. Rev. Perú. med. exp. salud pública [Internet]. 2014; 31( 3 ): 535-546. ISSN 1726-4634
30. Abd El-Aziz, N., Gharib, A., Mohamed, E. and Hussein, A. Real-time PCR versus MALDI-TOF MS and culture-based techniques for diagnosis of bloodstream and pyogenic infections in humans and animals [Internet] 2020. J Appl Microbiol. <https://doi.org/10.1111/jam.14862>

## Anexos

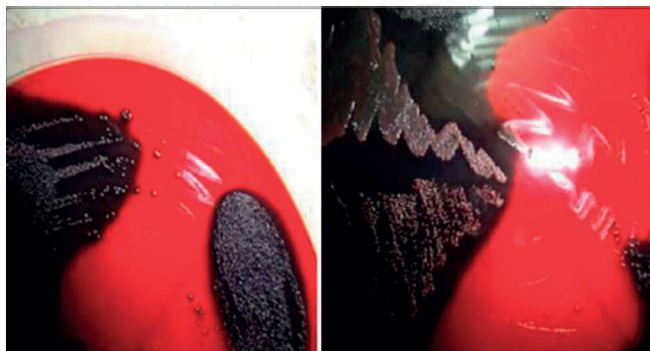
Anexo 1 - Sección 1.2: Las 5 etapas de la formación del biofilm: 1, adhesión reversible; 2, adhesión irreversible; 3, producción temprana de biofilm; 4, maduración; 5, dispersión (5)



Anexo 2 - Estrategia de abordaje: Tubos con formación de biofilms como resultado del método del tubo para detección cualitativa de estas estructuras (27)



Anexo 3 - Estrategia de abordaje: Método CRA mostrando evidencia de producción de EPS por la coloración negra sobre las líneas de siembra (28)



Anexo 4 - Estrategia de abordaje: Tabla de comparación de técnicas moleculares (29, 30)

Técnicas moleculares	Ventajas	Desventajas
qPCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Más específico y sensible que otros métodos</li> <li>• Amplificación puede ser monitoreada en tiempo real</li> <li>• No se necesita de un procesamiento post-qPCR</li> <li>• Puede detectar diversos microorganismos en simultáneo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Múltiples pasos a cumplir</li> <li>• Equipo costoso (termociclador)</li> </ul>
PCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Automatizado</li> <li>• Resultados precisos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El procesamiento post-PCR es necesario.</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diferenciación de varios serotipos de microorganismos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Posibilidad de contaminación cruzada</li> </ul>
MALDI-TOF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Preciso</li> <li>• Menor inversión y menor tiempo que el qPCR.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Equipo costoso</li> <li>• No es tan sensible como el qPCR y no reconoce tanto rango de bacterias como dicha técnica</li> </ul>