

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Veterinària

**Desarrollo de métodos rápidos para verificar la eficacia fungicida
de sustancias desinfectantes**

Tesis que presenta el licenciado en Medicina veterinaria y zootecnia

Luis Cuauhtémoc Galán Alejo

Para optar al Grado de Doctor

Dedico este trabajo:

A la memoria de mis padres:

Ismael Galán de la Cavada

Maria Felipa de Jesús Alejo Fuentes de Galán

y

Alicia Maldonado Rodríguez

Quienes fueron un ejemplo, en todos los aspectos de la vida y que me sirven de guía.

Quienes con su dedicación, apoyo y cariño, siempre estuvieron a nuestro lado.

Y siempre recordaré y nunca podré agradecer todo lo que hicieron por nosotros.

A mi Hijo:

Luis Ismael Galán López

Quien significa todo para mí, y por quien quiero superarme y cada día ser mejor.

A las familias:

Galán López.

Lozano López.

López Guerrero.

Agradezco:

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Al Programa de mejoramiento del profesorado (ProMeP).

Y a todas aquellas personas que hicieron posible que yo pudiera realizar mis estudios de doctorado.

A mi Director de Tesis:

Dr. José Juan Rodríguez Jerez

Quien me aceptó en su excelente equipo de trabajo y dedicó su valioso tiempo, dedicación y paciencia en mi formación profesional y me sirve de ejemplo para cuando yo me reincorpore a mis actividades académicas.

A la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona

Y al Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos

Quienes me brindaron la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado y el trabajo de investigación.

A la Dra. María Manuela Hernández Herrero

Quien siempre nos brindó su apoyo, comprensión, ayuda en todo momento, y a quien agradezco de manera especial su trato profesional y personal hacia mi persona.

A Mercedes Marín de Mateo

Por su valiosa ayuda sobre todo en la microscopía de los ensayos.

A todos mis profesores.

Por su excelente guía.

A mis compañeros de Doctorado:

Herra Herrador Cárdenas

Manuel López Lomelí

Fabián González Rivas

Núria Fuster Valls

Jesús Arnoldo Sánchez López

Laura Grau Escarré

Por su colaboración en la realización de este trabajo

Al personal del departamento:

Mari Carmen Herrador

Dolors Busquets

Laura Nicolás

Julia Lacuesta

A la empresa Henkel Ibérica, S.A. por el apoyo económico en la realización de este proyecto.

ÍNDICE

Índice de tablas.....	16
Índice de figuras.....	20
Índice de fotografías.....	22
I. INTRODUCCIÓN.....	23
1. <u>DESINFECTANTES</u>	27
1.1. Factores que influyen en la eficacia de los desinfectantes.....	37
1.1.2. Condiciones de crecimiento y tipo de microorganismo.....	37
1.1.3. Cepas microbianas.....	40
1.1.4. Sustancias interferentes.....	41
1.1.5. pH.....	41
1.1.6. Temperatura.....	43
1.1.7. Tiempo de contacto.....	44

1.1.8. Concentración.....	44
1.1.9. Concentración y tiempo de contacto.....	44
1.2. DESINFECTANTES: ACTIVIDAD, ACCIÓN Y RESISTENCIA.....	45
1.2.1. TIPOS DE DESINFECTANTES.....	45
1.2.2. Alcoholes.....	45
1.2.3. Productos surfactantes o ténsidos.....	50
1.2.4. Productos oxidantes productores de oxígeno (compuestos per): Peróxido de hidrogeno.....	52
1.2.5. Halógenos y sus compuestos.....	55
1.2.6. Productos reductores, aldehídos: Glutaraldehído.....	57
1.2.7. Ácidos orgánicos.....	58
1.3. MECANISMOS DE RESISTENCIA FUNGICA A DESINFECTANTES.....	59

2. <u>LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN</u>	60
2.1. Limpieza y desinfección del hogar.....	68
3. <u>PROTOCOLOS</u>	72
4. <u>MÉTODOS ELECTRICOS DE DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS:</u>	
<u>TÉCNICAS IMPEDANCIOMÉTRICAS</u>	77
5. <u>HONGOS</u>	80
5.1. HONGOS FILAMENTOSOS.....	85
5.1.1. <i>Aspergillus</i>	86
5.2. LEVADURAS.....	87
5.2.1. <i>Candida albicans</i>	88
II. <u>OBJETIVOS</u>	92
2.1. Objetivo general.....	93

2.2. Objetivos específicos.....	94
III. MATERIAL y MÉTODOS.....	95
3.1. Valoración de la actividad fungicida.	
Aplicación de las Normas UNE.....	96
3.1.1. Cepas fúngica.....	97
3.1.2. Preparación del inóculo de ensayo.....	98
3.1.3. Calibración.....	100
3.2. Preparación de reactivos y de los productos desinfectantes.....	100
3.2.1. Neutralizador.....	100
3.2.2. Agua dura.....	101
3.2.3. Albúmina.....	101
3.2.4. Productos desinfectantes.....	102
3.3. Valoración de la actividad fungicida.....	108

3.3.1. Norma UNE-EN 1275.....	109
3.3.2. Norma UNE-EN 1650 (condiciones sucias).....	109
3.4. La validación del ensayo.....	110
3.4.1. Validación de la toxicidad del neutralizador (B).....	110
3.4.2. Validación del método de dilución-neutralización (valoración de la eficacia del neutralizador) (C).....	111
3.4.2.1. Norma UNE 1275.....	111
3.4.2.2. Norma UNE 1650.....	112
3.4.3. Validación de las condiciones experimentales (sólo en la Norma UNE 1650).....	113
3.5. Adaptación de la norma UNE 1650 a técnicas impedanciométricas.....	114
3.6. Efecto de las condiciones ambientales en la viabilidad de las cepas fúngicas en superficies.....	115

3.6.1. Superficies de estudio.....	116
3.6.2. Tinción vital de fluorescencia.....	116
3.6.3. Técnica de microscopía de epifluorescencia directa.....	118
3.6.4. Captura de imagen: digitalización.....	118
3.6.5. Detección y medición de componentes de la imagen.....	119
3.7. Condiciones ambientales.....	120
3.8. Evaluación de la actividad fungicida en tela de algodón.....	121
3.8.1. Ensayo con tela aplicando la Norma UNE 1275.....	123
3.8.1.1. Protocolo 1 con tela.....	123
3.8.1.2. Protocolo 2 con tela.....	124
3.8.1.3. Protocolo 3 con tela.....	124
3.8.2. Ensayo con tela (condiciones sucias).....	125

3.9. Diseño estadístico.....	126
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	127
4.1. Determinación del recuento en función de la absorbancia.....	128
4.2. Valoración de la actividad fungicida.....	130
4.2.1. Determinación de la actividad fungicida aplicando las Normas UNE 1275 y 1650.....	130
4.2.2. Aplicación de técnicas de impedanciometría en la evaluación de la actividad fungicida. Validación de las técnicas de screening.....	138
4.2.2.1. Determinación del recuento en función del tiempo de detección.....	139
4.2.2.2. Determinación de la actividad fungicida según Norma UNE 1650. Técnica de screening.....	141
4.2.2.3. Evaluación de la actividad fungicida.....	144
4.3. Condiciones ambientales.....	168

4.3.1. Evaluación de la viabilidad en función de la cepa fúngica.....	168
4.3.2. Efecto de las condiciones ambientales sobre <i>C. albicans</i>	170
4.3.3. Efecto de las condiciones ambientales sobre A. Niger.....	173
4.4. Ensayo con tela.....	175
4.5. Discusión.....	179
4.5.1. Valoración de la actividad fungicida.....	180
4.5.2. Aplicación de técnicas de impedanciometría en la evaluación de la actividad fungicida.....	185
4.5.3. Condiciones ambientales.....	188
5.3. Ensayo con tela.....	190
V. CONCLUSIONES.....	192

VI. RESUMEN.....195

VII. BIBLIOGRAFÍA.....201

Índice de tablas

1.- Espectro de actividad de los principales desinfectantes.	34
2.- Antagonismo y sinergias de los principales desinfectantes.	35
3.- Aw mínima de crecimiento de algunos microorganismos.	39
4.- Aw aproximada de algunos productos alimenticios.	40
5.- pH de crecimiento de algunos microorganismos.	42
6.- pH aproximado de algunos productos alimenticios.	43
7.- Productos desinfectantes analizados aplicando la Norma UNE EN 1275.	102
8a.- Productos desinfectantes (LV; LH) analizados aplicando la Norma UNE EN 165.	104
8b.- Productos desinfectantes (LB; LR) analizados aplicando la norma UNE EN 1650.	106
9.- Características de los filtros ópticos.	117

10.- Sistema manual de ajuste de umbral.	118
11.- Productos evaluados.	121
12.- Evaluación de la actividad fúngica sobre <i>Candida albicans</i> .	133
13.- Evaluación de la actividad fúngica sobre <i>Aspergillus niger</i> .	134
14.-Concentración y tiempos recomendados de efectividad fungicida según Norma UNE 1275 o 1650.	136
15.- Evaluación de la actividad fúngica de los productos lavavajillas sobre <i>Candida albicans</i> , aplicando la norma 1650 en condiciones sucias y utilizando técnicas de recuento en placa e impedanciometría.	145
16.- Evaluación de la actividad fúngica de los productos lavavajillas sobre <i>Aspergillus niger</i> , aplicando la norma 1650 en condiciones sucias y utilizando técnicas de recuento en placa e impedanciometría.	147
17.- Evaluación de la actividad fúngica de los productos limpiadores generales del hogar sobre <i>Candida albicans</i> , aplicando la norma 1650 en condiciones sucias y utilizando técnicas de recuento en placa e impedanciometría.	151

- 18.- Evaluación de la actividad fúngica de los productos limpiadores generales del hogar sobre *Aspergillus niger*, aplicando la norma 1650 en condiciones sucias y utilizando técnicas de recuento en placa e impedanciometría. 153
- 19.- Evaluación de la actividad fúngica de los productos desinfectantes para el baño sobre *Candida albicans*, aplicando la norma 1650 en condiciones sucias y utilizando técnicas de recuento en placa e impedanciometría. 157
- 20.- Evaluación de la actividad fúngica de los productos desinfectantes para el baño sobre *Aspergillus niger*, aplicando la norma 1650 en condiciones sucias y utilizando técnicas de recuento en placa e impedanciometría. 159
- 21.- Evaluación de la actividad fungicida de los productos desinfectantes para la ropa sobre *C. albicans*, aplicando la norma 1650 en condiciones sucias y utilizando técnicas de recuento en placa e impedanciometría. 162
- 22.- Evaluación de la actividad fungicida de los productos desinfectantes para la ropa sobre *C. albicans*, aplicando la norma 1650 en condiciones sucias y utilizando técnicas de recuento en placa e impedanciometría. 163
- 23.- Evolución del recuento de *C. albicans* (log UFC/cm²) bajo diferentes condiciones ambientales. 170

24.- Evolución del recuento de *A. Niger* (log UFC/cm²) bajo diferentes condiciones ambientales. 172

25.- Evaluación de la actividad fúngica de los productos desinfectantes sobre *C. albicans* en tela de algodón aplicando las normas 1275 y 1650 utilizando técnicas de recuento en placa. 175

Índice de figuras

- 1.-Calibración de la absorbancia de las suspensiones de *Candida albicans* respecto al recuento en placa. 128

- 2.- Calibración de la absorbancia de las suspensiones de *Aspergillus niger* respecto al recuento en placa. 128

- 3.- Calibración del tiempo de detección de las suspensiones de *Candida albicans* respecto al recuento en placa. 139

- 4.- Calibración del tiempo de detección de las suspensiones de *Aspergillus niger* respecto al recuento en placa. 139

- 5.- Evaluación de la actividad fúngica de los productos lavavajillas sobre *Candida albicans* y *Aspergillus niger*, aplicando la norma 1650 en condiciones sucias y utilizando técnicas de recuento en placa e impedanciometría. 148

- 6.- Evaluación de la actividad fúngica de los productos de limpieza del hogar sobre *Candida albicans* y *Aspergillus niger*, aplicando la norma 1650 en condiciones sucias y utilizando técnicas de recuento en placa e impedancio – metría. 154

- 7.- Evaluación de la actividad fúngica de los productos desinfectantes para el baño sobre *Candida albicans* y *Aspergillus niger*, aplicando la norma 1650 en condiciones sucias y utilizando técnicas de recuento en placa e impedancia – metría. 161
- 8.- Evaluación de la actividad fúngica de los productos desinfectantes para la ropa sobre *Candida albicans* y *Aspergillus niger*, aplicando la norma 1650 en condiciones sucias y utilizando técnicas de recuento en placa e impedancia – metría. 164
- 9.- Evolución de la supervivencia y desarrollo de *C. albicans* en diferentes condiciones ambientales. 167
- 10.- Evolución de la supervivencia y desarrollo de *A. Niger* en diferentes condiciones ambientales. 168
- 11.- Resultados del ensayo en tela con el producto cuyo principio activo es el glutaraldehído. 173

Índice de fotografías

- 1.- Fotografía de esporas de *Aspergillus niger* para mostrar la ausencia de fragmentos miceliares y de esporas germinativas.....97

- 2.- Fotografía de células vegetativas de *Candida albicans* de color verde las vivas y de color rojo las lesionadas o muertas.....113

- 3.- *Candida albicans* adheridas a las fibras de algodón de la tela.....174

I. INTRODUCCIÓN

Cada vez alcanza mayor importancia la disminución en el empleo de aditivos alimentarios, especialmente de los conservantes, debido a un rechazo generalizado por parte de los consumidores (Bundgaard-Nielsen y col., 1996; Taylor y col., 1999). Una de las consecuencias teóricas sería el incremento en el número de casos de toxiinfecciones alimentarias, por lo que se imponen varios sistemas preventivos. El primero de ellos, la selección de unas adecuadas materias primas, la aplicación de unos programas correctos de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) y el empleo de sustancias limpiadoras y desinfectantes eficaces (Socias, 1992; Mortimore y Wallace, 2002).

La desinfección adecuada, o mejor dicho, la higienización adecuada durante la producción es importante para evitar problemas sanitarios. Normalmente se realiza un esfuerzo especial en la actividad desinfectante, pero poco se incide en la valoración de la eficacia fungicida. Si consideramos a los mohos y levaduras como microorganismos potencialmente patógenos, con implicaciones directas sobre la salud de los consumidores, podremos comprender la necesidad de incrementar los controles para evaluar la presencia de estos organismos y la capacidad potencial para asegurar su eliminación (Bundgaard-Nielsen y Nielsen, 1996).

Los principios de higiene han sido establecidos en europea a través del Comité Técnico de normalización europea (CEN/TC 153); considerando que la desinfección es la etapa final del programa de higienización, diseñado para eliminar los residuos macroscópicos y los cuerpos extraños y reducir el nivel de

microorganismos. Estas acciones pretenden garantizar la seguridad y calidad de los alimentos (Holah, 1995b). Estos principios están recogidos como pre-requisitos en los programas de APPCC, para conseguir una reducción en la declaración de enfermedades de declaración obligatoria.

No obstante, en los últimos años ha habido un aumento constante en los brotes declarados de enfermedades asociadas al consumo de alimentos en todo el mundo (Tauxe y col., 1997). Es importante poner de manifiesto que tanto los productores, como todos los participantes en la cadena alimentaria (de la granja al plato) tienen la responsabilidad de procurar la seguridad y calidad de sus productos (Powell y col., 2002).

Respecto a los mohos y levaduras, el comité técnico Europeo CEN/TC216/WG ha desarrollado pruebas (bactericidas y fungicidas) específicas para alimentos, industrias y mercados domésticos, siendo necesario que los desinfectantes para la higiene de las industrias alimentarias contengan compuestos con actividad fungicida (Bloomfield y col., 1994). Sin embargo, los datos de resistencia de mohos y levaduras a los tratamientos con desinfectantes son limitados, así como los datos en cuanto a la resistencia cruzada a las diversas familias de desinfectantes y entre especies de mohos y levaduras (Bundgaard-Nielsen y Nielsen, 1996).

Uno de los inconvenientes para poder tener un adecuado control de los mohos y de las levaduras en los alimentos y en las superficies es el elevado

tiempo necesario en los protocolos de rutina. En consecuencia, si el recuento de mohos y levaduras es útil para evaluar y predecir la calidad de los alimentos, será un parámetro esencial en los programas de control microbiológico. Para ello, la industria alimentaria necesita métodos rápidos y simples para la detección y recuento sin comprometer la sensibilidad y eficacia (Taniwaki y col., 2001).

En la Unión Europea existen unos doscientos cincuenta productos químicos de limpieza, de los cuales, aproximadamente cien, son utilizados como desinfectantes. Debido a sus propiedades físicas y químicas su acción no es lo suficientemente amplia para eliminar a todos los microorganismos. Ya que no todas las bacterias, ni especies de hongos, son igualmente susceptibles a una concentración de desinfectante, incluso diferentes cepas de una misma especie pueden variar en su resistencia, se hace necesario un empleo de diferentes sustancias o una rotación de las mismas (Jeffrey, 1995).

1. DESINFECTANTES

Históricamente, los desinfectantes han sido utilizados con éxito en el control y prevención de la salud. Después de que se desarrollaron las técnicas para aislar y replicar Los microorganismos, fue posible efectuar las pruebas para verificar la eficacia de los desinfectantes y se vio que los principios activos que inactivaban a los microorganismos en las placas de Petri, no eran igualmente eficaces en presencia de materia orgánica. Del mismo modo, la desinfección es dependiente del material a desinfectar (King, 1995). En cualquier caso, es evidente que la limpieza y desinfección de las superficies en la industria alimentaria disminuye los peligros alimentarios y los riesgos que se puedan generar (Holan, 1995b).

La limpieza y desinfección mantiene la calidad y garantiza la seguridad durante el proceso en la manipulación de los alimentos (Salvat y Colin, 1995). Este proceso de higienización requiere que la primera etapa a realizar sea una adecuada limpieza de todas las superficies para eliminar las sustancias que podrían interferir en la acción del desinfectante (Holan, 1995b).

El programa general de saneamiento, denominado higienización, incluye ambas etapas, limpieza más desinfección (García, 1988). Esta higienización, además, es tanto más eficaz cuanto mayor sea la temperatura. Inicialmente los efectos químicos de limpieza y desinfección se incrementan linealmente con la temperatura y aproximadamente se duplica por cada aumento de 10°C, siendo

esta eficacia proporcional hasta alcanzar temperaturas a las que se induce la muerte celular (Holan, 1995b).

Al mismo tiempo, los productos químicos empleados no poseen todos el mismo principio de acción, por lo que además del control de la temperatura, se hace necesario conocer todo el proceso de higienización, evaluando los diferentes productos a emplear, a fin de evitar antagonismos entre ellos (Salvat y Colin, 1995).

En este sentido, un antagonismo entre productos conducirá a una reducción en la eficacia desinfectante, por lo que un protocolo, que reduciría el riesgo de coincidencia de diversos productos químicos, consistiría en iniciar la higienización con una adecuada limpieza, procediendo a un enjuague con agua abundante. Esto nos lleva entonces a que cualquier superficie para ser desinfectada, primero debería ser limpiada y enjuagada, para eliminar todo el material orgánico extraño y los residuos de limpiadores (Salvat y Colin, 1995).

La limpieza y desinfección son generalmente las formas más efectivas, dentro de la industria alimentaria, para controlar la contaminación por los microorganismos en los productos y subproductos de origen animal (Salvat y Colin, 1995).

Si la higienización de superficies se considera esencial en la propia esencia del sistema de APPCC, será necesario investigar en el desarrollo de nuevos

productos con acción desinfectante, a fin de obtener sustancias que siendo efectivas, posean los menores efectos adversos (Harris y col., 2001). Así, los agentes antimicrobianos deberán ser formulados, de una forma practica, para optimizar la eficacia, estabilidad, seguridad y fácil aplicación del producto (Abadias y col., 2001).

La desinfección se define, de acuerdo con la British Standards Institution, como la destrucción de microorganismos, pero corrientemente no de esporas bacterianas. En consecuencia un desinfectante no ha de matar necesariamente todos los microorganismos, pero sí reducirá su número a un nivel aceptable, no resultando nocivo para la salud, ni perjudicial para la calidad de los alimentos perecederos (Kiermeier y Mrozek, 2000). No obstante, para Bousser (2000) por desinfección se entiende toda acción realizada para la disminución parcial o total de los gérmenes saprofitos, no considerando la eliminación específica de los patógenos. Blancou (1995) describe una definición de Block (1991) “un desinfectante es un agente que nos libera de infecciones, normalmente un agente químico, aunque también puede ser un agente físico que destruye las formas vegetativas pero puede no eliminar esporas bacterianas”.

Los desinfectantes modernos son complejas formulaciones de sustancias químicas, jabones, detergentes y compuestos que ayudan a la penetración de los principios activos (Kahrs, 1995).

Los desinfectantes químicos, de acuerdo a su actividad, se dividen en 4 niveles:

A. Desinfectantes de Nivel más alto con un amplio espectro de actividad esterilizante. En este grupo podríamos incluir el óxido de etileno y el glutaraldehído.

B. Desinfectante de Nivel alto con un amplio espectro incluso con cierta actividad esporicida. En este grupo se podrían incluir los siguientes productos:

- a. Glutaraldehído: agente de actividad alta en contra de bacterias, hongos, virus y esporas (Samberg y Meroz, 1995), pudiendo ser funguicida tras una aplicación de 15-30 minutos al 40% (Terleckyj y Axler, 1993).
- b. Hipoclorito sódico
- c. Peróxido de hidrógeno, más efectivo como esporicida que como bactericida (Baldry, 1983).

C. Desinfectante de Nivel intermedio con un amplio espectro pero sin actividad esporicida. En este grupo habría que incluir el etanol y el isopropanol (Terleckyj y Axler, 1983).

D. Desinfectante de Nivel bajo con un reducido espectro de actividad. Los agentes químicos como los compuestos de amonio cuaternario (Cloruro de benzalconio) son considerados como desinfectantes de baja actividad (Terleckyj y Axler, 1983).

La desinfección deberá utilizar la concentración óptima, ya que mayores concentraciones no necesariamente serán más efectivas, debido a que la relación entre la muerte microbiana y la concentración de los desinfectantes no sigue una relación lineal sino sigmoidea. La importancia de controlar este parámetro requiere no solamente un sistema continuo para la determinación de la concentración, sino también implementar programas de control de la eficacia del producto después de su uso. Entre estos programas de control, un sistema que puede proporcionar resultados inmediatos es la determinación de AdenosínTriFosfato (ATP). Esta técnica se basa en registrar los niveles de ATP presentes y que solamente se encuentran en las células animales, de plantas y de microorganismos (Holan, 1995b).

A medida que se avanzaba en el desarrollo de los desinfectantes se observó que se le podían añadir algunos aditivos en la misma formulación, como ciertos productos que actualmente combinan un detergente con un desinfectante. Aunque algunos como el cloro se siguen empleando como un solo ingrediente desinfectante, se trata de nuevos productos que requieren tiempo para que el producto sea efectivo en su actividad desinfectante (King, 1995).

Los desinfectantes pueden actuar en los hongos y levaduras básicamente de dos maneras: inhibiendo el crecimiento, clasificándose entonces como fungistático, o con una acción letal llamado fungicida. Pero debemos siempre recordar los principales parámetros que condicionan la acción, y por lo tanto la eficacia del desinfectante, como son la temperatura, el pH, la concentración y el tiempo de contacto (Maris, 1995), así como la presencia de materia orgánica y tipo de material a desinfectar (Tamási, 1995).

Las sustancias activas desinfectantes pueden clasificarse en Los siguientes grupos (Jeffrey, 1995):

- Compuestos de amonio cuaternarios.
- Fenoles.
- Halógenos-liberadores de compuestos.
- Fenoles halogenados.
- Aldehídos.
- Biguanida y biguanida polímera.
- Anfóteros.
- Compuestos basados en yodo.
- Alcoholes.
- Compuestos basados en peróxido.
- Alcalis.
- Misceláneos

En la tabla 1 se indica el espectro de actividad de los principales desinfectantes y en la tabla 2 el antagonismo y sinergias de los principales desinfectantes (Bouix y col., 2002).

Tabla 1. Espectro de actividad de los principales desinfectantes (Bouix y col., 2002)

Desinfectantes	Bacterias Gram +	Bacterias Gram -	Micobacterias	Esporas	Mohos	Levaduras	Virus Fagos
Ácido peracético	+++	+++		++	++	++	++
Alcoholes	++	++		0	++	++	+
Alcoholes de 70°	++	++	0	+	+	++	+
Glutaraldehído	+++	+++	++	+	+++ (+)	++ (+)	++
Amonios cuaternarios	+++	+*	0	0	+	+	+
Anfóteros	+++	+		0	+	+	0
Biguanidina	++	++		0	(+)	(+)	0
Clorhexidina	+++	++	+	0	+	+	0
Cloro	+++	+++	++	++	++	++	++
Derivados de mercurio	++	++	0	0	+	+	
Derivados fenólicos	Actividad variable según el compuesto						
Agua oxigenada	+++	+++		+	+	+	0
Yodo	+++	+++	++	++	++	++	++

*Inactividad sobre *Pseudomonas* sp., +++: muy buena actividad; ++: buena actividad; +: actividad media; 0: actividad nula; ±: actividad débil; (+): actividad no constante.

Tabla 2. Antagonismo y sinergias de los principales desinfectantes (Bouix y col., 2002)

Familias		Antagonismos	Sinergias
Halógenos	Compuestos clorados	Materias orgánicas Tiosulfatos Sulfuros Sales ferrosas Ácidos fuertes	
	Compuestos yodados	Materias orgánicas Compuestos de mercurio Tiosulfatos de sodio	Jabones Amonios cuaternarios
Aldehídos		Amoniaco	Grado higrometría >50%
Alcoholes		Materias orgánicas	Agua Compuestos yodados
Fenoles		Materias orgánicas (grasa, yema de huevo) Amonios cuaternarios Jabones para algunos fenoles Alcohol para el hexaclorofeno	Sales de sodio y potasio Sales metálicas
Tensoactivos	Aniónicos (jabón) Catiónicos (amonios cuaternarios) Anfóteros	Materias orgánicas Amonios cuaternarios Hexaclorofeno Materias orgánicas Grasa, jabones, calcio, magnesio, aluminio Jabones	Cresol
Derivados de los metales	Mercurio	Materias orgánicas Compuestos azufrados	Tenso-activos
Biguanidas	Clorhexidina	Materias orgánicas Jabón, lecitina, yema de huevo, corcho	Amonios cuaternarios Anfóteros
	Hexamidina	iones fosfatos	Alcoholes, halógeno Excipiente mojante
Carbamilidas		Materias orgánicas	Tenso-activos
Permanganatos de potasio		Materias orgánicas	

La principal forma de controlar la contaminación es la higienización (limpieza y desinfección). Pero su utilización en la industria alimentaria podría contaminar los alimentos, por lo que los productos a utilizar no deberán tener efectos tóxicos ni olores extraños, lo que reduce el grupo de desinfectantes a emplear en la industria alimentaria. Además, han de actuar a las temperaturas óptimas de los procesos alimentarios y con tiempos de acción preferiblemente inferiores a cinco minutos (García, 1989; Holah, 1995a).

Además de los factores que afectan a la higienización de las superficies, hay que considerar aquellos que afectan a los niveles de contaminación de las mismas. Es importante, y generalmente aceptado, que a mayor contaminación superficial es necesario un incremento en la actividad desinfectante o en los tiempos de acción (Rodríguez Jerez, 2003). En este sentido, los cambios en los niveles de contaminación pueden ser debidos también a variaciones estacionales (Whyte y col., 2001b), donde La patrones de distribución mensual (mayo, junio, julio y agosto) y estacional (finales de primavera y verano) de brotes de toxinfeción alimentaria indican que pueden estar asociados a condiciones climáticas, fiestas nacionales y periodos vacacionales (Lee y col., 2001), y probablemente, según estos mismos autores, a unas inadecuadas medidas preventivas, especialmente por una inadecuada limpieza y desinfección.

Además, no podemos olvidar el papel que en estos problemas tienen los aerosoles, ya que el agua es uno de los vehículos más importantes de la contaminación ambiental, debido a que el agua mantiene en suspensión a multitud

de microorganismos que posteriormente van a pasar a otras superficies, tanto próximas como lejanas, dependiendo de las corrientes de aire (Ren y Frank, 1992).

1.1 Factores que influyen en la eficacia de los desinfectantes

La Organización panamericana de la salud indica que hay factores que aumentan la eficacia de la desinfección y la primera es la limpieza previa. La eficacia de los desinfectantes está influida por muchos factores, donde la concentración, temperatura y tiempo de contacto son de primer importancia (Bruins y Dyer, 1995).

Según Holah (1995c) los factores más importantes son:

1.1.2 Condiciones de crecimiento y tipo de microorganismo:

Los desinfectantes deben tener el más amplio espectro posible de actividad en contra de virus, bacterias, hongos y esporas. Y deberán tener una acción biocida en contra de los microorganismos en una variedad de condiciones y estadios de crecimiento.

La resistencia de mohos y levaduras dependen en gran medida de la cepa y especie aislada, de los compuestos activos de los desinfectantes y de la situación concreta del microorganismo, ya que diferentes aislamientos de la misma especie pueden mostrar diferentes respuestas a los mismos desinfectantes, resultando en una efectiva muerte en un caso y casi ningún efecto en otros.

También será importante señalar las condiciones nutritivas del medio en el que se encuentre el microorganismo, así, la respuesta de una levadura de referencia como es *Candida albicans* sembrada en TSA (Tryptona de Soja Agar) indica que es mucho más resistente que si se siembra en medios diferentes como el CMA (Corn Meal Agar) (van de Voorde y col., 1987).

Para obtener una higiene adecuada en la producción, es por lo tanto, importante conocer la resistencia de los hongos alterantes en el proceso y en el producto, así como conocer la manera de seleccionar los desinfectantes apropiados.

El uso de un desinfectante no es usualmente suficiente. Es necesario elaborar un plan de desinfección donde al menos dos diferentes desinfectantes, conteniendo diferentes compuestos activos, se utilicen en rotación durante la semana para mantener bajo control la contaminación de mohos y levaduras y evitar resistencias (Bundgaard-Nielsen y Nielsen, 1996).

La cantidad de microorganismos, influye en la concentración de desinfectante, por lo que es importante reducir esta carga con el lavado y con el uso de los detergentes, antes de la desinfección.

En la tabla 3 observamos la A_w mínima de crecimiento de algunos microorganismos (Bouix y col., 2002) y en la tabla 4 la A_w aproximada de algunos productos alimenticios (Bouix y col., 2002)

Tabla 3. Aw mínima de crecimiento de algunos microorganismos (Bouix y col., 2002)

Bacterias	>0,910
Acinetobacter	0,990
C.botulinum E	0,970
C. perfringens	0,970
P. fluorescens	0,957
E. coli	0,950
Salmonella sp	0,950
C. botulinum A, B	0,950
B. subtilis	0,900
S. aureus	0,860
Bacterias halófilas	0,750
L. monocytogenes	0,92
Vibrio parahaemolyticus	0,93
Levaduras	>0,87
S. cerevisiae	0,90 – 0,94
Rhodotorula	0,90
Levaduras osmófilas	0,62
Hongos	>0,70
Botrytis cinerea	0,93
Fusarium	0,90
Mucor	0,80 – 0,90
P.expansum	0,85
A. flavus	0,78
Hongos xerófilos	0,70

Tabla 4. Aw aproximada de algunos productos alimenticios (Bouix y col., 2002)

Productos alimenticios	Aw
Ternera	0,990 - 0,980
Cerdo	0,990
Pescado	0,994 - 0,990
Charcutería seca	0,950 - 0,850
Leche	0,995
Alcachofas	0,987 - 0,976
Zanahoria	0,989 - 0,983
Pepinos	0,998 - 0,983
Champiñones	0,995 - 0,989
Patatas	0,985
Tomates	0,991
Manzanas	0,980
Cerezas	0,977
Uvas	0,986 - 0,963
Limonas	0,984
Melones	0,991 - 0,988
Naranjas	0,988
Melocotones	0,985
Confituras	0,800 - 0,750
Cereales	0,700

1.1.3. Cepas microbianas

Suelen emplearse cepas representativas, procedentes de colecciones internacionales, cuya estabilidad genética está controlada para así poder estandarizar más los métodos de estudio (Collado, 1994).

1.1.4. Sustancias interferentes

Las eficiencias de los desinfectantes se reducen con la presencia de sustancias interferentes, especialmente materia orgánica o inorgánica, por dos principales causas:

- La materia orgánica puede actuar no específicamente con el desinfectante consumiendo parte del producto aplicado, lo que hace disminuir su concentración efectiva, por lo que se evidencia una pérdida de potencial biocida.
- Algunos desinfectantes pueden ser también afectados por materias inorgánicas, como las sales presentes en el agua dura.

Además, en una forma no reactiva, la materia orgánica e inorgánica forman una barrera protectora, de tal manera, que los microorganismos son protegidos de sus efectos (Holan, 1995c).

1.1.5. pH

Los desinfectantes pueden verse afectados por el pH del agua en que se diluyen, por lo que sólo deberán ser utilizados en el intervalo de pH especificado por los productores (Holan, 1995c). El pH afecta tanto la carga superficial de los microorganismos como el grado de ionización del producto. Las formas ionizadas de los productos pasan mejor las membranas biológicas, y por lo tanto, son más

efectivos, por lo que agentes aniónicos pueden ser más efectivos a pH ácido y agentes catiónicos a pH alcalinos.

En la tabla 5 observamos el pH de crecimiento de algunos microorganismos y en la tabla 6 el pH aproximado de algunos productos alimenticios.

Tabla 5. pH de crecimiento de algunos microorganismos (Bouix y col., 2002)

Microorganismos	Mínimo	Óptimo	Máximo
Hongos	1,5 - 3,5	4,5 - 6,8	8,0 - 11
Levaduras	1,5 - 3,5	4,0 - 6,5	8,0 - 8,5
Bacterias	4,5	6,5 - 7,5	11,0
Bacterias acéticas	2,0	5,4 - 6,3	9,2
Bacterias lácticas	3,2	5,5 - 6,5	10,5
Lb. Plantarum	3,5	5,5 - 6,5	8,0
Lc. Cremoris	5,0	5,5 - 6,0	6,5
Lc. lactis	4,1 - 4,8	6,4	9,2
Lc. Acidophilus	4,0 - 4,6	5,5 - 6,0	6,5
Pseudomonas	5,6	6,6 - 7,0	8,0
P. aeruginosa	4,4 - 4,5	6,6 - 7,0	8,0 - 9,0
Enterobacterias	5,6	6,5 - 7,5	9,0
S. Typhi	4,0 - 4,5	6,5 - 7,2	8,0 - 9,6
E. coli	4,3	6,0 - 8,0	9,0
Staphylococcus	4,2	6,8 - 7,5	9,3
<i>Clostridium</i>	4,6 - 5,0	-	9,0
<i>C. botulinum</i>	4,8	-	8,2
<i>C. perfringens</i>	5,5	6,0 - 7,6	8,5
<i>C. sporogenes</i>	5,0 - 5,8	6,0 - 7,6	8,5 - 9,0
<i>Bacillus</i>	5,0 - 6,0	6,8 - 7,5	9,4 - 10
<i>L. monocytogenes</i>	4,3 - 5	6,5 - 7,5	-

Tabla 6. pH aproximado de algunos productos alimenticios (Bouix y col., 2002)

Productos alimenticios	pH
Ternera	5,3 - 6,2
Cerdo	5,3 - 6,4
Pollo	5,8 - 6,4
Pescado	6,5 - 6,8
Leche fresca	6,3 - 6,5
Mantequilla	6,1 - 6,4
Zanahorias	5,2 - 6,0
Patatas	5,4 - 6,2
Cebolla	5,3 - 5,8
Tomates	4,2 - 4,9
Manzanas	2,9 - 3,3
Naranjas	3,6 - 4,3
Uvas	3,4 - 4,5
Limones	2,2 - 2,4

1.1.6. Temperatura

Los desinfectantes deberán ser efectivos a temperaturas mínimas de aproximadamente 5°C, que son temperaturas propias de la refrigeración, y máximas de hasta 55°C, así mismo, para la mayoría de los usos deberán mantener su nivel de acción a temperatura ambiente (Holan, 1995c). Por lo general, al aumentar la temperatura aumenta la eficacia de los desinfectantes. Para muchos productos el aumento de 10° C supone duplicar la tasa de mortalidad. Pero con el fenol, este mismo aumento representa aumentar de 5 a 8 veces la eficacia.

1.1.7. Tiempo de contacto

Para la reacción entre el desinfectante y los microorganismos es un requisito indispensable el contacto entre ambos (Herruzco, 2000). Para ello, un tiempo de contacto suficiente es crítico para asegurar la desinfección en la mayoría de los casos, siendo generalmente aceptado un mínimo de cinco minutos (Holan, 1995b). Generalmente al aumentar el tiempo de contacto, aumenta la tasa de letalidad.

1.1.8. Concentración

La relación entre la muerte microbiana y la concentración del desinfectante no es lineal. Inicialmente, la población microbiana es difícil de matar a concentraciones bajas, pero a medida que se elevan se alcanza una máxima mortalidad. Más allá de esta concentración, los microorganismos se vuelven más resistentes con lo que sobrevive un número variable. Es importante, por lo tanto, utilizar las concentraciones recomendadas por los productores ya que los cambios a estas recomendaciones pueden no resultar en mejores efectos (Holah, 1995c).

1.1.9. Concentración y tiempo de contacto

La actividad del desinfectante es proporcional a la concentración y al tiempo de acción, de acuerdo con la ley establecida por Watson (1908) (Collado, 1994):

$$C^D \times t = K$$

C: concentración del desinfectante

K: constante.

T: tiempo necesario para una acción letal.

N: exponente de concentración.

1.2. DESINFECTANTES: ACTIVIDAD, ACCIÓN Y RESISTENCIA

Estudios realizados sobre en el modo de acción en contra de los hongos encuentran una interacción del desinfectante con la superficie de la pared celular, seguida de penetración al sitio de acción intracelular (McDonnell y Russell, 1999). La naturaleza y composición de la superficie varía pero puede ser alterada por cambios en el desarrollo. La interacción en la pared celular puede producir un efecto en la viabilidad.

1.2.1. TIPOS DE DESINFECTANTES

1.2.2. Alcoholes:

El poder biocida de los alcoholes alifáticos de cadena corta es proporcional a la longitud de la cadena; el máximo de actividad se sitúa entre 5-8 átomos de carbono. A partir de 6 carbonos, la insolubilidad en agua es muy limitante y hace necesario el empleo de emulgentes en sus formulaciones.

Desde el punto de vista de la ramificación de su molécula, se pueden clasificar los alcoholes por orden de selectividad decreciente:

Alcoholes n-primarios > isoprimerarios > secundarios > terciarios

Su acción se desarrolla en varias etapas:

1. Absorción por los lipoides de la pared.
2. Permeabilización, desagregación de la membrana citoplasmática.
3. Desnaturalización de las enzimas intracelulares por coagulación. (André Gillet, 2002).

De entre los alcoholes con una evidente acción desinfectante hay que destacar a dos, el etanol y el isopropanol. Estos dos compuestos han de ser elegidos, preferentemente, por su poder disolvente y su carácter volátil más que por su actividad antimicrobiana. Normalmente su capacidad para disolver y disolverse en las membranas celulares es lo que va a provocar la capacidad microbicida.

Se trata de líquidos incoloros, inflamables, miscibles en agua y disolventes de numerosos compuestos orgánicos. Tienen pocos antagonismos, aunque no se puede dejar de destacar que si se asocian con sustancias oxidantes se pierde el radical alcohólico, con lo que se pierde completamente la eficacia. De la misma forma, la existencia de suciedad rica en proteínas provoca que se consuman con la suciedad, precipitando los restos proteicos y perdiendo eficacia.

Mecanismo de acción: Poco se conoce sobre la forma específica de acción de los alcoholes, pero basados en su incremento de eficacia en la presencia de agua, se

cree que causan un daño en la membrana y rápida desnaturalización de proteínas, que interfiere con el metabolismo y lisis celular (McDonnell y Russell, 1999).

El etanol al 70% (v/v) es la presentación etanólica más activa frente a los microorganismos, ya que tiene una elevada capacidad de penetración, ejerciendo la acción en el interior celular e impidiendo la actividad enzimática. Si el porcentaje de etanol es superior, se evidencia una deshidratación celular previa, que actúa como preventivo de la penetración del producto en el interior celular, disminuyendo la acción desinfectante. El alcohol etílico de 70° requiere una actuación de 5 minutos para evidenciar una cierta eficacia. Si se parte de alcohol de 90°, a este se le ha de añadir agua estéril o clorhexidina. (McDonnell y Russell, 1999).

El isopropanol posee un poder disolvente frente a los lípidos, lo que facilita la penetración intracelular, consiguiendo un potencial antimicrobiano ligeramente superior.

Espectro de actividad: La actividad fungicida es despreciable, ya que estos productos no son esporicidas. El poder biocida del etanol y del isopropanol no es máximo cuando son empleados puros pero sí cuando contienen de un 30 a 40 por 100 de agua que, al hidratar las proteínas, las hace más sensibles a la desnaturalización. El etanol, en particular, no es bactericida más que en concentraciones superiores al 50 por 100. Si la concentración es más pequeña, puede potenciar la actividad de otros biocidas. Según la norma NF T 72 151, se obtiene una actividad bactericida para concentraciones medias de 25 a 70% (v/v).

Los alcoholes muestran un amplio espectro de actividad en contra de bacterias vegetativas (incluso *Micobacterium*), virus (activo sólo para los que poseen cubierta de lípidos) y hongos pero no tienen efecto esporicida, aunque inhiben la esporulación y germinación de esporas, aunque este efecto es reversible (Trujillo y Laible, 1970).

Toxicidad: El alcohol etílico y el isopropanol no presentan toxicidad notable en las aplicaciones industriales de tipo agroalimentario. Este antiséptico ha resistido la prueba del tiempo y tiene por ventaja que se contamina sólo con rareza, por lo que se utiliza ampliamente en los hospitales para la antisepsia de la piel y como desinfectante de estetoscopios, termómetros, ampollitas de medicamentos de múltiple uso y algunas superficies externas. Tiene por desventaja el disolver las montaduras de los lentes de instrumentos ópticos y el endurecer los materiales plásticos. Su rápida evaporación limita su uso como desinfectante de superficies ambientales (Criquelion y col., 2002).

Utilizaciones: Son utilizados en asociación con otros principios activos antimicrobianos con el fin de sinergizar las actividades y facilitar algunas aplicaciones (secado rápido), especialmente a baja concentración. Las principales asociaciones se obtienen con los aldehídos, amonios cuaternarios, fenol, anfóteros, derivados aminados y clorhexidina (Criquelion y col., 2002). Muchos productos con alcohol incluyen bajas cantidades de otros biocidas (particularmente clorhexidina), que se mantiene en la piel al evaporarse el alcohol, y otros excipientes (incluidos emolientes) que aumentan el tiempo de la evaporación y significativamente incrementa la eficacia del producto (Bush y col., 1986). Los alcoholes tienen la

ventaja de evaporarse rápidamente y sin dejar residuos; por lo que se emplean en forma de desinfectantes en spray en la industria alimentaria (Jeffrey, 1995).

Se realizan principalmente dos aplicaciones (Criquelion y col., 2002).:

- Desinfección de superficies por pulverización 100 a 150 ppm o 0,015%
- Asepsia de la piel.

Según Terleckyj y Axler (1983), el alcohol etílico al 70% (considerado de actividad intermedia) fue efectivo para los 15 hongos que ensayaron con excepción de *Aspergillus fumigatus*. Cuando se incrementó la concentración hasta el 85%, fue fungicida para todos los hongos.

1.2.3. Productos superficieactivos o ténsidos:

Son sustancias que reducen la tensión superficial de una solución acuosa frente a otras fases, con lo que desarrollan un efecto humectante y emulsionante. Por ello mejoran en términos generales la eficacia de los desinfectantes.

Productos basados en tensioactivos, que según su carga iónica, se clasifican en catiónicos (los más eficaces, por ejemplo, amonios cuaternarios), aniónicos (con gran efecto detergente como los jabones habituales) y anfóteros, con propiedades intermedias entre los anteriores (Kiermeier y col., 2000).

Los agentes superficieactivos (surfactantes) tienen dos regiones en su estructura molecular, un hidrocarbano, repelente al agua o grupo hidrófobo y el otro un atrayente de agua, grupo hidrófilo o polar. Dependiendo de la base, de la presencia o ausencia de la ionización del grupo hidrófilo, los surfactantes se clasifican en compuestos catiónicos, aniónicos, no iónicos y anfóteros (McDonnell y Russell, 1999).

Durante muchos años se ha señalado que son agentes activos en la membrana, especialmente los detergentes catiónicos, por lo que pueden disolver parte de las estructuras microbianas externas facilitando su destrucción. En las levaduras el sitio de elección es la membrana plasmática. Salton (McDonnell y Russell, 1999) propuso la siguiente secuencia de eventos con microorganismos expuestos a agentes catiónicos:

- Absorción y penetración del producto en la pared celular.
- Reacción con la membrana citoplasmática (lipídica o proteica) seguida por una desorganización en la membrana.
- Escape del material de bajo peso molecular intracelular.
- Degradación de proteínas y ácidos nucleicos.
- Lisis de la pared causada por enzimas autolíticas.

De entre las diferentes sustancias activas en este grupo hay que destacar los compuestos de amonio cuaternario. Se usan como desinfectantes de superficie y posee una buena acción detergente bajando la tensión superficial del agua. Los efectos de estos compuestos son rápidamente neutralizados por el agua dura, jabones y materia orgánica. Su espectro de actividad no es efectivo en contra de virus, micobacterias y esporas bacterianas (Terleckyj y Axler, 1983). Según estos mismos autores, respecto a los hongos, son considerados como desinfectantes de actividad baja y solo se recomiendan para superficies, no así para descontaminaciones medio-ambientales, porque *Aspergillus niger* y *A. fumigatus* sobreviven durante 60 minutos de contacto.

Los compuestos de amonio cuaternario son bactericidas, mientras que su acción en contra de hongos y virus son dependientes de la dilución y, al igual que los alcoholes, muestran poco o ningún efecto esporicida (Samberg y Meroz, 1995).

1.2.4. Productos oxidantes productores de oxígeno:

COMPUESTOS <PER>: Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrogeno (H_2O_2), es un biocida ampliamente empleado para desinfección, esterilización y antisepsia. Comercialmente se presenta en concentraciones comprendidas entre el 3% y el 90 %. Considerado biodegradable, ya que se degrada rápidamente en dos productos inocuos agua y oxígeno. Posee un amplio espectro y eficacia.

Esta eficacia disminuye cuando lo que se necesita es una eliminación de esporas. En estos casos, la actividad esporicida se verifica cuando la concentración mínima de uso se encuentra comprendida entre el 10 y el 30%, siendo generalmente necesario un incremento en el tiempo de contacto, superior siempre a 5 minutos (Russell, 1991).

Esta actividad se incrementa significativamente en la fase gaseosa, actuando como oxidante, produciendo radicales libres hidróxido ($\cdot OH$) que atacan esencialmente los componentes celulares, incluyendo lípidos, proteínas y ADN (McDonnell y Russell, 1999).

La acción desinfectante se asocia entonces a su capacidad oxidativa, por lo que tradicionalmente se ha comparado con los productos halogenados. Sin embargo, un suficiente potencial oxidativo es sólo un requisito para servir como desinfectante, que debe ir acompañado de una adecuada solubilidad, estabilidad y

efecto de reacción específica sobre las células. De forma análoga al cloro activo, también se habla del oxígeno activo como principio activo.

En este sentido, el peróxido de hidrógeno, al liberar oxígeno en el agua con actividad microbicida, es un principio activo que puede utilizarse en operaciones próximas a alimentos, aunque con ciertos riesgos de inducir a oxidaciones de los propios componentes de los productos alimenticios (Wildbrett, 2000).

La agencia de protección del medio ambiente (EPA) reguló el uso de desinfectantes con cierta toxicidad, como el formaldehído, dentro de las sustancias tóxicas controladas. Debido a la acción reguladora de la EPA, se han estudiado y valorado desinfectantes alternativos. Entre ellos el peróxido de hidrógeno ha sido uno de los de elección, ya que los resultados comparativos demuestran un efecto positivo sin efectos adversos (Sheldon y Brake., 1991).

El peróxido de hidrógeno ha sido utilizado durante muchos años como un desinfectante particularmente de superficie en programas de higienización industrial y comercial (Spaulding y col., 1977; Sheldon y Brake., 1991), ya que se descompone rápidamente después de su empleo en agua y oxígeno, no posee olor desagradable, ni mínimos problemas de seguridad cuando la manipulación es adecuada (Sheldon y Brake, 1991).

Según estos mismos autores, el rociado o lavado con agua abundante no reduce el recuento de levaduras y mohos, pero con peróxido de hidrógeno se

consigue eliminar el 97,1% de estos microorganismos, a una concentración adecuada.

Cualquier agente que destruya microorganismos, debe ser superficie activo, pero los bactericidas y fungicidas en la cáscara de huevo probablemente reaccionen y alteren la cutícula (envoltura física) (Sheldon y Brake., 1991).

Coliformes, mohos y las levaduras constituyen aproximadamente, del total de la microbiota aeróbica, entre el 3% y el 20% respectivamente (Sheldon y Brake., 1991).

Las esporas de *Aspergillus niger* son significativamente más resistentes al peróxido de hidrogeno que las bacterias. La aparente resistencia de las esporas fúngicas al peróxido de hidrógeno está asociada a la cubierta que envuelve al protoplasma (Foegeding, 1985; Sheldon y Brake., 1991). Es necesaria una matización, relacionada con la temperatura de trabajo, ya que a bajas temperaturas requiere un mayor tiempo de contacto (Terleckyj y Axler, 1983).

El peróxido de hidrogeno disponible al 30% en agua es un eficaz desinfectante de superficie en contra de virus, bacterias, micobacterias y hongos, aunque también ineficaz contra de esporas bacterianas, siendo corrosivo e inestable a altas temperaturas y luz.

El peróxido de hidrogeno ha sido empleado satisfactoriamente como desinfectante durante muchos años en los programas de higienización en la industria y el comercio (Samberg y Meroz, 1995).

En cuanto a la concentración de uso, ; Andrews (1996) y Rosenthal y col. (1999) observaron que el rango de efectividad de una solución desinfectante con el 3% de peróxido de hidrógeno, contra algunas bacterias y *Candida albicans*, era similar en todos los casos.

1.2.5. Halógenos y sus compuestos: Hipoclorito sódico

Los productos oxidantes halogenados, bien sean el cloro y derivados, o el yodo y derivados (yodóforos), son uno de los grupos de desinfectantes más utilizados en la actualidad, generalmente como desinfectantes de superficies los primeros y como antisépticos de piel y mucosas los segundos, aunque tanto unos como los otros pueden tener efectos tóxicos.

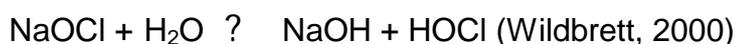
Dependiendo de la concentración y pH es esporicida (Bloomfield y Arthur, 1992; Russell, 1994; Russell, 1985). Durante el tratamiento, las esporas pierden refractabilidad, la cubierta de la espora se separa del córtex y ocurre la lisis, gracias a que se aumenta la permeabilidad de la cubierta de la espora (McDonnell y Russell, 1999).

Por su capacidad como fuertes oxidantes, todos los halógenos tienen acción desinfectante, aunque en su forma elemental sólo tienen importancia práctica el cloro y el yodo (Wildbrett, 2000).

En la desinfección de industrias alimenticias, los compuestos liberadores de cloro activo constituyen además un importante grupo de principios, también de acción oxidante, con una elevada aceptación, siendo considerados como productos de elevada eficacia (Wildbrett, 2000).

La primera vez que se utilizó el hipoclorito fue en Francia en 1785, como agua de Javel, siendo utilizada como blanqueante en la industria textil. Labarraque (1825) y Semelweis (1846) descubrieron que el hipoclorito era efectivo para controlar las infecciones en las heridas, desde entonces, se utilizan ampliamente como limpiador - desinfectante tanto en el medio doméstico (1869), como industrial y hospitalario. (Cook y col. , 1996; Rutala y Weber, 1997).

Dentro de los principios activos más importantes se encuentran los portadores de cloro inorgánicos como el hipoclorito sódico (NaOCl) llamada "eau de Labarraque" o lejía de cloro y el hipoclorito de potásico (KOCl), "eau de Javel". El principio activo es el ácido hipocloroso o sus iones que a través de las paredes celulares, destruye sus componentes vitales.



El hipoclorito sódico, al disolverse en agua, origina los siguientes compuestos clorados, predominando uno u otro en función del pH de la solución (Cook y col. , 1996):

- Ión hipoclorito (OCl⁻); predomina a pH alcalino.
- Ácido hipocloroso (HOCl); predomina a pH alcalino.
- Cloro gaseoso (Cl₂); predomina a pH = 2.

1.2.6. Productos reductores, Aldehídos: Glutaraldehído y formaldehído

El glutaraldehído es un producto reductor que sigue siendo el desinfectante de referencia para la desinfección de instrumental, aunque con las micobacterias hay que aplicarlo durante mucho tiempo de contacto, teniendo efectos tóxico e irritante, por lo que hay que reducir sus niveles o eliminar sus residuos postratamiento.

Es un importante dialdehído que se emplea para desinfectar y esterilizar, particularmente a bajas temperaturas. No hay estudios recientes del mecanismo de acción fungicida del glutaraldehído. No obstante, algunos estudios sugieren que el sitio principal es la pared celular, especialmente su mayor componente, la quitina (McDonnell y Russell, 1999).

Debido a su evidente eficacia, ocupan un lugar destacado entre los desinfectantes utilizados en la industria alimentaria. Corresponde máxima importancia al formaldehído (HCHO). Se emplea hoy preferentemente en

combinación con otros principios activos, sobre todo con sustancias surfactantes y con otros aldehídos. Entre éstos últimos, se utiliza el glutaraldehído [OHC-(CH₂)₃-CHO], lo que reduce la intensidad del olor pero mantiene su eficacia (Wildbrett, 2000).

El glutaraldehído, a la concentración del 2% y tras 15 minutos de contacto, tiene capacidad para eliminar a la mayor parte de los mohos presentes (Terleckyj y Axler, 1983). Ya que los hongos son los microorganismos más resistentes, se considera, por tanto, que el glutaraldehído es un producto de alta actividad, tanto contra bacterias, hongos, virus como de sus esporas (Samberg y Meroz, 1995). No obstante, en el caso de las esporas, la concentración mínima efectiva es del 20% (Grow, 1995).

1.2.7. Ácidos orgánicos:

Una serie de ácidos orgánicos cuentan con propiedades antimicrobianas, preferentemente microbiostáticas, por ejemplo ácido fórmico, ácido benzoico, etc. Mediante halogenización pueden aumentarse los efectos hasta alcanzar un nivel microbicida adecuado para la desinfección. Las propiedades desarrolladas en su empleo obedecen mayormente a su contenido ácido, aunque se ha descrito una considerable resistencia de mohos y levaduras a los mismos (Wildbrett, 2000).

1.3. MECANISMOS DE RESISTENCIA FUNGICA A DESINFECTANTES

Así como hay mucha información sobre cómo se comportan las bacterias frente a los diferentes microorganismos, es muy poco lo que se conoce sobre la acción de antisépticos y desinfectantes sobre mohos y levaduras y de cómo éstos se protegen.

En principio existen dos mecanismos generales de resistencia (McDonnell y Russell, 1999):

- A. De alguna manera la pared celular presenta una barrera para reducir o evitar la entrada de un agente antimicrobiano. En este caso, retomando la denominación de Hector (1993), se trataría de una resistencia intrínseca, es decir, una propiedad del microorganismo que le permite sobrevivir en presencia de un biocida.

- B. Resistencia adquirida. En esta situación, la resistencia se asocia a una mutación del material genético.

2. LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN

La contaminación de los productos alimentarios puede vehicularse por varias vías, siendo las más frecuentes el aire y los manipuladores de alimentos, ya que ellos pueden introducir los patógenos durante la producción, procesado y distribución (Angelillo y col., 2000). Mención especial hay que hacer respecto a las superficies, siendo donde se preparan los alimentos para su venta, así como también para su almacenamiento y el posterior uso en los hogares. Por ello es la vía más importante a controlar, por lo que deben implementarse programas de higienización (Holan, 1995a).

Como ya se ha señalado, el programa de saneamiento o higienización incluye las etapas de limpieza y desinfección, que ocupan un prominente lugar en el manejo de los alimentos, en su seguridad y calidad, y lo que lo ha convertido en uno de los pilares centrales del sistema de APPCC para garantizar la seguridad. Al mismo tiempo hay que destacar a las normas ISO, como sistema de gestión integral de la calidad de los alimentos elaborados por la industria (Salvat y Colin, 1995; Mortimore y Wallace, 2002). La limpieza y la desinfección son los protocolos más efectivos, dentro de esta industria, para controlar la contaminación microbiana de los alimentos (Salvat y Colin, 1995), así como para limitar las contaminaciones cruzadas (Holah, 1995a).

El proceso de limpieza puede actuar según tres mecanismos, como son, solubilización, emulsión, o por acción mecánica (ICMSF, 1980). Tiene como principal

finalidad movilizar la materia orgánica, y esto involucra la utilización de productos con actividad detergente, que deben haber sido aprobados para su empleo en superficies en contacto con alimentos. La elección de los productos de limpieza ha de depender principalmente del tipo de suciedad presente (Salvat y Colin, 1995).

Antes de utilizar un desinfectante debería realizarse una adecuada limpieza a fondo y no deberán emplearse a concentraciones mayores que las recomendadas por el fabricante, en un intento por compensar una inadecuada limpieza o un menor tiempo de contacto. Si es posible identificar los patógenos específicos del área de riesgo, se podrá seleccionar el desinfectante más adecuado. (Bruins y Dyer, 1995).

Es importante destacar que el proceso de lavado no pretende una reducción de la carga microbiana. En este sentido, es posible observar una reducción en los recuentos tras el lavado de alimentos o de superficies, ya que la energía cinética del agua, su temperatura y la acción combinada de los tensioactivos con la que lavan, logran desprender un número de microorganismos, que en algunos casos puede ser significativamente importante, lo que disminuye el recuento microbiano (Pordesimo y col., 2002). Por lo tanto, el lavado es una recomendación para reducir la carga microbiana en alimentos, especialmente en frutas y verduras crudas, aunque no hay mortalidad microbiana sino un cambio de lugar de la contaminación (Brackett, 1992; Harris y col., 2001). Si además de la acción limpiadora añadimos algún desinfectante, como el hipoclorito sódico, las consecuencias serán más manifiestas, consiguiendo una disminución mayor en el recuento y limitando la proliferación de mohos en vegetales, responsables de la acumulación de cancerígenos tan importantes como las micotoxinas (Beuchat y Ryu, 1997; Collins, 1997).

Una vez que la limpieza se ha realizado, hay que verificar que la acción haya sido correcta. Normalmente, la verificación se realiza visualmente, lo que hace que las superficies se vean limpias. No obstante, no se han eliminado los microorganismos y consecuentemente no se han eliminado los peligros, por lo que se puede producir una contaminación cruzada con las superficies donde se preparan estos alimentos, así como con todos los utensilios utilizados (Brackett, 1992; Harris y col., 2001). Ésto hace que muchos departamentos de control de calidad, además de utilizar los métodos de inspección visual, incluyan los análisis microbiológicos, ya que estos controles son importantes para reducir los riesgos de los brotes debidos a las enfermedades transmitidas por alimentos, incluyendo a varios tipos de hongos como mohos y levaduras (Kassa y col., 2001).

Los alimentos pueden contaminarse con las manos, con las superficies para cortarlos, el cuchillo y todos aquellos objetos en contacto con ellos al prepararlos. Los alimentos crudos de origen animal son la principal fuente de patógenos, y la principal fuente de contaminación cruzada hacia los alimentos vegetales (Zhao y col., 1998). Al limpiar con detergente se puede reducir el recuento hasta en dos logaritmos (Verran y col., 2001a). Por tal motivo, se ha reconocido que cualquier superficie, para ser desinfectada, primero debía ser limpiada para eliminar todo el material orgánico extraño (King, 1995; Hackney y Porter, 1995). Posteriormente la desinfección será la etapa final del programa de higienización, que está diseñada para reducir el nivel de microorganismos, tanto patógenos como de alteración (Taylor y col., 1999), logrando con ésto que las superficies en la industria alimentaria

disminuyan los riesgos en los subsecuentes procesos (Holan, 1995b) y así minimizar los peligros (Takeuchi y Frank, 2000).

Los principios de higiene han sido establecidos en Europa a través del Comité Técnico de Normalización Europea (CEN/TC 153). Además, en la industria alimentaria, las superficies higiénicas deben de ser fáciles de limpiar según la Directiva 93/43/CEE (Verran y col., 2001b), por lo que el actual mantenimiento de las condiciones higiénicas es un importante pre-requisito para el funcionamiento adecuado del Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC), que es un sistema diseñado para identificar, evaluar y controlar los peligros alimentarios, emergiendo durante la última década como una aproximación primaria para garantizar la seguridad de los alimentos (Gilling y col., 2001).

Según Puig-Durán (1999) el procedimiento de limpieza debe tener en cuenta los siguientes puntos:

- Qué constituye un punto crítico.
- Tipo de contaminación.
- Operación a realizar.
- Frecuencia de limpieza y desinfección.
- Productos a utilizar.
- Dilución y forma de uso.
- Métodos de verificación y control.
- Medidas correctoras.
- Registros correspondientes.

Los datos epidemiológicos señalan un incremento en la incidencia de enfermedades debidas a los alimentos (Alterkruse y col., 1997), normalmente asociados al consumo de productos frescos y atribuidos a posibles cambios en las practicas agrícolas, de distribución, y consumo (Beuchat, 1996; Collins, 1997; Tauxe, 1997). Estas enfermedades alimentarias han resurgido como un problema mayor en salud publica por el grado de implicación en la economía de un país. Por ejemplo, solamente en los Estados Unidos de América se ven afectados unos 75 millones de enfermos, de los que 325.000 requieren hospitalización y 5.000 fallecen (Keller y col., 2002). Sin embargo, con relación a los hongos, poca información se recoge, sobre todo en lo relativo a la formación de micotoxinas o las implicaciones de la alimentación en la transmisión de algunas levaduras patógenas.

Los principales limpiadores utilizados en la industria alimentaria son los detergentes alcalinos, que tienen una fuerte capacidad de saponificación, y que pueden eliminar el 99% de los microorganismos adheridos al acero inoxidable. En segundo lugar hay que señalar a los detergentes ácidos, que son capaces de disolver los depósitos minerales. Entre los desinfectantes, hay que destacar el ácido peracético, los compuestos de amonio cuaternario, el cloro y los yodóforos (Boulangé-petermann, 1996).

Estos productos se dividen en las siguientes categorías:

Álcalis. Activos en contra de la materia orgánica, porque saponifican las grasas y disuelven las proteínas.

Ácidos. Eliminan los depósitos de calcio (del agua dura) y restablecen las superficies de acero.

Orgánicos. Con álcali y ácidos incorporados por su habilidad en reducir la tensión superficial del agua, incrementado el poder humectante.

Además ciertos productos etiquetados como “detergente–sanitizante” combinan un detergente con un desinfectante. Aunque destruyen microorganismos, ésto no se considera lo más adecuado ya que la presencia de materia orgánica puede inhibir o reducir la actividad de algunos desinfectantes. Consecuentemente, se debe conocer muy bien todo el proceso de limpieza y desinfección para evitar antagonismos entre los diferentes productos empleados (trazas de detergente aniónico pueden reaccionar con desinfectantes catiónicos) (Salvat y Colin, 1995).

Para evitar ésto actualmente en muchas plantas procesadoras de alimentos prefieren utilizar los detergentes y desinfectantes por separado (Makela y col., 1991), aunque recientemente se ha visto que la actividad limpiadora de los detergentes-sanitizantes es mucho mejor que los detergentes solos. Esto puede ser debido a la acción oxidante de muchos desinfectantes, especialmente del hipoclorito, lo que contribuye a la eliminación de los restos orgánicos que actúan como nutrientes para la microbiota residual (Rodríguez-Jerez, 2003).

Respecto a los hongos, es importante considerar que el principal grupo de alimentos en los que pueden suponer un peligro es en los vegetales. En este

sentido, la fruta constituye un problema especialmente grave, ya que se puede consumir como tal fresca, pero también en diversos productos como las leches fermentadas. Es por ello que una de las mejores prevenciones es el lavado con agua a presión. Hasta tal punto esta acción es importante que la fruta que no se lava durante toda la línea de producción, cosecha, proceso de envasado, transporte y/o venta es altamente susceptible a deterioro por mohos (Yu y col., 2001). En realidad el rociado con agua, por si solo, no reduce significativamente el recuento de mohos y levaduras, si no es con cierta presión. Sin embargo, al agua adicionada con peróxido de hidrógeno consigue eliminar hasta el 97% de los hongos (Sheldon y Brake, 1991). La excepción más clara en este punto es la capacidad de supervivencia de las esporas de *Aspergillus niger*, ya que son especialmente resistentes al H₂O₂, debido a su resistente cubierta fúngica que envuelve el protoplasma (Foegeding, 1985; Sheldon y Brake, 1991).

No obstante, uno de los problemas más importantes para evaluar la eficacia real de la desinfección es la elección de las condiciones de evaluación. Frank y Chmielewski (1997) determinaron que para estimar la eficacia en el proceso de saneamiento, se deben utilizar los materiales y métodos más parecidos a las condiciones reales de uso. En este sentido, es conocido desde hace más de 25 años que algunos microorganismos son más resistentes a los desinfectantes en pruebas de superficie como el acero, que en condiciones *in vitro* (Mosley y col., 1976). El acero inoxidable, al igual que la cerámica para los suelos, es el material más utilizado en la industria alimentaria para el contacto con los alimentos (Driessen y col., 1984; Lewis y Gilmour, 1987; Frank y Chmielewski., 2001), ya que son estables, inertes y pueden ser tratados fácilmente para obtener superficies fáciles de limpiar.

De entre las diferentes superficies las llaves del grifo son una fuente significativa de contaminación cruzada entre las manos y los alimentos (Chen y col., 2001).

El mismo tipo de acero inoxidable puede tener diferentes tipos de acabado que confiere distintas propiedades fisicoquímicas, electroquímicas, rugosidad y composición molecular de la superficie (Boulangé-petermann, 1996), por lo que los productores de acero inoxidable venden productos con diferentes tipos de acabado y promueven diferentes aplicaciones (Frank y Chmielewski., 2001). Aquellos materiales que retengan menos microorganismos y que presenten el menor riesgo de contaminación cruzada después de limpiar serán la elección higiénica (Verran y col., 2001b).

Gélinas y Goulet (1983) demostraron que cuando se desinfectan superficies de acero inoxidable o vidrio, la concentración de compuestos de amonio cuaternario, glutaraldehído, hipoclorito sódico o yodóforos requeridos es solamente entre 1/10 a 1/100 que para desinfectar otras superficies como el plástico (polipropileno, poliuretano o poliéster) y el aluminio.

Además es importante, que después de cada operación de limpieza y desinfección, se enjuague muy bien para evitar contaminar los alimentos con residuos del producto empleado (Dunsmore y Thomson, 1981). Esto implica que los detergentes y desinfectantes que se utilicen van a los sistemas de drenaje y, por lo tanto, no deben constituir un daño a la naturaleza (Dhaliwai y col., 1992).

2.1 LIMPIEZA Y DESINFECCION DEL HOGAR

El Centro de Control y Prevención de enfermedades (CDC), señaló que la mayor parte de los casos de toxinfeción alimentaria se producen en el entorno doméstico, datos coincidentes con muchos otros países desarrollados (Knabel, 1995; Zhao y col., 1998; Kusumaningrum y col., 2002).

Estos brotes ocurren frecuentemente por un manejo inadecuado en la preparación de los alimentos, en combinación con un inadecuado almacenamiento o una deficiente cocción (Scott, 1996 ; Simone y col., 1997); por lo que se hace necesaria una promoción de practicas higiénicas efectivas en el hogar para así romper la cadena de la contaminación cruzada (Scott, 1999). Estos mismos autores sugieren que las materias crudas son probablemente la principal fuente de contaminación en la cocina, y las áreas próximas a la cocina también actúan como fuentes de contaminación. Las telas de limpieza, así como las esponjas, se han reconocido como los principales agentes diseminadores de microorganismos, y que persisten en estos vehículos (Josephson y col., 1997; Rusin y col., 1998; Scott y col., 1982; Speirs y col., 1995).

Scott y col. (1982), indicaron los lugares que son más representativos de un riesgo potencial de infección. En la cocina se incluyen la superficie de trabajo, tablas de cortar, fregaderos, escurridores, así como las bayetas, y telas, y la contaminación por las manos en las superficies de contacto donde se manejan los alimentos.

La cocina posiblemente es en el hogar el área más importante para transferir los microorganismos patógenos, ya que por lo general el hipoclorito se emplea más en la limpieza del baño (Scott y col., 1984), demostrando una reducción importante de microorganismos en todas las superficies en las que se utiliza (Scott y Bloomfield, 1985).

Investigaciones epidemiológicas han demostrado que la higiene insuficiente en los hogares incrementa los riesgos en la salud. Los siguientes lugares son especialmente de alto riesgo para la contaminación cruzada (Borneff y col., 1988a):

- Superficies de trabajo, especialmente tablas de cortar, ya sean de madera o plásticas
- Maquinas de picar
- Cualquier superficie no limpiada regularmente y con restos de materia orgánica

En el hogar no se hace el mismo esfuerzo limpiador que en la industria, considerando que los desinfectantes son superfluos, salvo para el cuarto de baño y la cocina. Sin embargo cuando se emplea hipoclorito y con algunas rutinas de trabajo, aproximadamente el 90% de las superficies reducen su carga microbiológica (Borneff y col., 1988b).

Bloomfield (1978) señaló cuatro categorías mayores de contaminación que incluye áreas secas (suelos, paredes, mobiliario, ropa etc.), áreas húmedas (baño, fregaderos, lavamanos, etc.) alimentos y personas. Se sospecha que los alimentos

probablemente sean la principal fuente de contaminación al introducirlos en la cocina.

Además, la contaminación de la bayeta y otros utensilios húmedos empleados en la limpieza sugiere que se pueden convertir en reservorio y diseminadores de la contaminación en la cocina (Scott y col., 1982).

En el mercado existen gran cantidad de productos desinfectantes y limpiadores que se utilizan en el hogar. Pero los detergentes y el agua caliente no producen una reducción sustancial en la contaminación en las superficies domésticas, por lo que se hace necesario, según estos mismos autores, desinfectar y secar con posterioridad (Scott y col., 1984).

No obstante, no se recomienda adoptar los métodos de limpieza y desinfección tan estrictos como los hospitalarios a los hogares, en lugar de ello, se deberán utilizar detergentes con algún desinfectante no tóxico como el hipoclorito sódico o el H_2O_2 (Borneff, 1989).

El secado de las superficies, ropa y otros utensilios produce una reducción sustancial en el número de microorganismos, aunque cuando estos objetos se ponen en contacto con las manos u otros objetos, los microorganismos se transfieren en número suficiente para representar un peligro potencial si contactan con alimentos (Scott y Bloomfield, 1990a). En este sentido, el lavado de ropa sólo con detergente, tiene una reducción limitada en su carga microbiana, mientras que esta ropa guardada a temperatura ambiente durante 24 horas muestra un aumento

de los supervivientes. Para una efectiva descontaminación de la ropa, seguido del lavado con detergentes, se requiere un secado a 80° C, así como el empleo de hipoclorito sódico, que reduce sustancialmente la contaminación, pero sólo si la materia orgánica presente no es excesivamente elevada (Scott y Bloomfield, 1990b).

En cuanto a las telas para limpiar, se contaminan altamente en pocas horas después de su primer uso y la contaminación se intercambia entre la tela y las superficies y viceversa. (Scott y Bloomfield, 1993). Para conseguir una disminución en la contaminación y romper este ciclo, se ha señalado que el enjuagado de trapos y esponjas de limpieza durante 5 minutos en lejía de cloro reduce más del 99.9% de los microorganismos (Ikawa y Rossen, 1999; Scott y Bloomfield, 1990b). No obstante, los restos de comida u otros restos de materia orgánica disminuyen la eficacia, ya que se neutraliza la acción desinfectante (Bessems, 1998). Al mismo tiempo será esencial seguir las especificaciones del fabricante para permitir la acción desinfectante y evitar riesgos relativos a la toxicidad de los productos (Bloomfield y scott, 1997; Kusumaningrum y col., 2002).

A la vez que el hipoclorito puede reducir el número de microorganismos, el secado de los trapos de limpieza reduce la carga microbiana de forma significativa, aunque no completa (Scott y Bloomfield, 1990b). En cualquier caso, si no hay otro sistema de descontaminación, los trapos y algunas esponjas se podrán descontaminar tras hervirse durante 5 minutos, para posteriormente ser secados (Ikawa y Rossen, 1999).

3. PROTOCOLOS

Los protocolos que han sido elaborados en diferentes estados miembros de la unión Europea incluyendo Alemania (Beck y col. , 1977), Holanda (Van Klingerén y Mossel 1978), Francia y Reino Unido son similares en diseño, determinando la concentración desinfectante que produce un efecto microbicida (reducción de 5 logaritmos en 5 minutos), pero difieren en detalles experimentales.

Hoy en día existen numerosas pruebas cuantitativas de suspensión para evaluarlos, Los más importantes han sido propuestos por:

- Asociación Americana de Químicos Oficiales Analíticos (AOAC)
- Sociedad Alemana de Higiene y Microbiología (DGHM)
- Asociación Francesa de Normalización (AFNOR)
- Prueba estándar europea de Van Klingerén (EST)
- Prueba *in vitro* de Reybrouck y Werner (IVT)

En la técnica de DGHM se inoculan los gérmenes control en medio líquido y el cultivo se emplea como suspensión. En cambio, en las demás técnicas, las siembras se realizan sobre medio sólido nutritivo.

Las técnicas más precisas e internacionalmente aceptadas son las que indican las normas AFNOR y EST (Collado, 1994), actualmente aceptadas por la ISO.

En 1978 el Consejo Europeo llevó a cabo una iniciativa para armonizar los métodos para evaluar la eficacia desinfectante de los productos a emplear en higiene alimentaria. Se realizó entonces una prueba de suspensión, en diez países europeos, basada en la 5-5-5 Holandesa (concentración 5%, tiempo de contacto 5 minutos y reducción de 5 logaritmos). De este estudio se concluyó que este protocolo podía ser adoptado como un estándar internacional (Van Klingeren y col., 1981). Este protocolo fue modificado y nuevamente publicado en 1987 como el Método de ensayo para la actividad antimicrobiana de desinfectantes en higiene alimentaria usualmente referido como la European Suspension Test (EST). En esta norma se ensayó, además, *Candida albicans* (ATCC 10231), como organismo de la prueba fungicida. En noviembre de 1989, el comité Europeo propuso también en las pruebas fungicidas agregar a *Aspergillus niger* (Bloomfield y Looney, 1992a).

Idealmente los desinfectantes deben tener el más amplio espectro posible de actividad en contra de todos los grupos microbianos (virus, bacterias, hongos y esporas), aunque, como se ha señalado, la eficacia biocida de los desinfectantes es normalmente evaluada mediante pruebas de suspensión (Holah y col. , 1990). Estas

pruebas son interesantes para una clasificación previa de la eficacia de diferentes productos, pero se requieren futuros trabajos para desarrollar protocolos satisfactorios en condiciones normales de uso (Scott y col., 1984).

Según Borneff y col., (1975) las pruebas de suspensión pueden ser realizadas según dos métodos diferentes, el primero para determinar la reducción de los microorganismos y el segundo para simular practicas de uso, (Beuchat., 2001b) y mediante tres procedimientos diferentes:

- Cuantitativa o prueba de capacitancia (Gibson y col., 1995)
- Pruebas como la de Rideal-Walker.
- Prueba de la AOAC o método de dilución.

En 1989 el Comité Europeo de Normalización CEN/TC 216 para armonizar los métodos Europeos para desinfectantes y antisépticos utilizados en higiene alimentaria, medicina, agricultura y practicas veterinarias, a través de tres grupos de trabajo: medico, veterinario y alimentos en campos institucionales, resolvió que el protocolo tuviera dos fases:

- Fase 1: pruebas de suspensión para determinar el estándar mínimo para la actividad bactericida, fungicida y esporicida.
- Fase 2: Para simular practicas de uso (Bloomfield y col. , 1994).

Si consideramos que existe una discrepancia entre la información que se posee de la eficacia desinfectante de los productos antibacterianos *in vitro* respecto a la realidad de su uso, la situación puede ser aún más discrepante en los productos considerados como fungicidas (Terleckyj y Axler, 1983).

Así, existe poca información sobre las propiedades fungicidas de los desinfectantes. La clasificación de los productos químicos como fungicidas, por la agencia protectora del medio ambiente (EPA), ha utilizado las normas de la AOAC para hongos (Terleckyj y Axler, 1983), considerando una reducción de 4 logaritmos de recuento para valorar el producto como efectivo en pruebas de suspensión.

En las normas para los ensayos de la actividad desinfectante es de gran importancia la repetibilidad y reproducibilidad del método, encontrando una variable en los resultados de acuerdo a los días de incubación del microorganismo de ensayo (Bloomfield y col. , 1991). Sin embargo, otros investigadores (Van Klingerén y col., 1981; Bloomfield y Looney., 1992a) indicaron que el manejo de los microorganismos tenía más significación que el número de replicas del ensayo. Por lo que son necesarias modificaciones de un método básico para recuperar un máximo de patógenos en varios tipos de productos sujetos a diferentes tratamientos de higienización o almacenamiento (Beuchat., 2001a).

Otro problema añadido es el tiempo de análisis, que se puede extender hasta en una semana, por lo complicado de la recuperación de las cepas y los tiempos de incubación, lo que encarece muy significativamente la evaluación de productos e impide la realización de pruebas a gran escala (Lambert y col., 1999). Para facilitar

la evaluación sería muy interesante, según estos mismos autores, el desarrollo de una metodología rápida, que permita un incremento en el número de los análisis sin perjudicar la calidad de los resultados.

Los diferentes países han establecido normativas con unos controles de eficacia, para determinar si los desinfectantes cumplen los requisitos básicos para comercializarse con garantía (Collado, 1994). Por este motivo un protocolo estándar puede ser adaptado para simular las condiciones de uso, aunque no sirve para validar un producto desde el punto de vista oficial (Beuchat y col., 2001 b).

En la directiva 98/48CE del Parlamento Europeo, relativa a la comercialización de biocidas, en su artículo 8 se enumeran los requisitos para la autorización y en el punto 3-iv señala que deben existir datos sobre la eficacia. Por ello, los desinfectantes deben pasar controles de valoración de su eficacia por los métodos oficiales establecidos (Anónimo, 1998c).

Es conveniente elaborar Protocolos Normalizados de Trabajo (PNT) para la limpieza y desinfección en la industria y en cada área de trabajo, revisándose periódicamente y nombrando un responsable de que éstos planes se cumplan rigurosamente(Gómez,1994).

4. MÉTODOS ELECTRICOS DE DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS TÉCNICAS IMPEDANCIOMÉTRICAS

Los métodos eléctricos para la detección de microorganismos son técnicas originalmente diseñadas para una rápida cuantificación (Duran y Marshall, 2002). Se basan en determinar el recuento durante la fase de multiplicación, donde las grandes moléculas, como los hidratos de carbono, se convierten en metabolitos más pequeños, con carga iónica, y cambian las propiedades eléctricas del medio (Edmiston y Russell, 1998). Estos metabolitos se producen durante el crecimiento microbiano, donde se incrementa la conductancia y se reduce la impedancia del medio de cultivo (Bundgaard-Nielsen y Nielsen, 1996; Edmiston y Russell, 1998).

Debido a que la medición de la impedancia depende de los cambios metabólicos, factores como el medio de cultivo, tiempo y la temperatura, son parámetros críticos en los ensayos (Glassmoyer y Russell., 2001). Cuando la población alcanza los niveles de 10^5 a 10^7 ufc/ml, se puede observar un cambio significativo en la señal de la impedancia, conductancia, o capacitancia del medio (Edmiston y Russell, 1998).

El tiempo que se requiere para lograr este cambio exponencial es conocido como Tiempo de Detección (DT) y es una función del recuento (ufc/ml) en las muestras (Edmiston y Russell, 1998). Así que el cambio eléctrico puede ser correlacionado, de forma indirectamente proporcional, con él numero de microorganismos (Firstenberg-Eden, 1983).

La impedanciometría microbiológica es considerada como el mejor método para el recuento de microorganismos en la industria alimentaria (Mosteller y Bishop, 1993). Empleados para obtener un recuento rápido de los microorganismos en los alimentos (Duran y Marshall, 2002), ha demostrado ser más eficiente en tiempo y consumo de tiempo de trabajo que los protocolos tradicionales de análisis (Edmiston y Russell, 2000).

Además, otros usos potenciales de las medidas eléctricas incluyen la determinación de la rotura de la cadena del frío sobre los productos alimenticios (Russell y col., 1992), la estimación potencial de vida útil o caducidad de los mismos (Bishop y White, 1985) y la estimación de su frescura.

De cualquier manera, la gran ventaja de utilizar métodos rápidos, comparado con los tradicionales, es el obtener el resultado en horas y no en días, lo que permite evaluar productos con capacidad para estimular o disminuir la capacidad de crecimiento de los microorganismos, lo que permite incrementar la capacidad de análisis y reacción con poco esfuerzo en tiempo y dinero (Russell, 2000).

Es por ello que las técnicas impedanciométricas nos permiten la evaluación rápida de los diferentes productos desinfectantes y sus agentes activos (Cordier y col., 1989). Además, son alternativas simples y rápidas (6 minutos) para determinar la concentración de una solución desinfectante con un alto nivel de certeza ($P < 0,0002$) (Holan y col., 1990), ahorrando tiempo cuando se requiere el análisis de múltiples muestras (Dhaliwal y col., 1992). Diversos han sido los equipos que se han ido comercializando, destacando Malthus, Bactometer o Rabbit (Gibson y col.,

1995). En cualquier caso, en nuestro país, los datos indican una extraordinaria predominancia de Bactometer.

La ventaja de las técnicas impedanciométricas es que no importa que los microorganismos estén en suspensión o adheridos a la superficie. Mientras estén vivos pueden cambiar las propiedades eléctricas del medio de incubación. Esto hace a la técnica particularmente adecuada a pruebas de desinfectantes en superficie, ya que no es necesario separar los organismos de la superficie de prueba para su cuantificación, esto deja el biofilm, o adherencia superficial, en el mismo estado morfológico y no los enfrenta a un estrés por separación, por lo que no influirá negativamente en la eficacia del desinfectante, más bien todo lo contrario (Gibson y col. , 1995).

5. HONGOS

Cada vez más se están desarrollando formulaciones químicas con actividad desinfectante para ser utilizadas en el hogar. La mayoría de los productos desarrollados tienen como objetivo el actuar como bactericidas. Sin embargo, poco se estudia respecto a su posible actividad fúngica (tanto destrucción de mohos como levaduras). Hay que destacar que en este grupo nos encontramos a microorganismos patógenos, como *Candida albicans*, *Aspergillus niger* y otros alterantes, que pueden crecer en superficies como paredes, suelos y lugares de difícil acceso.

De entre los diferentes hongos, *Candida albicans* ha sido siempre el de elección para la determinación de la eficacia fungicida *in vitro*, ya que diferentes estudios señalaron que es una de las especies más resistentes a la desinfección química (van de Voorde y col., 1984), apreciándose una susceptibilidad similar, independientemente de la cepa evaluada (Waltimo y col., 1999).

En consecuencia, se han evaluado muchos productos químicos con *Candida albicans* asumiendo que los resultados puedan aplicarse a todos los hongos (Terleckyj y Axler, 1983).

Los microorganismos del grupo coliforme, los mohos y las levaduras, constituyen aproximadamente, del total de la microflora aeróbica, entre el 3 y el 20% (Sheldon y Brake, 1991). Además, los hongos son considerados la mayor causa de

deterioro de alimentos en el mundo, aunque en países tropicales, el deterioro puede llegar hasta el 25% o más en la distribución de alimentos (Simpanya y col., 2000), especialmente en el caso de los productos de panadería y quesos (Bundgaard-Nielsen y Nielsen, 1996).

Las vías de llegada de estos hongos a los alimentos están muy relacionadas con el medio ambiente, pero son especialmente importantes las superficies, así como los tejidos de la ropa y materiales en contacto con los alimentos, especialmente si se mantienen húmedas (Ossowski y Duchmann, 1997). Según estos mismos autores, si el hongo implicado es *Candida albicans*, es posible que se desencadene un cuadro de infección, especialmente en las mujeres, ya que este microorganismo es responsable de dermatitis que llegan a cronificar con facilidad.

Otra vía de contaminación es la que se produce por una contaminación cruzada con otros alimentos. Por ejemplo la microbiota nativa de aves procesadas esta compuesta de muchos tipos de bacterias y mohos. Algunos de estos microorganismos son parte de la microbiota de las aves vivas y son vehiculados durante el proceso en la piel y el tracto digestivo. (McMeekin y Thomas., 1979). En estos productos, las levaduras constituyen una parte significativa de la microbiota, incrementándose gradualmente durante la fase de almacenamiento refrigerado (Ismail y col., 2000). Según estos mismos autores, debido a la actividad proteolítica y lipolítica de las levaduras asociadas a las aves, estos microorganismos pueden jugar un importante papel en el deterioro de los productos aviares en refrigeración. Así, la actividad metabólica de las levaduras psicotrofas, creciendo en carne refrigerada,

disminuye el tiempo de vida comercial al producir substratos que aumentan el crecimiento bacteriano.

En estos productos, numerosos géneros de levaduras han sido aislados de las canales. *Candida sp.* es generalmente el grupo dominante de levaduras de las canales almacenadas de 7 a 14 días. Ninguna de las levaduras aisladas de las canales aviares ha sido implicada como fuente de enfermedad causada por alimentos; aunque pueden ser de importancia para prolongar su vida útil (Hinton y col., 2002).

Respecto a los mohos, Las condiciones del medio deben de ser favorables para que las esporas germinen, se desarrollen y reproduzcan. Humedad y temperatura son dos factores que tiene un efecto crucial en el crecimiento de mohos, y en este sentido, sí que existe un riesgo real para la salud del consumidor, por la posible formación de micotoxinas (Bullerman y col., 1984).

La contaminación microbiana de alimentos y bebidas deteriora los productos, por lo que el consumidor los rechaza y el productor obtiene pérdidas económicas importantes. Las levaduras xerotolerantes son contaminantes frecuentes en un amplio grupo de productos llamados “intermediate moisture foods” (IMF), alimentos de humedad intermedia que se caracterizan por su bajo contenido en agua (baja A_w) (0.6 a 0.85). La detección exacta y rápida de la contaminación con levaduras en tales productos es importante para garantizar productos de alta calidad (de Silóniz y col., 2000).

En cuanto a la patogenia, las levaduras del género *Candida* frecuentemente son los agentes causales de infecciones corporales debidas a factores como la humedad. Bazán-Mora y col. (2001) observaron que de 325 aislamientos de levaduras de las manos de 1,059 manipuladores de alimentos, *Candida albicans* representó el 12.4% y el restante 85.8% correspondió a *Candida no albicans*.

También *Candida albicans* esta implicada en muchas infecciones relacionadas con biomaterial. Típicamente estas infecciones están asociadas con la formación de biofilms, y los microorganismos que forman un biofilms se han mostrado diferentes de los que se encuentran libres en suspensión y notoriamente más resistentes a los agentes antimicrobianos (Ramage y col., 2001).

Por este motivo, es probable que muchos desinfectantes comerciales, clasificados como funguicidas, pueden no ser efectivos contra hongos de piel y uñas aislados durante diferentes periodos (Terleckyj y Axler, 1993).

Consecuentemente, los mohos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, causan deterioro en alimentos y granos y pueden afectar en la salud de humanos y animales. Los mohos filamentosos comúnmente encontrados en los granos de cereal almacenados son *Aspergillus* y *Penicillium*, siendo *Aspergillus* el más conocido y frecuentemente reconocido.

Los métodos tradicionales de identificación de *Penicillium* y *Aspergillus* se basan primariamente en las características de la colonia y micromorfología. De

cualquier forma el gran número de especies dentro de los géneros hace difícil la identificación, por lo que se tiene que recurrir a otros métodos (Li. y col., 2000).

La identificación de levaduras y mohos tradicionalmente han sido uno de los métodos de análisis en el laboratorio que requieren más tiempo (Spangenberg y Ingham, 2000).

Aunque los hongos constituyen un grupo grande y diverso, Prácticamente hay tres grupos importantes:

- Hongos filamentosos
- Levaduras
- Setas

Los hábitats de los hongos son bastante diversos. Algunos son acuáticos (agua dulce y/o marina), aunque la mayoría son de ambientes terrestres, del suelo o de plantas. Los hongos contienen paredes celulares rígidas, ciertos hongos poseen celulosa en sus paredes celulares, pero en la mayoría no está presente. La quitina es un constituyente común; otros polisacáridos como los mánanos, galactanos y quitosán reemplazan a la quitina en algunos grupos de hongos. Las paredes celulares constan de 80-90% de carbohidratos, siendo las proteínas, lípidos, polifosfatos e iones inorgánicos el material cementante (Madigan y col. , 1999).

5.1. HONGOS FILAMENTOSOS.

Los mohos son hongos filamentosos. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Cada filamento o hifa (septadas, en *Aspergillus niger*) crece fundamentalmente en el ápice, por extensión de la célula terminal. Cada hifa aislada crece formando bolas compactas que colectivamente se conocen como micelio, que a su vez da lugar a esporas asexuales (*Aspergillus niger*) llamadas conidios. Éstas a menudo están fuertemente pigmentadas (negro, en *Aspergillus niger*) y son muy resistentes a la desecación, siendo su misión la de dispersar el hongo a nuevos hábitats. Se consideran contaminantes habituales de los laboratorios, alimentos, así como responsables de muchas alergias.

Durante la elaboración de alimentos para mascotas, estos pueden estar contaminados con esporas de mohos, especialmente por *Aspergillus* (62%) y dentro de este género por *Aspergillus flavus*, seguido de *Aspergillus niger* y de *Aspergillus terreus* (Bueno y col., 2001).

Abarca y col. (1994) estudiaron la mezcla de alimentos para ganado (cerdos, conejos y aves) encontrando la predominancia de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium*. Aunque durante el proceso de peletización se reduce la contaminación, porque las esporas son relativamente susceptibles al calentamiento. De cualquier forma, no se eliminan todas las esporas viables, por lo que no puede ser considerado como un proceso esterilizante.

5.1.1. *Aspergillus*

La especie patógena más predominante de *Aspergillus* es *A. fumigatus*. Otras especies potencialmente patógenas son *A. flavus*, *A. nidulans* y *A. niger*. Algunos autores creen que las diferencias existentes entre estas especies son insignificantes y que todas ellas deberían denominarse *A. fumigatus*. Las especies de *Aspergillus* son muy abundantes en la naturaleza y son contaminantes frecuentes del laboratorio (Carter, 1994).

Ocurrencia en el hombre: La aspergilosis ocurre de forma esporádica y es poco común. Su incidencia, como la de otras micosis oportunista, que atacan a pacientes debilitados por otras enfermedades o tratados por mucho tiempo con antibióticos, antimetabolitos o corticosteroides es muy frecuente, especialmente en casos avanzados de cáncer.

Se distinguen dos formas clínicas de la enfermedad: la localizada y la invasora. La aspergilosis es primordialmente una infección del aparato respiratorio. El hongo puede causar una bronconeumonía, con la sintomatología común a este síndrome. Aún no se conoce bien el período de incubación, pero se estima en varias semanas. En la forma invasora, que suele ser grave, la infección puede diseminarse y afectar cualquier órgano; con frecuencia se localiza en tiroides, cerebro y miocardio. Tampoco es rara la colonización por el hongo de los senos nasales y de las órbitas oculares. Otra forma es la de la bola fungosa o aspergiloma, que consiste en la colonización por el hongo de cavidades en el aparato respiratorio, causada por otras enfermedades preexistentes (bronquitis, bronquiectasia, tuberculosis). Esta

forma es relativamente benigna, pero en ocasiones ocurre hemoptisis. La aspergilosis alérgica se debe a la hipersensibilidad a conidios inhalados del hongo y no es una infección propiamente dicha. La otomicosis es causada a menudo por *A. niger*.

Fuente de infección y modo de transmisión: El reservorio es el suelo. El elemento infectante son los conidios (exoesporas) del hongo, que se transmiten al hombre y a los animales por vía aerógena (Ainsworth y Austwick., 1973).

Aspergillus fue descrito hace 300 años, y siempre ha sido reconocido como un género importante y extenso que tiene 100 o más especies reconocidas, la taxonomía más universalmente utilizada es la de Raper y Fennell (ICMSF, 1996).

5.2. Levaduras

Son hongos unicelulares y la mayoría son ascomicetos. Normalmente son células ovales o cilíndricas y la división es por gemación, se origina una pequeña yema que aumenta de tamaño gradualmente y se separa de la célula madre. Las levaduras normalmente no desarrollan un micelio, sino que permanecen en estado unicelular durante todo el ciclo de crecimiento. Sin embargo, algunas pueden filamentosas. Así por ejemplo, la levadura *Candida albicans*, es una levadura potencialmente patógena que causa infecciones, necesita estar en su forma filamentosa o pseudomicelial para ser verdaderamente patógena. Incluso la levadura de panadería *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de formar pseudomicelio bajo ciertas condiciones (Madigan y col. , 1999).

El oportunista hongo patógeno *Candida albicans* puede crecer como una célula levaduriforme oval o como una pseudohifa elongada, dependiendo de las condiciones nutricionales o del medio. (Aoki y col., 1998).

Muchos estudios se han enfocado en el dimorfismo de *Candida albicans* por conversión morfológica no solo interesante por su diferenciación celular sino por su patogénesis (Odds, 1988, 1993).

Algunos microbiólogos emplean el término patógeno potencial para designar a microorganismos que generalmente no son infecciosos en su hábitat normal, pero que pueden producir enfermedades cuando alcanzan otras localizaciones o tejidos como *Candida* y *Aspergillus* (Carter, 1994).

5.2.1. *Candida albicans*

Es responsable de una enfermedad conocida como Candidiasis (Moniliasis, Muget). La principal especie desde el punto de vista clínico es *Candida albicans*, existente normalmente en el tracto digestivo, en la cavidad oral y en la vagina, siendo la distribución mundial (Carter, 1994).

En 1842, F.T. Berg y Gruby, anunciaron que el muget era causado por una levadura (*Candida albicans*). Esta levadura forma parte de la flora normal del aparato digestivo del hombre y los animales, de sus mucosas y en menor grado de la piel; se la encuentra también en el suelo, en plantas y en frutas. En su hábitat

normal las cándidas son levadiformes con brotes, pero en los tejidos infectados pueden producir hifas y pseudohifas.

Es la micosis oportunista más frecuente. La candidiasis es una enfermedad esporádica. Se estima que la enfermedad es responsable de casi la cuarta parte de las defunciones micóticas. Se encuentra como comensal en el tracto digestivo de un alto porcentaje de personas sanas. Una de las formas clínicas más comunes de la enfermedad es la estomatitis micóticas o muget, que se caracteriza por placas blancas ligeramente adheridas a la mucosa bucal, aunque se puede encontrar también en la faringe y el esófago. La moniliasis bucal es más frecuente en lactantes que en adultos. La dermatitis de los pañales y las quelitis (boqueras) son causadas frecuentemente por *Candida albicans*. En el adulto, la candidiasis casi siempre se asocia a enfermedades o condiciones debilitantes, tales como diabetes, tuberculosis, sífilis, cáncer, obesidad y otras. El agente es responsable muchas veces de intertrigo de los grandes pliegues, muget vulvovaginal y onixis con perionixis (especialmente en mujeres adultas cuyo trabajo exige la inmersión frecuente de las manos en el agua).

Si bien la candidiasis suele limitarse a las mucocutáneas, la infección sistémica puede ocurrir por diseminación sanguínea, sobre todo en pacientes muy debilitados y sometidos durante un tiempo prolongado a antibióticos. Estos casos se presentan muchas veces por lesiones ocasionadas por exploración médica con catéteres, inserción de estos instrumentos en la uretra, o por intervenciones quirúrgicas. La localización puede ser en estos casos en cualquier órgano, y con mayor frecuencia en ojos, riñones y huesos.

En el hombre la candidiasis casi siempre está asociada con otras enfermedades. El tratamiento prolongado con antibióticos, agentes citotóxicos y corticosteroides es un factor predisponente. La alimentación rica en hidratos de carbono puede ser otro elemento que facilita la colonización del agente. La mayor parte de las infecciones tiene una fuente endógena. La infección puede transmitirse por contacto con las secreciones de la boca, piel, vagina y heces de enfermos o portadores. La madre con muget vaginal puede infectar al niño durante el parto. (Ainsworth, 1973).

En los animales son especialmente sensibles los jóvenes. En cachorros de perro, gatitos, terneros y potros, se producen una estomatitis y una enteritis de origen micótico y se observan placas de color blanco a grisáceo como consecuencia de inflamación pseudomembranosa de la mucosa.

En adultos, las formas patogénicas dependen de la especie. En cerdos se presentan infecciones en la porción terminal del esófago y en la zona esofágica del estómago. En las úlceras estomacales puede hallarse *C. candidum*. Sin embargo, en vacas es corriente la mastitis producida por *Candida albicans*, así como la aparición de metritis y/o vaginitis, al igual que en las yeguas. En los machos, especialmente en los caballos y toros sementales, la forma clínica más frecuentemente observada es la candidiasis genital (Carter, 1994).

En gallina, pavo y otras aves. Puede haber infección bucal, del esófago y del buche con zonas blanquecinas pseudomembranosas, generalmente en las aves

jóvenes. La micosis del buche (muguet) puede afectar a gran número de pollos y pavos jóvenes.

En cuanto a su vehículo desde el medio ambiente, las aguas residuales contienen numerosos hongos, sobre todo las ricas en principios orgánicos. Así, en las ciudades abundan las levaduras y los hongos levaduriformes. En las del Kiel, por ejemplo, se han contado entre 4.000 y 200.000 células de levadura por litro. Las más frecuentes aquí fueron los del género *Saccharomyces* y, en menor número, las había también de los géneros *Candida*, y otros. En las aguas residuales de ciertas industrias de bebidas y productos alimenticios es frecuente encontrar cifras muy altas de levaduras. Las aguas de desecho domésticas contienen también, por regla general, muchas esporas e hifas de hongos (Marahaba y Washington., 1998).

II.OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar la eficacia funguicida de los productos comerciales de uso domestico, aplicando las normas internacionales de evaluación UNE EN-1275 y 1650, para concretar que productos y en que condiciones poseen una mayor eficacia desinfectante real.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Desarrollar una técnica rápida de evaluación de estos mismos productos comerciales, a fin de simplificar los protocolos normalizados, y que nos permita discriminar entre eficacias desinfectantes.

2.2.2. Desarrollar sistemas que simulen situaciones reales de uso, para conocer la eficacia real, simulando las superficies más frecuentes a escala de laboratorio.

2.2.3. Verificar su eficacia, una vez adaptada la metodología, ensayar y compara la eficacia de los diferentes desinfectantes en condiciones reales de uso.

2.2.4. Analizar los efectos de las condiciones ambientales en la viabilidad de las cepas fúngicas en varias superficies.

III. Material y Método

3.1. Valoración de la actividad fungicida. Aplicación de las Normas UNE

La valoración de la actividad fungicida de los desinfectantes químicos se realizó utilizando como base metodológica las siguientes normas:

- a) La norma española UNE-EN 1275 antisépticos y desinfectantes químicos, actividad fúngica básica. Método de ensayo y requisitos (fase 1) (Anónimo, 1996).
- b) La norma UNE-EN 1650 antisépticos y desinfectantes químicos, Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad fungicida de los antisépticos y desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios, en la industria, en el hogar y en la colectividad. Método de ensayo y requisitos (fase 2, etapa 1) (Anónimo, 1998b).

La principal diferencia entre ambas normas hacen referencia a la preparación de los desinfectantes y la utilización de sustancias interferentes. Así, mientras que en la norma UNE 1275 los desinfectantes son preparados en agua destilada estéril, en la norma UNE 1650 se prepara en agua dura estéril. Igualmente, en la EN 1650 el análisis se puede realizar utilizando diferentes sustancias interferentes, aunque el producto recomendado es albúmina bovina a diferentes concentraciones, 0,3 g/l simulando lo que se denomina condiciones limpias y 3 g/l simulando condiciones sucias.

En dichas normas son fundamentales los siguientes aspectos:

3.1.1. Las cepas fúngicas de referencia

3.1.2. La preparación del inóculo de ensayo para la valoración de la actividad fúngica y para la validación del ensayo.

3.2. Preparación de reactivos y soluciones desinfectantes.

3.3. La valoración de la actividad fungicida de los desinfectantes químicos a diferentes tiempos, concentraciones y con presencia o no de sustancias interferentes

3.4 La validación del ensayo que incluye la valoración de la toxicidad del neutralizador, la valoración de la efectividad del neutralizador utilizado y en la UNE-EN1650, adicionalmente, la validación de las condiciones experimentales especialmente en lo que hace referencia a posible toxicidad del agua dura

3.1.1. Cepas fúngicas

En las Normas UNE 1275 y 1650, las cepas de referencia recomendadas para la valoración de la eficacia fungicida son *Candida albicans* ATCC 10231 y *Aspergillus niger* ATCC 16404 de la American Type Culture Collections (ATCC). Las cepas utilizadas en este estudio, equivalentes a las anteriormente referenciadas, se obtuvieron en forma de viales liofilizados de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Dichas cepas fueron *Candida albicans* CECT 1394 y *Aspergillus niger* CECT 2574 (Belloch y col., 1998)

La recuperación de las cepas de *Candida albicans* se realizó inicialmente en caldo Sabouraud (Difco, Detroit, Michigan) y se incubó durante 3 horas. Transcurrido este tiempo se sembró en tubos de agar sabouraud dextrosa inclinado y se dejó incubar a 30°C durante 48 horas. Respecto a *Aspergillus niger* la recuperación se realizó igualmente en caldo Sabouraud, incubándose a 30°C durante 24 horas. Posteriormente se realizó la siembra en frascos Roux con medio de cultivo agar sabouraud dextrosa (Difco, Detroit, Michigan), y se dejó incubar a 30°C durante 7-9 días. Ambas cepas, se conservaron liofilizadas para su posterior utilización.

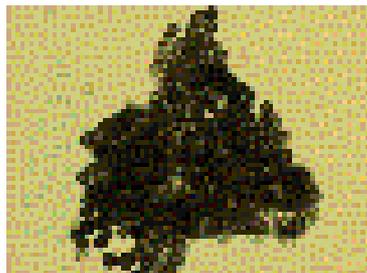
3.1.2. Preparación del inóculo de ensayo

La preparación del inóculo de ensayo difiere en función de la cepa utilizada. Así la preparación de *Candida albicans* se efectuó a partir de un tercer subcultivo en medio Sabouraud. Del cultivo se transfirieron asas de células a un frasco con 5 g de perlas de vidrio de 3 milímetros de diámetro y 10 ml de solución diluyente (0,1% triptona, 0,85% NaCl). Las células se suspendieron en el diluyente, sumergiendo el asa en el diluyente y frotándola contra la pared lateral del frasco. Posteriormente, se agitó durante 3 minutos, siendo ésta la suspensión madre a partir del cual se hicieron las diluciones oportunas para la preparación del inóculo tanto para el ensayo de la valoración fungicida como para la validación del ensayo.

Respecto a la preparación de la suspensión de esporas de *A. niger*, el inóculo inicial se realizó a partir del cultivo anteriormente mencionado (cultivo en extracto de malta, incubado a 30°C 7-9 días). En el frasco de Roux se

suspendieron las células en 10 ml de una solución de polisorbato 80 al 0,05%. Con una espátula de vidrio se desprendieron las conidiosporas de la superficie de cultivo, transfiriendo la suspensión a un frasco con 5 g de perlas de vidrio de 3 milímetros de diámetro. Posteriormente y suavemente se agitó durante un minuto. Dicha suspensión se filtra dos veces a través de dos filtros sinterizados, para inmediatamente después realizar su examen microscópico en al menos diez campos de visión a 400 aumentos, para mostrar la ausencia de fragmentos miceliares y de esporas germinativas (Figura 1)

Fotografía 1. Esporas de *Aspergillus niger* donde se observa la ausencia de fragmentos miceliares y esporas germinativas.



Es requisito fundamental en las normas UNE que la validación de la actividad fungicida se realice a partir de un inóculo inicial determinado, concretamente de $1,5 \times 10^7$ - 5×10^7 UFC/ml. Y en la validación del ensayo entre 6×10^2 - $1,5 \times 10^3$ UFC/ml. Es importante, pues, que dicho inóculo se ajuste precisamente a la concentración necesaria para lo cual pueden utilizarse diversos métodos (espectrofotometría, valoración comparativa con diversas escalas de turbidez). En nuestro estudio la valoración se realizó utilizando técnicas espectrofotométricas para lo cual fue necesario ajustar la concentración fúngica requerida a una absorbancia determinada, es decir

realizar la calibración de la concentración de microorganismos en función de la absorbancia.

3.1.3. Calibración

Inicialmente, se determinó la longitud de máxima absorción de las suspensiones de *C. albicans* y *A. niger*. Así, la longitud de onda óptima para determinar la absorbancia en las suspensiones de *C. albicans* fue a 350 nm, mientras que para *A. niger* fue a 442 nm.

Posteriormente, se realizó a partir de la solución madre de ambas especies fúngicas distintas diluciones decimales para obtener la curva de calibración entre la absorbancia determinada y el recuento en placa obtenido. Se debe constatar que a partir de la cuarta dilución la absorbancia permanecía constante por lo que sólo se realizó la medición hasta esa dilución.

3.2. Preparación de reactivos y de los productos desinfectantes

3.2.1. Neutralizador

En los ensayos realizados según la norma UNE 1275, se utilizó el neutralizador con la composición siguiente: 15 g de polisorbato 80 (Panreac Química, España), 1,5 g tiosulfato sódico (Panreac Química, España) y 0,3 g de saponina (Sigma, St. Louis, MO., USA) diluido en 100 ml de agua de peptona al 1,5% (Biokar diagnostic, Beauvais, Francia).

En los ensayos realizados aplicando la norma UNE 1650 en condiciones sucias se modificó el neutralizador utilizado cuya composición era la siguiente: 0,6 g de lecitina de soja (Lucas Meyer, Alemania.), 6 g de polisorbato 80, 1 g de tiosulfato de sodio, 0,3 g de L-histidina (Sigma, St. Louis, MO, USA) y 6 g de saponina diluido en 100 ml de agua de peptona al 1,5%.

3.2.2. Agua dura

El agua dura se utilizará para la dilución de productos en la validación de la actividad fúngica aplicando la Norma UNE 1650, que se preparó de la forma siguiente:

- Solución A: 19,84 g de $MgCl_2$ anhidro (Sigma, St. Louis, MO) y 46,24 g de $CaCl_2$ anhidro (Sigma, St. Louis, MO) en agua destilada y se diluyó hasta 1000 ml
- Solución B: 35,02 g de $NaHCO_3$ (Sigma, St. Louis, MO) en agua destilada y se diluyó hasta 1000 ml

Se añadió en un matraz aforado de 1000 ml, 600 ml de agua destilada, 6 ml de solución A y 8 ml de solución B. Posteriormente, se enrasó hasta 1000 ml con agua destilada. Se ajustó el pH a 7 y se esterilizó por filtración a través de una membrana de nitrocelulosa con diámetro de poro de 0,22 μm (Millipore Corporation, Bedford, MA.).

3.2.3. Albúmina

La preparación de la sustancia interferente para la evaluación de la actividad fungicida en condiciones sucias (3 g de albúmina/l) se preparó disolviendo 3 g de

albúmina bovina (fracción de Cohn V para el medio Dubos, Sigma, St. Louis, MO) en 100 ml de agua. Posteriormente se esterilizó por filtración a través de una membrana de nitrocelulosa con diámetro de poro de 0,22 μm

3.2.4. Productos desinfectantes

Se evaluó aplicando las normas UNE-EN 1275 y 1650 la eficacia fungicida de diferentes productos desinfectantes domésticos comerciales con distintos principios activos y con distintas finalidades, como lavavajillas, limpiadores generales, limpiadores específicos para el baño y detergentes-desinfectantes de ropa. Los productos evaluados representan las diferentes familias de productos desinfectantes, en función del principio activo, que existen en Europa. Se estudió la eficacia desinfectante de 20 productos químicos desinfectantes comerciales, sin embargo, sólo se evaluó la norma UNE-EN 1275 en seis de ellos (productos desinfectantes del 1 al 6). No fue posible conocer su fórmula exacta, puesto que los fabricantes sólo están obligados a facilitarla al servicio nacional de toxicología. Los productos desinfectantes comerciales testados en base a su principio activo, concentración del producto desinfectante utilizado y tiempo de contacto se muestran en las siguientes tablas 7 y 8, diferenciando por cepa fúngica analizada y norma UNE-EN aplicada. Las soluciones de desinfectantes a las distintas concentraciones se prepararon en la validación por la norma UNE 1275 con agua destilada estéril y los preparados según norma UNE 1650 con agua dura estéril. La temperatura del ensayo fue de 20°C a excepción del producto desinfectante con perborato en su composición (producto desinfectante 19) analizado según la norma UNE 1650 bajo condiciones sucias, que se determinó también a 40°C.

Tabla 7. Productos desinfectantes analizados aplicando la Norma UNE EN 1275.

Producto desinfectante	U S o	Principio activo	<i>C. albicans</i>		<i>A. niger</i>	
			Concentración (%)	Tiempo (minutos)	Concentración (%)	Tiempo (minutos)
1	L V	Alcohol	12.5, 20, 25,	5 y 60	20, 40 y 80	60
		geraniol-nerol	30, 40, 50 y 80			
2	L V	Ácido benzoico y	12,5, 20, 25,	5, 15 y	20, 40 y 80	60
		etanol	40, 80	60		
3	L H	Cloruro de	1,20, 30, y 40	5	2.5, 5, 10, 20,	5
		benzalconio, ácido cítrico y etanol			40,50,60 y 80	
4	L H	Peróxido de	1,25, 2,5, 5,	5	2.5, 5, 10, 20,	5 y 60
		hidrógeno y Timol	10, 20 y 40		40, 50, 60 y 80	
5	L H	Glutaraldehído	10, 15, 20, 40,	5	50, 60, y 80	5 y 60
			50, 60 y 80			

6	L	Hipoclorito sódico	0.1, 0.4, 0.5, 1 y 2	5	1.25, 2.5, y 5	5
	H				5, 50, 60, y 80	15

LV: Productos desinfectantes lavavajillas.

LH: Productos desinfectantes limpiadores del hogar.

Tabla 8a .- Productos desinfectantes analizados aplicando la Norma UNE EN 1650

Producto desinfectante	Uso	Principio activo	<i>C. albicans</i>		<i>A. niger</i>	
			Concentración (%)	Tiempo (minutos)	Concentración (%)	Tiempo (minutos)
1	LV	Alcoholes: Geraniol-nerol	5, 20, 40 y 80	15	5, 40 y 80	15
			20, 50, 60, 70 y 80	60		
2	LV	Ácido benzoico y etanol	5, 40 y 80	15	5, 40 y 80	15
			20, 40 y 80	60		
3	LH	Cloruro de benzalconio, ácido cítrico y etanol	10, 20, 40 y 80	5	5, 40 y 80	15
			5, 40, 50, 60 y 80	15		
			20 y 80	60	50, 60 y 80	60
4	LH	Peróxido de hidrogeno y timol	40, 50, 60 y 80	15	5, 40 y 80	15
					50, 60 y 80	60
5	LH	Glutaraldehído	80	5	50, 40, 60 y 80	15
			5, 10, 20, 40 y 80	15		
			20 y 80	60		
6	LH	Hipoclorito sódico	1, 2 y 5	5	1, 2 y 5	5
			1, 2, 5, 10, 20, 40 y 80	15	1, 2, 5, 40 y 80	15
7	LV	Tensioactivos y conservantes	20 y 80	15 y 60	20 y 80	15 y 60
8	LV	Ácido benzoico	20 y 80	15 y 60	20 y 80	15 y 60
9	LV		20 y 80	15 y 60	20 y 80	15 y 60

10	LH	Cloruro de benzalco- nio	20 y 80	15 y 60	20 y 80	15 y 60
11	LH	Conservan- tes	20 y 80	15 y 60	20 y 80	15 y 60

LV: Productos desinfectantes lavavajillas.

LH: Productos desinfectantes limpiadores del hogar

Tabla 8b .- Productos desinfectantes analizados aplicando la Norma UNE EN 1650

Producto desinfectante	Uso	Principio activo	<i>C. albicans</i>		<i>A. niger</i>	
			Concentración (%)	Tiempo (minutos)	Concentración (%)	Tiempo (minutos)
12	LB	2-n-butoxiopropanol	20 y 80	15 y 60	20 y 80	15 y 60
13	LB	Ácido fórmico, ácido cítrico, ácido salicílico, etanol e isopropanol	20 y 80	15 y 60	20 y 80	15 y 60
14	LB	Ácido cítrico, fórmico y etanol	20 y 80	15 y 60	20 y 80	15 y 60
15	LB	Ácido cítrico y etanol	20 y 80	15 y 60	20 y 80	15 y 60
16	LB	Ácido cítrico más etanol	20 y 80	15 y 60	20 y 80	15 y 60
17	LB	Ácido cítrico y alcohol-eter	20 y 80	15 y 60	20 y 80	15 y 60
18	LB	Tensioactivos	20 y 80	15 y 60	20 y 80	15 y 60
19	LR	Peróxido de hidrógeno y etanol	20 y 80	15 y 60	20 y 80	15 y 60
20	LR	Perborato	20 y 80	15 y 60	20 y 80	15 y 60

LB: Productos desinfectantes para el baño.

LR: Productos desinfectantes para ropa

3.3. valoración de la actividad fungicida

Los productos evaluados, independientemente del protocolo utilizado, fueron analizados a 20°C, a excepción del producto número 20 que además se realizó a 40°C. Así, previamente a la realización del ensayo es necesario que los reactivos (neutralizador a someter al ensayo, diferentes productos desinfectantes, diluyente, suspensión fungica, albúmina y agua dura), alcancen el equilibrio térmico a la temperatura del ensayo, utilizando para ello un baño de agua termostático. La actividad fungicida se define como la capacidad de un producto a producir una reducción de al menos 10^4 en el número de células vegetativas de la levadura *C. albicans* y en el número de esporas del moho *A. niger*.

Para cada organismo del ensayo y concentración de la solución de ensayo del producto, se calculó la reducción de la viabilidad de la siguiente forma:

$$R = \frac{N \times 10^{-2}}{N_a}$$

Siendo,

N = suspensión fúngica inicial de *C. albicans* o *A. niger* (1,5 a 5×10^7 UFC/ml)

N_a = Recuento en placa tras la valoración de la actividad fungicida.

3.3.1. Norma UNE-EN 1275

A 8 ml de la solución de desinfectante a la concentración de ensayo se le adicionó 1 ml de agua destilada estéril y 1 ml de la suspensión fúngica de *C. albicans* o *A. niger* ($N=1,5$ a 5×10^7 UFC/ml). Se mezcló y se colocó el tubo de ensayo en el baño de agua a $20^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$. La actividad del producto se determinó a los 5, 15 o 60 minutos (ver Tabla 7). Antes de finalizar el tiempo de contacto seleccionado se mezcló y se neutralizó la reacción, añadiendo 1 ml de la mezcla del ensayo a 8 ml de neutralizador con 1 ml de agua destilada estéril. A los 5 minutos se sembró por duplicado 1 ml de la mezcla neutralizada en sendas placas de Petri a las que se añadió agar Sabouraud-dextrosa a 45°C . Las placas se incubaron a 30°C . El tiempo de incubación en el caso de *C. albicans* fue de 24 horas en una primera lectura y de confirmación a las 48 horas. Para *A. niger* la primera lectura se realizó a las 48 horas, aunque se deben realizar lecturas de confirmación hasta las 96 horas. El recuento de viables, se determinó únicamente en las placas que contenían menos de 150 UFC/placa.

3.3.2. Norma UNE-EN 1650 (condiciones sucias)

A 1 ml de albúmina (3 g/l) se le añadió 1 ml de una de la suspensión fúngica de *C. albicans* o *A. niger* ($N=1,5$ a 5×10^7 UFC/ml), se mezcló y se colocó el tubo de ensayo en el baño de agua a $20^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$ durante 2 minutos ± 10 s. Al cabo de este tiempo, se añadió 8 ml de la solución de desinfectante a la concentración de ensayo. La actividad del producto se determinó a los 5, 15 o 60 minutos (ver Tabla 8a y 8b). Antes de finalizar el tiempo de contacto seleccionado se mezcló y, se neutralizó la reacción, añadiendo 1 ml de la mezcla del ensayo a 8 ml de neutralizador con 1 ml

de agua destilada estéril. A los 5 minutos se sembró por duplicado 1 ml de la mezcla neutralizada en sendas placas de Petri a las que se añadió agar Sabouraud-dextrosa a 45°C. Las placas se incubaron a 30°C. El tiempo de incubación en el caso de *C. albicans* fue de 24 horas en una primera lectura y de confirmación a las 48 horas. Para *A. niger* la primera lectura se realizó a las 48 horas, aunque se deben realizar lecturas de confirmación hasta las 96 horas. El recuento de viables, se determinó únicamente en las placas que contenían menos de 150 UFC/placa.

3.4. La validación del ensayo

3.4.1. Validación de la toxicidad del neutralizador (B)

A 8 ml de neutralizador y 1 ml de agua destilada estéril se le añadió 1 ml de la suspensión fúngica de *C. albicans* o *A. niger* ($N_v = 6 \times 10^2$ a $1,5 \times 10^3$ UFC/ml), Se mezcló y se dejó en contacto en el baño de agua a $20^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$ durante 5 min. \pm 10 s. Inmediatamente antes de concluir el tiempo de contacto, se sembró por duplicado 1 ml de la mezcla en sendas placas de Petri a las que se añadió agar Sabouraud-dextrosa a 45°C. Las placas se incubaron a 30°C. El tiempo de incubación en el caso de *C. albicans* fue de 24 horas en una primera lectura y de confirmación a las 48 horas. Para *A. niger* la primera lectura se realizó a las 48 horas, aunque se deben realizar lecturas de confirmación hasta las 96 horas. El recuento de viables, se determinó únicamente en las placas que contenían menos de 150 UFC/placa.

Para verificar la validación de la toxicidad del neutralizador el resultado obtenido debe ser el siguiente:

B debe ser igual o superior a 0,05 veces **N_v**, donde

B es el número de UFC/ml obtenido en el ensayo de validación del neutralizador y

N_v la suspensión fúngica de *C. albicans* o *A. niger* (6×10^2 a $1,5 \times 10^3$ UFC/ml).

3.4.2. Validación del método de dilución-neutralización (valoración de la eficacia del neutralizador) (C)

3.4.2.1. Norma UNE 1275

A 8 ml de neutralizador se le añadió 1 ml de la solución de desinfectante a la mayor concentración de ensayo. Se mezcló y se dejó en contacto en el baño de agua a $20^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$ durante 5 minutos ± 10 s. Transcurrido este tiempo se añadió 1 ml de la suspensión fúngica de *C. albicans* o *A. niger* ($N_v = 6 \times 10^2$ a $1,5 \times 10^3$ UFC/ml). Se mezcló y se dejó en contacto en el baño de agua a $20^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$ durante 30 min. ± 10 s. Inmediatamente antes de concluir el tiempo de contacto, se sembró por duplicado 1 ml de la mezcla en sendas placas de Petri a las que se añadió agar Sabouraud-dextrosa a 45°C . Las placas se incubaron a 30°C . El tiempo de incubación en el caso de *C. albicans* fue de 24 horas en una primera lectura y de confirmación a las 48 horas. Para *A. niger* la primera lectura se realizó a las 48 horas, aunque se deben realizar lecturas de confirmación hasta las 96 horas. El recuento de viables, se determinó únicamente en las placas que contenían menos de 150 UFC/placa.

Para verificar la validación del método de dilución-neutralización el resultado obtenido debe ser el siguiente:

C debe ser igual o superior a 0,05 veces **N_v**, donde:

C es el número de UFC/ml obtenido en el ensayo de validación del método de dilución-neutralización y

N_v la suspensión fúngica de *C. albicans* o *A. niger* (6×10^2 a $1,5 \times 10^3$ UFC/ml).

3.4.2.2. Norma UNE 1650

A 1 ml de albúmina se añadió 1 ml de solución diluyente. Inmediatamente después se adicionó 8 ml de la solución de desinfectante a la mayor concentración de ensayo. Se mezcló y se mantuvo en contacto en el baño de agua a $20^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ durante 5 min. \pm 10 s. A continuación, se transfirió 1 ml de la mezcla a un tubo que contenía 8 ml de neutralizador. Se mezcló y se dejó en contacto en el baño de agua durante 5 min. \pm 10 s. Transcurrido este tiempo se añadió 1 ml de la suspensión fúngica de *C. albicans* o *A. niger* ($N_v = 6 \times 10^2$ a $1,5 \times 10^3$ UFC/ml). Se mezcló y se dejó en contacto en el baño de agua a $20^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ durante 30 min. \pm 10 s. Inmediatamente antes de concluir el tiempo de contacto, se sembró por duplicado 1 ml de la mezcla en sendas placas de Petri a las que se añadió agar Sabouraud-dextrosa a 45°C . Las placas se incubaron a 30°C . El tiempo de incubación en el caso de *C. albicans* fue de 24 horas en una primera lectura y de confirmación a las 48 horas. Para *A. niger* la primera lectura se realizó a las 48 horas, aunque se deben realizar lecturas de confirmación hasta las 96 horas. El recuento de viables, se determinó únicamente en las placas que contenían menos de 150 UFC/placa.

Para verificar la validación del método de dilución-neutralización el resultado obtenido debe ser el siguiente:

C debe ser igual o superior a 0,5 veces el valor **B**, donde:

C es el número de UFC/ml obtenido en el ensayo de validación del método de dilución-neutralización y

B es el número de UFC/ml obtenido en el ensayo de validación del neutralizador

3.4.3. Validación de las condiciones experimentales (sólo en la Norma UNE 1650)

A 1 ml de albúmina (3 g/l) se le añadió 1 ml la suspensión fúngica de *C. albicans* o *A. niger* ($N_v = 6 \times 10^2$ a $1,5 \times 10^3$ UFC/ml). Se mezcló y se colocó el tubo de ensayo en el baño de agua a $20^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$ durante 2 minutos ± 10 s. Al cabo de este tiempo, se añadió 8 ml de agua dura. Se mezcló y se dejó en contacto en el baño de agua durante 5 min. ± 10 s. Inmediatamente antes de concluir el tiempo de contacto, se sembró por duplicado 1 ml de la mezcla en sendas placas de Petri a las que se añadió agar Sabouraud-dextrosa a 45°C . Las placas se incubaron a 30°C . El tiempo de incubación en el caso de *C. albicans* fue de 24 horas en una primera lectura y de confirmación a las 48 horas. Para *A. niger* la primera lectura se realizó a las 48 horas, aunque se deben realizar lecturas de confirmación hasta las 96 horas. El recuento de viables, se determinó únicamente en las placas que contenían menos de 150 UFC/placa.

Para verificar la validación de la toxicidad del neutralizador el resultado obtenido debe ser el siguiente:

A debe ser igual o superior a 0,05 veces N_v , donde,

A es el número de UFC/ml obtenido en el ensayo de validación de las condiciones experimentales.

N_v la suspensión fúngica de *C. albicans* o *A. niger* (6×10^2 a $1,5 \times 10^3$ UFC/ml).

3.5. Adaptación de la norma UNE 1650 a técnicas impedanciométricas

En la valoración de la actividad fungicida y de los ensayos de validación el punto final es la realización de los recuentos que aplicando la norma UNE 1650 se llevan a cabo utilizando técnicas convencionales de recuento en placa, que requiere un tiempo determinado de incubación, para posteriormente realizar el recuento que supone también un cierto período de tiempo, sobre todo si se valoran diferentes productos químicos a distintas concentraciones. Es por ello, que para facilitar y acelerar esta última fase de recuento y obtención de resultados es posible hacerlo utilizando técnicas impedanciométricas:

Para ello inicialmente fue necesario la calibración del recuento obtenido mediante el método convencional con relación al tiempo de detección obtenido. Para ello se procedió de la siguiente manera:

A partir de la solución madre de ambas especies fúngicas, preparadas como se indica en el apartado de preparación del inóculo, se realizó siete diluciones decimales en diluyente (0,1% de triptona y 0,85% de NaCl). Para obtener la curva de calibración, a partir de las diluciones se procedió paralelamente a la determinación del recuento en medio Agar sabouraud-dextrosa y a la determinación del tiempo de detección correspondiente a dicho recuento mediante el sistema Bactometer™ (bioMérieux Vitek, Inc.). El sistema Bactometer™ consta de una Unidad de Procesado Bactometer (BPU) con espacio para 4 módulos con 16 pocillos cada uno, lo cual permite la realización de 64 análisis individuales. Para la calibración se inoculó por duplicado 0,2 ml de cada una de las diluciones fúngicas y 0,5 ml de caldo Sabouraud-dextrosa en cada uno de los pocillos de los módulos del sistema. Se ajustó la temperatura a 30° C y el test aplicado fue el de capacitancia, siendo el período de incubación de 48 horas para *C. albicans* y de 72 horas para *A. niger*.

Una vez realizada la calibración, se procedió a la valoración de la actividad fungicida y a realizar las diferentes validaciones del ensayo, según las especificaciones de las normas UNE 1276 y UNE 1650. Así, para realizar los recuentos correspondientes en función del tiempo de detección, al igual que en la fase de calibración se inoculó por duplicado 0,2 ml de cada de las soluciones finales resultado de los diferentes ensayos y 0,5 ml de caldo Sabouraud-dextrosa en cada uno de los pocillos de los módulos del sistema. Igualmente, la temperatura de incubación fue a 30° C y el test aplicado el de capacitancia, siendo el período de incubación de 48 horas para *C. albicans* y de 72 horas para *A. niger*.

3.6. EFECTO DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES EN LA VIABILIDAD DE LAS CEPAS FÚNGICAS EN SUPERFICIES

Estos ensayos se realizaron con la finalidad de evaluar el crecimiento o la supervivencia de *C. albicans* y *A. niger* en soportes de acero inoxidable, vidrio (portaobjetos) y tela de algodón sometidos a tres condiciones ambientales distintas: humedad, semihumedad y secado rápido, realizándose la valoración a intervalos de 12 horas durante 120 horas. En la evaluación en condiciones secas se hizo una valoración inicial tras el proceso de secado. La valoración del crecimiento o supervivencia se realizó mediante la técnica convencional de recuento en placa en medio agar Sabouraud Dextrosa y paralelamente se realizó la observación de las células viables o muertas mediante la técnica de microscópica de epifluorescencia directa y análisis de imagen.

3.6.1. Superficies de estudio

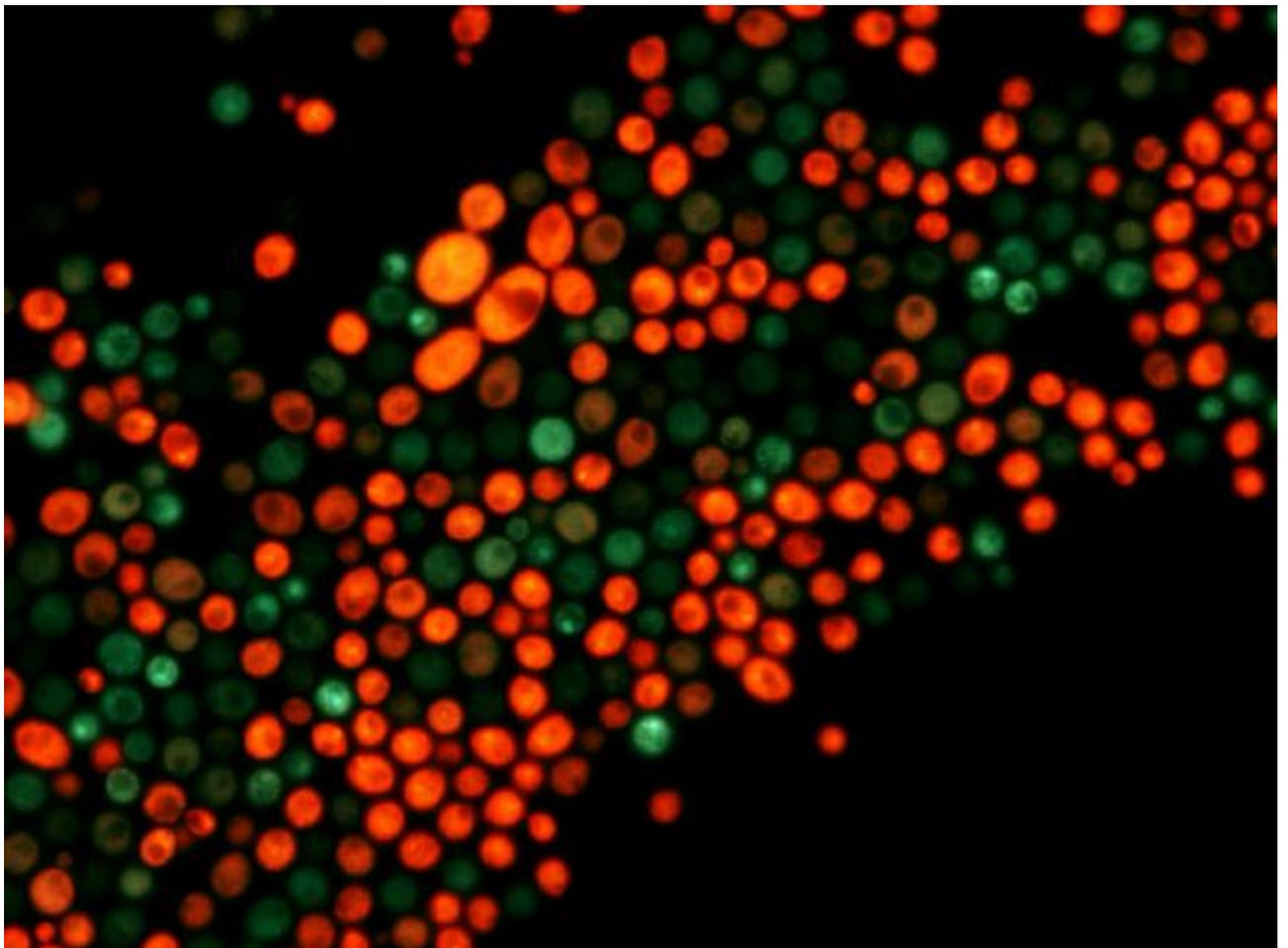
Los soportes de acero inoxidable, eran estructuras de acero inoxidable (2B) con un diámetro de 2 cm y un grosor de 1 mm. Constaban de dos caras: una cara plana para adherirse a la superficie y la otra ligeramente convexa. El soporte de acero inoxidable previamente fue esterilizado en el autoclave a 121°C durante 15 minutos, y para el estudio en el microscopio se pegó a un portaobjetos con cinta adhesiva. Se ensayó igualmente la eficacia fungicida de diferentes productos desinfectantes sobre *C. albicans* en tela de algodón al 100%. Las superficies de ensayo fueron de 1, 2 y 40 cm².

3.6.2. Tinción vital de fluorescencia

Para la observación de las muestras al microscopio se realizó la tinción vital de fluorescencia (LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit L-13152, Molecular Probes, USA) cuya máxima excitación está entorno a 480-490 nm. Se decidió emplear esta tinción porque la preparación era rápida y sencilla y a la vez específica para diferenciar células vivas y muertas o lesionadas. El kit proporciona dos colorantes que se fijan al ácido nucleico de la célula: el colorante SYTO9 y el yoduro de propidio. El mecanismo de acción se basa en las características de permeabilidad de la membrana plasmática. Las células con la membrana plasmática intacta son permeables al SYTO 9 pero no al yoduro de propidio, por lo tanto, se teñirán de color verde. Las células que tienen la membrana plasmática dañada penetran los dos colorantes, el yoduro de propidio reduce el SYTO9 produciendo una tinción de color rojo.

El kit se preparó de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial, añadiéndose 50µl en las muestras e incubándose 15 minutos en oscuridad (Figura 2).

Fotografía 2. Celulas vegetativas de *Candida albicans* de color verde las vivas y de rojo las dañadas o muertas.



3.6.3. Técnica de microscopía de epifluorescencia directa

Todas las muestras teñidas fueron examinadas en el microscopio de epifluorescencia directa Olympus BX51/BX52 (Olympus, Tokio, Japan) con lámpara de mercurio (Olympus Power Supplí Unit U-RFL-T) y 3 filtros de excitación (Tabla 9).

Las fotografías se hicieron con una cámara digital Olympus DP-50 incorporada al microscopio y el análisis de imagen se realizó con el programa Soft Imaging System™ (análisis GMBH, Alemania) incorporado en un sistema informático conectado al microscopio.

Tabla 9. Características de los filtros ópticos.

Tipo de filtro	Rango de excitación (nm)	Rango emisión (nm)	Color percibido
B	470-490	515-550	verde
G	510-550	>590	rojo
IB	480-495/515-535	550-570 /590-620	verde-rojo

3.6.4. Captura de la imagen: digitalización

Para la captura digital de la imagen se estandarizaron los parámetros con el fin de conseguir imágenes homogéneas. Parámetros como la configuración de entrada, calibración de la entrada y la adquisición de imágenes se ajustaron a unos valores que se mantuvieron a lo largo de todo el estudio.

Se realizaron un total de 200 imágenes digitalizadas a 480 x 640 píxeles equivalente a una calidad fotográfica estándar a 400 aumentos.

3.6.5. Detección y medición de componentes de la imagen

La detección y medición de los componentes de la imagen se realizó mediante un parámetro llamado “thresholding “ o ajuste de umbral que permitía definir y separar los componentes de una imagen y asignar a cada uno de ellos un color distinto. Con ello mediante operadores lógicos se hacía la detección de los componentes marcados para cuantificar áreas, perímetros, número de partículas, clasificación de partículas etc.

En todas las imágenes los valores de umbral se ajustaban en el histograma por prueba y error (opción manual) de modo que cada imagen iba definida por 3 niveles de color (**Tabla 10**).

Tabla 10. Sistema manual de ajuste de umbral

Fases	Rojo (0-256)	Verde(0-256)	Azul (0-256)
Células vivas	0-191	88-255	0-232
Células lesionadas/muertas	137-255	0-224	0-142
Fondo	0-49	0-58	0-21

3.7. Condiciones ambientales

En las superficies donde se evaluó el efecto de las condiciones ambientales, se inoculó una suspensión fúngica de *C. albicans* o *A. niger* con un recuento aproximado de 10^2 UFC/ml. Para ello, inicialmente se preparó la suspensión como se ha descrito anteriormente (apartado 3.1.2.), y se verificó el recuento aproximado mediante espectrofotometría, para posteriormente realizar las diluciones oportunas hasta conseguir la suspensión a partir de la cual realizar el inóculo en las superficies. La cantidad inoculada fue de 0,1 ml en el soporte de acero inoxidable y de 0,05 ml en la tela de algodón de 1 cm^2 .

Una vez realizado el inóculo, para simular las condiciones húmedas, las muestras se incubaron en una estufa a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ en una cámara cerrada con las paredes recubiertas de papel de filtro mojado con agua destilada. Para simular las condiciones de semihumedad las muestras se incubaron en la estufa mencionada anteriormente, de modo que se permitía una desecación progresiva. Finalmente para obtener condiciones de sequedad absoluta, las muestras se dejaron expuestas durante dos horas a la campana de flujo vertical de modo que la recirculación del aire produjo una desecación rápida del inóculo.

A los diferentes tiempos de estudio, intervalos de 12 horas, durante 120 horas, se procedieron a realizar, por duplicado, el estudio del efecto de las diferentes condiciones ambientales mediante la técnica de recuento convencional, para lo cual se introdujeron la mitad de las superficies de estudio en placas de Petri, se adicionó medio agar Sabouraud Dextrosa, se incubó a 30°C , realizándose el recuento en el caso de *C. albicans* a las 24-48 h, y a las 48-72 horas en el caso de *A. niger*. Paralelamente, se pegaron en portaobjetos con cinta biadhensiva la otra mitad de

superficies, posteriormente se realizó la tinción vital que permitió observar las células viables o muertas mediante la técnica de microscópica de epifluorescencia directa.

3.8. Evaluación de la actividad fungicida en tela de algodón

La evaluación de la actividad fungica en las superficies de algodón se realizó utilizando como base metodológica las normas UNE 1275 y UNE 1650. Dichas normas tienen como objetivo determinar la actividad fungicida de los productos químicos directamente sobre una suspensión de células fúngicas, por lo que fue necesario realizar modificaciones en el protocolo de ensayo para adaptar dichas normas a la evaluación de la actividad fungicida de los productos químicos sobre células fúngicas de *C. albicans* inoculadas en la superficie de tela de algodón. Además de la valoración de la actividad fungicida, se realizó igualmente las validaciones del ensayo, de la misma manera que ha sido descrita en el apartado 1.5.

En todos los ensayos, se realizó paralelamente la inoculación de 0,1 ml en las superficies de 2 cm² y de 0,05 ml en las de 1 cm² de la suspensión fúngica de *C. albicans* a la concentración de $1,5-5 \times 10^8$ UFC/ml y de $6 \times 10^2-1,5 \times 10^3$ UFC/ml, para posteriormente realizar la tinción vital para observar las células viables mediante la técnica de microscópica de epifluorescencia directa.

Tabla 11. Los productos evaluados fueron los siguientes:

Norma	Producto	Principio activo	Concentración (%)	Tiempo (minutos)
UNE-EN 1275	1	Alcohol geraniol-nerol	20, 30, 40 y 50	60
	2	Ácido benzoico y etanol	70 y 80	60
	3	Cloruro de benzalconio, ácido cítrico y etanol	0,5, 1, 10, 20, 30 y 40	5
	5	Glutaraldehído	10, 15, 20, 30 y 40	5
	6	Hipoclorito sódico	0,01, 0,02, 0,04, 0,1, 0,2, 0,5 y 1	5
UNE-EN 1650	2	Alcohol geraniol-nerol	50 y 60	60
	5	Glutaraldehído	40 y 80	15
	3	Cloruro de benzalconio, ácido cítrico y etanol	60 y 70	15
	6	Hipoclorito sódico	5 y 10	15

3.8.1. Ensayo con tela aplicando la norma UNE 1275

Para realizar la adaptación de las normas se ensayaron los protocolos siguientes:

3.8.1.1. Protocolo 1 con tela

En un tubo de ensayo se inoculó 0,1 ml de una de la suspensión fúngica de *C. albicans* ($N=1,5$ a 5×10^8 UFC/ml) dos porciones de tela de 2 cm^2 . Posteriormente, se le adicionó 8 ml de la solución de desinfectante a la concentración de ensayo y 1,9 ml de agua destilada. Se mezcló y se colocó el tubo de ensayo en el baño de agua a $20^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$. La actividad del producto se determinó a los 5 y 60 minutos (ver Tabla 11). Antes de finalizar el tiempo de contacto seleccionado se mezcló y, se neutralizó la reacción. Para neutralizar la reacción, se procedió de dos formas. Por una parte, se tuvieron en cuenta, las células fúngicas que pudieran quedar en la mezcla de la solución de ensayo y por otras las células fúngicas que pudieran quedar adheridas a la tela.

Así, por una parte, se añadió 1 ml de la mezcla de la solución de ensayo con las células fúngicas no adheridas a 8 ml de neutralizador con 1 ml de agua destilada estéril. A los 5 minutos se sembró por duplicado 1 ml de la mezcla neutralizada en sendas placas de Petri a las que se añadió agar Sabouraud-dextrosa a 45°C . Las placas se incubaron a 30°C , durante 24-48 horas. El recuento de viables, se determinó únicamente en las placas que contenían menos de 150 UFC/placa.

Respecto a la neutralización de las telas, se tomaron las dos porciones y se agregaron a un tubo que contenía 8 ml neutralizador más 1 ml agua destilada estéril. A los 5 minutos, se sembraron una de las telas de 2 cm^2 en una placas de

Petri a las que se añadió agar Sabouraud-dextrosa a 45°C. Las placas se incubaron a 30°, realizándose el recuento a las 24-48 horas. La otra porción de tela se pegó en un portaobjetos con cinta biadhensiva, para posteriormente realizar la tinción vital para observar las células viables o muertas mediante la técnica de microscópica de epifluorescencia directa.

3.8.1.2. Protocolo 2 con tela

Con el objetivo de poder realizar el recuento total de las células fúngicas, es decir, de las células adheridas y no adheridas a la tela, tras la evaluación del desinfectante el protocolo que se desarrolló fue el siguiente:

En una placa de Petri se depositó la porción de tela de algodón de 2 cm² y se le inoculó 0,1 ml de una de la suspensión fúngica de *C. albicans* (N=1,5 a 5x10⁸ UFC/ml). Posteriormente, se adicionó sobre la tela 0,8 ml de la solución desinfectante de ensayo y 0,1 ml de agua destilada estéril. Tras 5 minutos de contacto, se neutralizó la reacción, adicionando 4,5 ml de neutralizador y 0,5 ml de agua destilada estéril. A los 5 minutos se añadió agar Sabouraud-dextrosa a doble concentración. Las placas se incubaron a 30°C, durante 24-48 horas.

3.8.1.3. Protocolo 3 con tela

Con el objetivo de asemejar al máximo las condiciones de la norma UNE-EN 1275, a las realizadas en el ensayo con tela de algodón, se valoró la actividad fúngica en una superficie de algodón de 45,5 cm² (6,5 cm x 7 cm), que permitía absorber totalmente 1 ml del inóculo inicial. Así, el ensayo fue el siguiente:

En una placa de Petri se depositó la porción de tela de algodón de 45,5 cm² y se le inoculó 1 ml de una de la suspensión fúngica de *C. albicans* (N=1,5 a 5x10⁷ UFC/ml). Posteriormente, se adicionó sobre la tela 8 ml de la solución desinfectante de ensayo y 1 ml de agua destilada estéril. Tras 5 minutos de contacto, se neutralizó la reacción, adicionando 8 ml de neutralizador y 1 ml de agua destilada estéril. A los 5 minutos se añadió agar Sabouraud-dextrosa a doble concentración. Las placas se incubaron a 30°C, durante 24-48 horas.

3.8.2. Ensayo con tela (condiciones sucias)

Se realizaron los mismos ensayos que en el de condiciones limpias pero con el protocolo de la norma 1650 (condiciones sucias).

3.9. DISEÑO ESTADISTICO

Para la realización del estudio estadístico se utilizó el programa informático SPSS para Windows, versión 10.0. (SPSS Inc., 1989-1999).

El análisis estadístico de la varianza de la regresión fue utilizado para la comparación entre la absorbancia y los tiempos de detección en función de la concentración bacteriana, además de la comparación de los resultados obtenidos en Bactometer™ y el método tradicional de recuento en placa, con el fin de conocer la relación o independencia de estas comparaciones.

La ventaja de la utilización de esta prueba se debe a que no es necesario que se cumplan las condiciones iniciales de normalidad y de uniformidad de varianzas, necesarias para el empleo de otras pruebas estadísticas paramétricas, ya que se trata de una prueba muy robusta, siendo más precisa cuanto mayor es el tamaño de la muestra (Schwartz, 1988).

Se realizó para la valoración del crecimiento de los microorganismos sometidos a diferentes tratamientos en diferentes intervalos de tiempo un análisis de la varianza utilizando el Modelo Lineal Generalizado (GLM) y el test de Duncan como test de comparación múltiple entre las medias con un nivel de significación $p < 0,05$.

IV RESULTADOS y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS

4.1. Determinación del recuento en función de la absorbancia

En los gráficos 1 y 2, se muestran los resultados obtenidos al realizar la correlación entre la absorbancia obtenida de las suspensiones fúngicas de *C. albicans* y *A. niger* y el recuento en placa, con la finalidad de determinar el recuento aproximado del inóculo inicial de la suspensión fúngica para realizar tanto la valoración de la actividad fungicida que debe encontrarse entre $1,5-5 \times 10^7$ UFC/ml, como para la preparación del inóculo para realizar la validación del ensayo que debe ser de 6×10^2 a $1,5 \times 10^3$ UFC/ml, tal como indica el protocolo de las normas UNE 1275 y 1650 (Anónimo, 1997; Anónimo, 1998b).

Para ambas cepas, la relación que presentó un mejor ajuste entre la absorbancia y el recuento en placa fue de tipo logarítmico con un coeficiente de determinación superior a 0.8 y altamente significativo ($P < 0.01$). Así pues, este resultado nos indica que el 81-82% de la población analizada sigue la ecuación determinada en el análisis estadístico. Sin embargo, aunque la relación se ha mostrado como altamente significativa, es probable, y esperable, que se observe una variación elevada (superior al 18-20%) en los resultados calculados respecto a los esperados. En consecuencia, se deberá tener en cuenta estas variaciones en la determinación del recuento de la suspensión fúngica inicial.

Gráfico 1. Calibración de la absorbancia de las suspensiones de *C. albicans* respecto al recuento en placa.

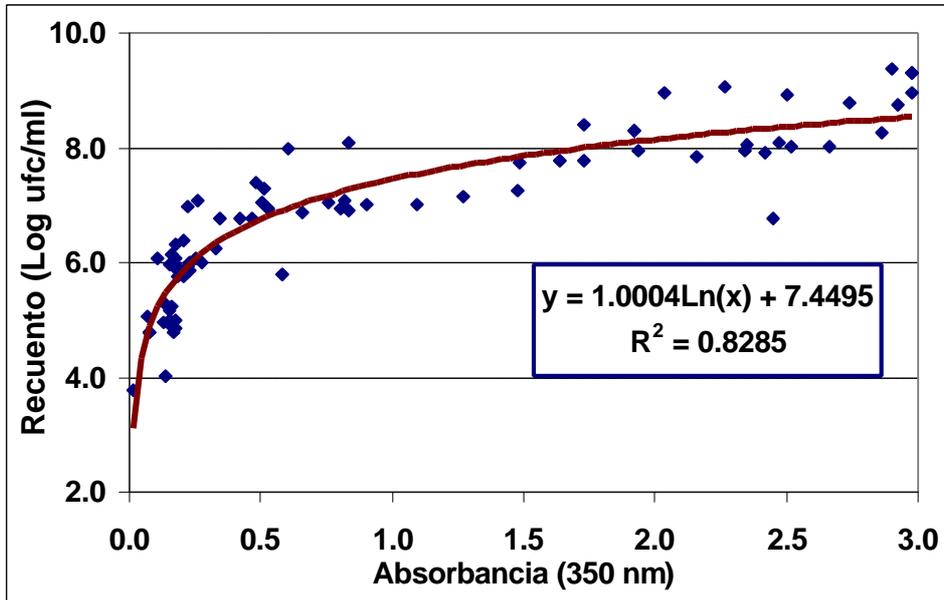
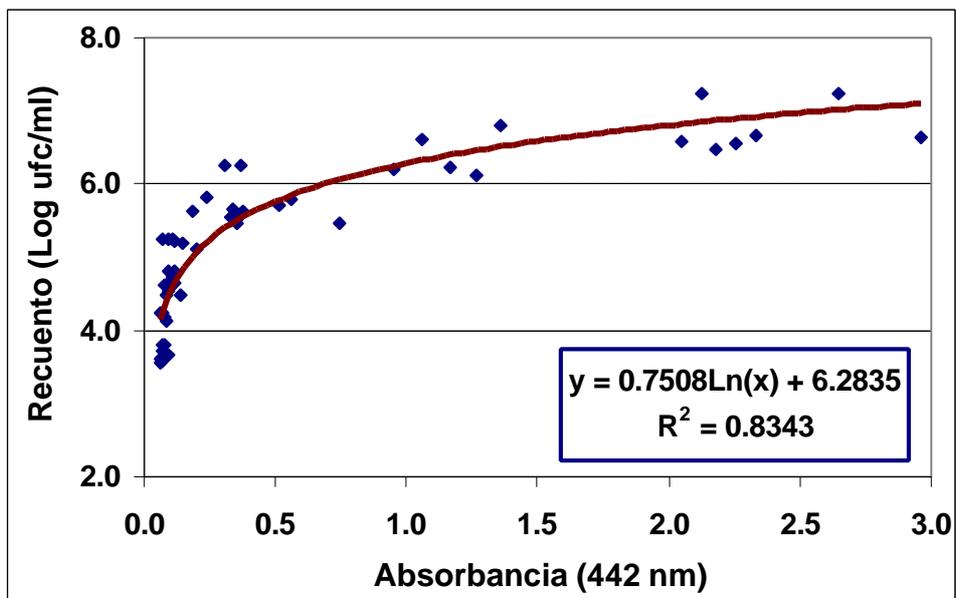


Gráfico 2. Calibración de la absorbancia de las suspensiones de *A. niger* respecto al recuento en placa.



4.2 Valoración de la actividad fungicida

Entre los requisitos exigibles para la inscripción en el registro oficial de plaguicidas de la Dirección General de Salud Pública, es necesario que figure la eficacia del formulado frente a las plagas que se desean combatir, haciendo referencia en los productos desinfectantes si tienen actividad bactericida o fungicida. En la valoración de la actividad fungicida se debe explicitar que norma cumple (UNE 1275 o UNE 1650), la concentración de máxima eficacia y el tiempo de contacto (Anónimo, 1997; Anónimo, 1998b).

4.2.1. Determinación de la actividad fungicida aplicando las normas UNE 1275 y 1650

En las Tablas 12 y 13 se presenta un resumen de los resultados obtenidos al valorar la actividad fungicida de 6 productos comerciales domésticos (dos lavavajillas y 4 limpiadores generales del hogar) al aplicar las normas UNE 1275 y 1650. En dichas tablas observamos que la actividad fungicida sobre *C. albicans* y *A. niger* de los diferentes productos ensayados difiere en función de cinco parámetros: La concentración del producto desinfectante, el tiempo de contacto, la preparación del producto desinfectante en agua destilada (Norma UNE 1275) o agua dura (Norma UNE 1650), la presencia de sustancias interferentes (Norma UNE 1650) y en función de la cepa.

Entre los lavavajillas ensayados con sustancias desinfectantes aplicando ambas normas internacionales a diferentes concentraciones (entre 12,5 y 80%) y a

diferentes tiempos (5, 15 y 60 minutos) se observó una mayor efectividad del producto 1, que contenía alcoholes respecto al producto 2 que contenía ácido benzoico y etanol (Tabla 12 y 13). El producto 2, con ácido benzoico y etanol, no fue efectivo sobre *C. albicans* y *A. niger* al aplicar las normas a ninguna de las concentraciones y tiempos evaluados. Sin embargo, el producto 1 resultó ser efectivo frente a *C. albicans* al aplicar la norma UNE1275 a una concentración mínima del 40% durante 60 minutos y al aplicar la norma UNE 1650 a una concentración del 60% al mismo tiempo de contacto. Sin embargo, no fue efectivo frente a las esporas de *A. niger*. Lo que demostró, la influencia que tienen las sustancias interferentes, aplicadas en las denominadas condiciones sucias, en la pérdida de eficacia de los productos que tienen como base alcoholes, así como la confirmación de su eficacia frente a levaduras, pero no frente a esporas de mohos, por lo que ninguno de los dos productos utilizados como lavavajillas podrían calificarse o registrarse como productos con actividad fungicida a los tiempo de contacto ensayados. Se debe considerar además que no se ha ensayado una concentración superior al 80%, debido a que el protocolo de ensayo realizado por el método de dilución-neutralización, lleva asociado una fase de dilución inevitable que limita la concentración máxima de ensayo a esta concentración del 80%.

Respecto a los limpiadores generales del hogar, igualmente ensayados a diferentes concentraciones (entre 0,5 y 80%) y diferentes tiempos (5, 15 y 60 minutos), se observó que la mayor actividad fúngica, determinada frente a *C. albicans* y *A. niger* a concentraciones inferiores y tiempos más cortos, la presentó el producto 6 que contenía hipoclorito sódico, seguido por el producto 5, con glutaraldehído. El producto el producto 3 con cloruro de benzalconio, un amonio

cuaternario, y el producto 4 con peróxido de hidrógeno, fueron los que mostraron una menor efectividad (Tabla 12 y 13). De forma similar a los lavavajillas, se observó una disminución de la eficacia de los desinfectantes en presencia de sustancias interferentes y un incremento de la eficacia fungicida al aumentar el tiempo de contacto, así como, se apreciaron diferencias en la eficacia en función de si la cepa era una levadura o una espora de moho.

En el producto 6 con hipoclorito sódico, se observó la influencia importante de la presencia de sustancias interferentes. Así, una concentración de 0,5% durante 5 minutos fue suficiente para disminuir en 4 unidades logarítmicas a *C. albicans*, mientras que aplicando la norma UNE 1650 (condiciones sucias), la concentración requerida fue del doble, es decir un 1% al mismo tiempo de contacto (Tabla 12). Ello, se apreció de forma similar para *A. niger*, de forma que concentraciones de un 1,25% durante 5 minutos eran eficaces al aplicar la norma UNE 1275, mientras que a un 5% no era efectiva según norma UNE 1650, validándose su eficacia a un 1% durante 15 minutos (Tabla 13).

Respecto al producto 5 con glutaraldehído, se observó que si bien a un tiempo de contacto de 5 minutos y un 20% de concentración, éste era eficaz aplicando la norma UNE 1275 sobre *C. albicans*, no lo fue al aplicar la norma UNE 1650 a un 80% a ese mismo tiempo, aunque fue efectivo al incrementar el tiempo a 15 minutos a una concentración menor de un 10% (Tabla 12), evidenciando la importancia del efecto de la sustancia interferente y la preparación del desinfectante en agua dura, así como del tiempo de contacto.

En la evaluación de la actividad fungicida del producto 4 con peróxido de hidrógeno se observaron resultados similares, aunque se debería destacar su ineficacia frente a *A. niger*, en presencia de sustancias interferentes al aplicar la norma UNE 1650, lo cual refleja la importancia de la presencia de materia orgánica en la actividad de dicho producto. Así, si bien fue eficaz frente a *A. niger* aplicando la Norma UNE 1275, con un tiempo de contacto de 60 minutos a una concentración del 50%, al aplicar la norma UNE 1650 a un 80% durante ese mismo tiempo el producto se mostró ineficaz (Tabla 13). Similares resultados, se observaron frente a *C. albicans*, de forma que aplicando la norma UNE 1275, una concentración del 20% durante 5 minutos se mostró ya efectiva, mientras que al aplicar la norma UNE 1650, la concentración efectiva fue de un 50% durante 15 minutos (Tabla 12).

Finalmente, en el producto 3 con cloruro de benzalconio, la mayor efectividad se obtuvo frente *C. albicans* a una concentración del 30% durante 5 minutos de tiempo de contacto cuando no existían sustancias interferentes (Norma UNE 1275), mientras que en condiciones sucias (Norma UNE 1650) fue efectiva a una concentración del 50% durante 15 minutos (Tabla 12). Por otra parte, la concentración y tiempo efectivos frente a *A. niger* fueron superiores, así sin sustancias interferentes fue del 60% durante 60 minutos. Sin embargo, en condiciones sucias a la mayor concentración, 80% durante 60 minutos de contacto no fue efectivo (Tabla 13).

Tabla 12. Evaluación de la actividad fúngica sobre *C. albicans*

Produc- to	Principio activo	Nor- ma	Tiempo de contacto	Concentración	Reducción (log (UFC/ml)	Recuento inicial (log UFC/ml)
1	Alcoholes (LV)	1275	5	80	< 4	7.18 ± 0.10
			60	30	< 4	7.30 ± 0.10
		1650	60	40	5.45 ± 0.10	7.45 ± 0.10
			15	80	< 4	7.77 ± 0.17
		60	50	< 4	7.36 ± 0.45	
		60	60	4.78 ± 0.31	7.36 ± 0.45	
2	Ácido benzoico y etanol (LV)	1275	5	80	< 4	7.67 ± 0.19
			15	80	< 4	7.18 ± 0.10
		1650	60	80	< 4	7.07 ± 0.41
			60	80	< 4	7.88 ± 0.39
3	Cloruro de benzalconio, ácido cítrico y etanol (LH)	1275	5	20	< 4	7.34 ± 0.10
			5	30	5.34 ± 0.10	7.34 ± 0.10
		1650	5	80	< 4	8.01 ± 0.39
			15	40	< 4	7.44 ± 0.41
		15	50	4.67 ± 0.16	9.15 ± 0.17	
		60	20	< 4	9.30 ± 0.41	
60	80	6.30 ± 0.10	9.30 ± 0.41			
4	Peróxido de hidrógeno (LH)	1275	5	20	< 4	7.28 ± 0.16
			5	40	5.28 ± 0.16	7.28 ± 0.41
		1650	15	40	< 4	8.00 ± 0.41
			15	50	4.08 ± 0.41	7.72 ± 0.96

5	Glutaraldehído (LH)	1275	5	15	< 4	7.50 ± 0.64
			5	20	4.60 ± 0.66	7.82 ± 0.17
		1650	5	80	< 4	8.00 ± 0.41
			15	10	4.67 ± 0.16	8.00 ± 0.41
			60	20	6.30 ± 0.10	9.30 ± 0.41
6	Hipoclorito Sódico	1275	5	0.4	< 4	7.25 ± 0.17
			5	0.5	4.83 ± 0.62	7.61 ± 0.48
	(LH)	1650	5	1	4.77 ± 0.31	7.07 ± 0.17
			15	1	5.29 ± 0.39	7.29 ± 0.39

LV: Productos desinfectantes lavavajillas.

LH: Productos desinfectantes limpiadores del hogar

Tabla 13. Evaluación de la actividad fúngica sobre *A. niger*

Produc- to	Principio Activo	Norma	Tiempo de contacto	Concentración	Reducción (log (UFC/ml)	Recuento
						inicial (log UFC/ml)
1	Alcoholes (LV)	1275	60	80	< 4	7.26 ± 0.51
		1650	15	80	< 4	6.70 ± 0.11
2	Ácido benzoico y etanol (LV)	1275	60	80	< 4	7.26 ± 0.51
		1650	15	80	< 4	6.70 ± 0.05

			5	80	< 4	6.54 ± 0.05
3	Cloruro de benzalconio, ácido cítrico y etanol (LH)	1275	60	50	< 4	7.43 ± 0.23
			60	60	4.12 ± 0.11	7.43 ± 0.23
		1650	60	80	< 4	7.18 ± 0.28
			5	80	< 4	7.24 ± 0.11
4	Peróxido de hidrógeno (LH)	1275	60	40	< 4	6.55 ± 0.11
			60	50	4.22 ± 0.11	7.49 ± 0.23
		1650	15	80	< 4	6.70 ± 0.05
			60	80	< 4	7.31 ± 0.14
			5	60	< 4	7.24 ± 0.01
5	Glutaraldehído (LH)	1275	5	80	4.24 ± 0.11	7.24 ± 0.11
			60	50	4.33 ± 0.24	7.28 ± 0.46
		1650	15	40	< 4	6.71 ± 0.01
			15	50	4.82 ± 0.71	7.31 ± 0.14
		1275	5	1.25	5.12 ± 0.22	7.32 ± 0.39
6	Hipoclorito Sódico (LH)		5	5	< 4	6.59 ± 0.11
		1650	15	1	5.31 ± 0.14	7.31 ± 0.14
			15	5	5.07 ± 0.35	7.07 ± 0.35

LV: Productos desinfectantes lavavajillas.

LH: Productos desinfectantes limpiadores del hogar

Todos los productos comerciales ensayados, utilizados como limpiadores del hogar, pueden ser clasificados como productos con actividad fungicida, aunque depende de la norma a la que se haga referencia, así el producto 3 con cloruro de

benzalconio y el producto 4 con peróxido de hidrógeno puede ser validado por la norma UNE 1275, pero no por la norma UNE 1650. La concentración y tiempos recomendados se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Concentración y tiempos recomendados de efectividad fungicida según Norma UNE 1275 o 1650.

Producto	Principio activo	Norma 1275		Norma 1650	
		Concentración (%)	Tiempo (minutos)	Concentración (%)	Tiempo (minutos)
3	Cloruro de benzalconio, ácido cítrico y etanol	60	60	No efectivo	-
4	Peróxido de Hidrógeno	50	60	No efectivo	-
5	Glutaral-dehído	80	5	50	15
6	Hipoclorito sódico	1.25	5	1	15

4.2.2. Aplicación de técnicas de impedanciometría en la evaluación de la actividad fungicida. Validación de la técnica de screening

En la valoración de la actividad fungicida, el punto final es la realización de los recuentos que aplicando la norma UNE 1650 se llevan a cabo utilizando técnicas convencionales de recuento en placa, que requiere un tiempo determinado de incubación, concretamente 48 horas para *C. albicans* y 96 horas para *A. niger*, para posteriormente realizar el recuento que supone también un cierto período de tiempo, sobre todo si se valoran diferentes productos químicos a distintas concentraciones. Para facilitar y acelerar esta última fase de recuento se pueden realizar determinaciones impedanciométricas. Este método se basa en la actividad metabólica de los hongos, que degradan los componentes del medio de cultivo, produciendo elementos más simples que incrementan la carga eléctrica. Consecuentemente, la resistencia disminuye y la monitorización de ésta nos permitirá evaluar como se están comportando los microorganismos. La presencia fúngica es detectada como el tiempo transcurrido entre la inoculación y la detección por parte del equipo. Cuanto mayor es el tiempo de detección, menor es la concentración microbiana y/ o menor la actividad microbiana. Por el contrario, cuanto mayor es la concentración microbiana, menor es el tiempo de detección. Es por lo tanto una relación inversa. Es necesario, para determinar el recuento fúngico en función del tiempo de detección, realizar la curva de calibración que relacione el recuento real obtenido en placa y el tiempo de detección obtenido.

4.2.2.1. Determinación del recuento en función del tiempo de detección

En los gráficos 3 y 4, se muestran los resultados obtenidos al realizar la correlación entre el tiempo de detección obtenido de las suspensiones fúngicas de *C. albicans* y *A. niger* y el recuento en placa. Para ambas cepas, la relación que presentó un mejor ajuste entre el tiempo de detección y el recuento en placa fue de tipo logarítmico con un coeficiente de determinación superior a 0,9, altamente significativo ($P < 0.01$). Así pues, este resultado nos indica que el 91-92% de la población analizada sigue la ecuación determinada en el análisis estadístico. Sin embargo, aunque la relación se ha mostrado como altamente significativa, es probable, y esperable, que se observe cierta variación (8-9%) en los resultados calculados respecto a los esperados. En consecuencia, se deberá tener en cuenta estas variaciones en la determinación del recuento obtenido. Además, es necesario en los sucesivos ensayos de la valoración de la eficacia fungicida ajustar las curvas, utilizando en la solución de suspensión la proporción correspondiente al neutralizador utilizado, pues puede interferir en el tiempo de detección. Además de evaluar los resultados por el tiempo de detección obtenido, es conveniente visualizar gráficamente los cambios ocurridos, para verificar estos tiempos de detección, que pueden ser erróneos sobre todo si el recuento fúngico es elevado.

Gráfico 3. Calibración del tiempo de detección de las suspensiones de *C. albicans* respecto al recuento en placa.

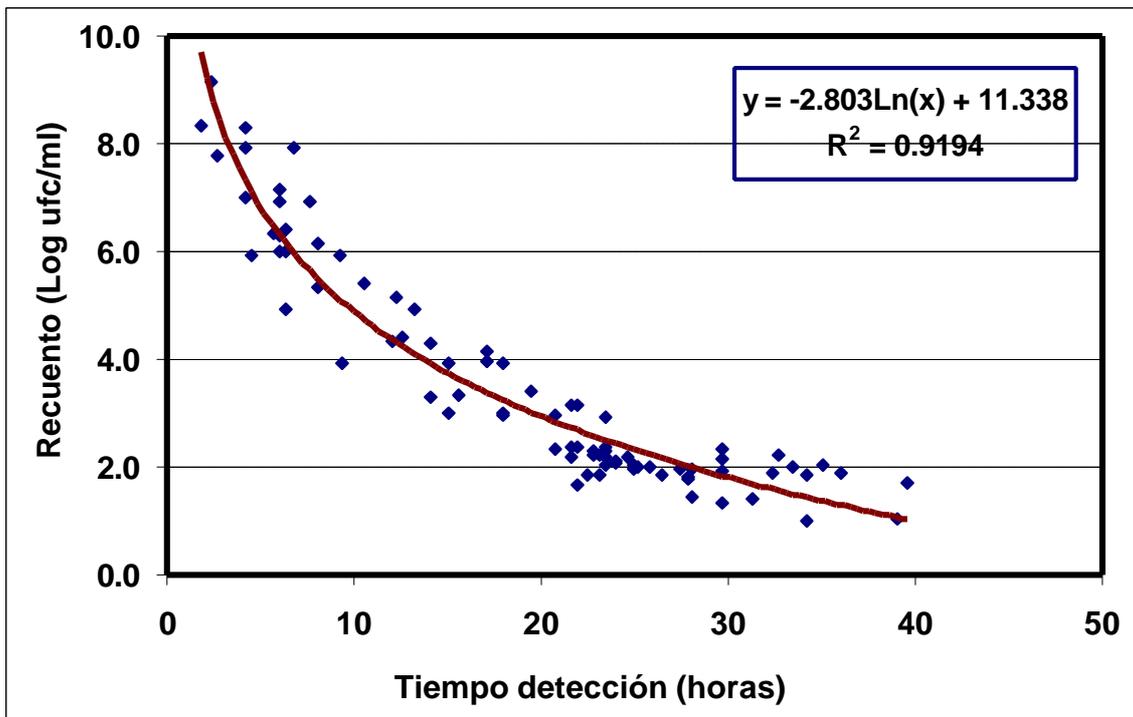
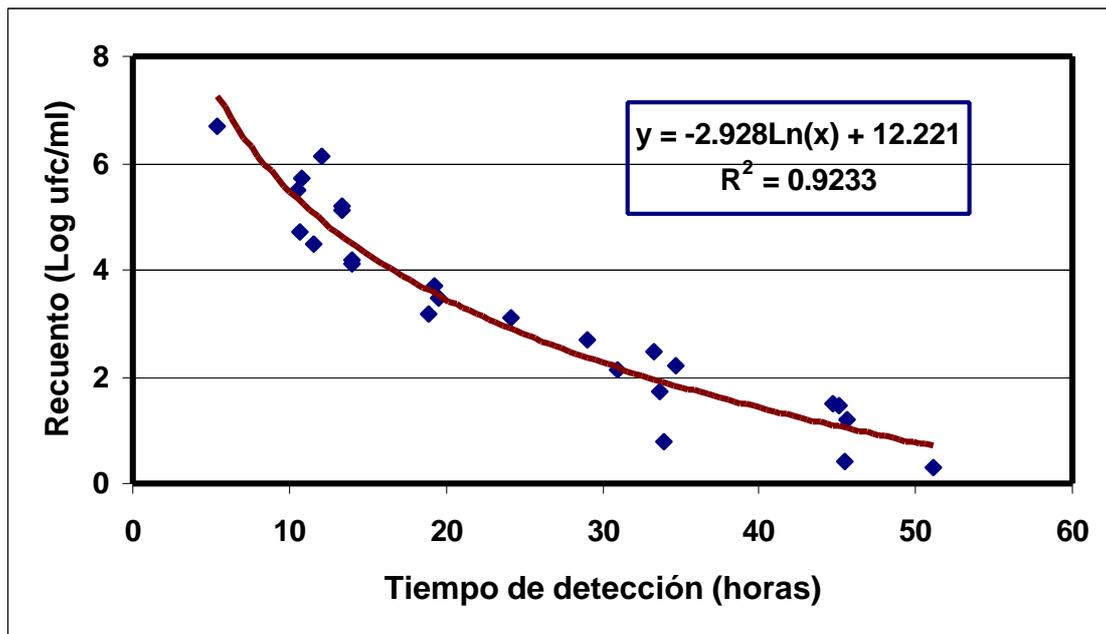


Gráfico 4. Calibración del tiempo de detección de las suspensiones de *A. niger* respecto al recuento en placa.



4.2.2.2. Determinación de la actividad fungicida según Norma UNE 1650.

Técnica de *screening*

Para la determinación de la actividad fungicida de diferentes productos desinfectantes comerciales aplicando técnicas impedanciométricas se realizaron dos estudios. El primero fue realizado en los seis productos comerciales desinfectantes estudiados en el apartado anterior relativo a la determinación de la actividad fungicida aplicando las normas UNE 1275 y 1650. El segundo estudio, se realizó en otros 14 productos desinfectantes comerciales de uso en el ámbito doméstico.

En ambos estudios la correlación observada entre los recuentos en placa y los calculados en función del tiempo de detección fue altamente significativa, siendo de 0,819 para *C. albicans* y 0,913 para *A. niger*. Igualmente se apreció que la determinación mediante impedanciometría en los productos ensayados fue efectiva con relación al recuento en placa, sobre todo en lo que hace referencia a la determinación de los productos que eran efectivos como fungicidas. Así, los productos desinfectantes comerciales considerados como fungicidas al realizar la determinación mediante el recuento en placa convencional, también lo fueron por la técnica impedanciométrica (Tablas 15 y 16).

La determinación del recuento mediante técnicas impedanciométricas tiene la ventaja respecto a lo que se especifica en las diferentes normas, en las que el recuento se realiza mediante recuento en placa, que permite la valoración directa,

sin diluciones, de la reducción fúngica real, lo cual permite de una forma más precisa determinar el grado de actividad fungicida de los diferentes productos químicos ensayados. No quiere decir que con la técnica convencional no se pueda realizar esta valoración, pero se deberían realizar diluciones posteriores, pues dicha técnica tiene como limitación el límite máximo de recuento, es decir las 150 unidades formadoras de colonias. Es por ello, que al concretar las unidades logarítmicas de reducción, sólo puede especificarse menos de 4 unidades logarítmicas.

Otra ventaja adicional e importante al utilizar la metodología rápida de impedanciometría es el tiempo en el cual se obtienen los resultados. Mediante, la técnica de recuento en placa el tiempo de incubación en el caso de *C. albicans* es de 24 horas en una primera lectura y de confirmación a las 48 horas y para *A. niger* la primera lectura es a las 48 horas, realizándose lecturas de confirmación hasta las 96 horas. Sin embargo, mediante impedanciometría el tiempo necesario de confirmación de la actividad fungicida es de 31-32 horas para *C. albicans* y de 49-50 horas para *A. niger*. Tiempos de detección inferiores serían indicativos de la ineficacia de los productos químicos ensayados, de forma que en ocasiones sería posible obtener resultados de esta ineficacia en menos de 24 horas.

Adicionalmente, se debe considerar que en la determinación de la actividad fungicida de un producto químico, es importante la valoración de la concentración mínima inhibitoria, es decir, la concentración mínima del producto que tiene actividad frente a las cepas fúngicas de ensayo. Ello implica que se deben ensayar un abanico de concentraciones hasta determinar cual es esta concentración óptima a un tiempo

determinado. Es por ello que previamente a este ensayo, y para delimitar a qué intervalo el producto químico es efectivo como fungicida sería conveniente realizar un análisis previo o *screening*, que facilitará a *posteriori* acotar el intervalo de concentraciones de ensayo, para determinar finalmente la concentración mínima de inhibición.

En nuestro estudio, las concentraciones iniciales de ensayo previo o de *screening* se establecieron a un 80 y un 20% a dos tiempos de contacto de 15 y 60 minutos. La decisión se derivó por una parte de los resultados obtenidos al aplicar la Norma UNE 1275 y 1650 en los seis productos anteriormente valorados, en los que se observó que la concentración óptima de los productos desinfectantes venía determinada sobre todo por la resistencia de las esporas de *A. niger*, de forma que las concentraciones requeridas en la mayoría de productos eran próximas a la concentración máxima de ensayo, un 80%, a tiempos de contacto de 15 a 60 minutos. Por otra parte, la concentración del 20%, fue elegida considerando cuales eran las recomendaciones habituales de uso de los fabricantes de productos desinfectantes de ámbito doméstico, así como las de otros autores (Sagripanti y Bonifacino, 1999). La elección de aplicar la Norma 1650, se derivó del hecho de que la evaluación de la actividad fungicida de los productos comerciales debía realizarse bajo las condiciones más desfavorables, teniendo en cuenta que son las circunstancias que se aproximan más a la realidad de su uso, dado que la dilución de los productos comerciales domésticos se realizará utilizando agua dura, y su utilización se hará bajo condiciones sucias, dado que son productos, la mayoría de ellos, que asocian sustancias limpiadoras y desinfectantes.

Los resultados obtenidos de la valoración paralela mediante recuento en placa e impedanciometría de la actividad fungicida frente a *C. albicans* y *A. niger*, se presentan en las Tablas 15 a 20. En ellas se incluyen conjuntamente, los resultados del estudio de los seis productos desinfectantes comerciales (Productos del 1 al 6) que fueron valorados anteriormente (2 lavavajillas y 4 limpia-hogares generales), a diferentes tiempos y concentraciones y los resultados del segundo estudio, de los catorce productos comerciales evaluados a la concentración de un 20 y 80% y un tiempo de contacto de 15 y 60 minutos (productos del 7 al 20). De los catorce productos desinfectantes comerciales ensayados, tres son utilizados como lavavajillas, siete como productos desinfectantes para el baño, dos como limpiadores generales del hogar y dos productos para la ropa.

4.2.2.3. Evaluación de la actividad fungicida

Los resultados obtenidos al realizar el ensayo de la actividad fungicida sobre *C. albicans* y *A. niger* de los productos desinfectantes utilizados como lavavajillas evaluados mediante impedanciometría y/o recuento en placa se presentan en las Tablas 15 y 16 y la Gráficas 6.

Se observó que no existían diferencias estadísticamente significativas entre los cinco productos ensayados al valorar su eficacia fungicida sobre *C. albicans* y *A. niger*. Sin embargo, cuando se ensayó un tiempo de contacto de 60 minutos, se apreciaron diferencias significativas. Así, frente a *C. albicans*, el producto 1 (con alcoholes) y el producto 7 (con tensioactivos anfotéricos y conservantes), fueron los

que presentaron una capacidad de reducción fúngica superior a 4 unidades logarítmicas, no existiendo diferencia estadística entre ambos productos. El producto 2 (con ácido benzoico y etanol) mostró una actividad fungicida estadísticamente superior al producto 8 (con ácido benzoico) y 9 (ácido cítrico más ácido fórmico), cuya actividad fungicida fue muy reducida o nula. Ello, implica que la actividad fungicida frente a *C. albicans* del producto 2 viene determinada más por la presencia de alcohol que por el ácido benzoico. Aún así, el producto 2 no puede considerarse un producto fungicida.

Por otra parte, al realizar el ensayo frente a *A. niger* los resultados fueron similares a los obtenidos frente *C. albicans*, en el producto 7. En el producto 1 no se realizó el ensayo mediante impedanciometría, pero en los resultados obtenidos anteriormente se observó que a un 60% y 60 minutos era efectivo. Se observó adicionalmente, que los productos 8 y 9 aumentaron significativamente su eficacia, aunque no pueden ser clasificados como fungicidas. La mayor actividad observada del producto 8, probablemente es debida al mayor efecto del ácido benzoico sobre las esporas de *A. niger*, al contrario de lo observado frente *C. albicans*.

A las concentraciones ensayadas, aunque se debería ajustar las concentraciones de uso mínimas, los únicos productos que pudieran ser considerados eficaces como fungicidas según la norma 1650 son los productos 1 (con alcoholes) y el producto 7 (con tensioactivos y conservantes). En cualquier caso, su aplicación como lavavajillas con actividad fungicida no tiene utilización práctica, pues los tiempo de contacto son inferiores a los necesarios para inactivar

ambas cepas fúngicas, por lo que sólo podrían ser utilizados para inactivar el desarrollo fúngico en el estropajo utilizado.

Tabla 15. Evaluación de la actividad fungicida de los productos lavavajillas sobre *C. albicans*, aplicando la norma 1650 en condiciones sucias y utilizando técnicas de recuento en placa e impedanciometría.

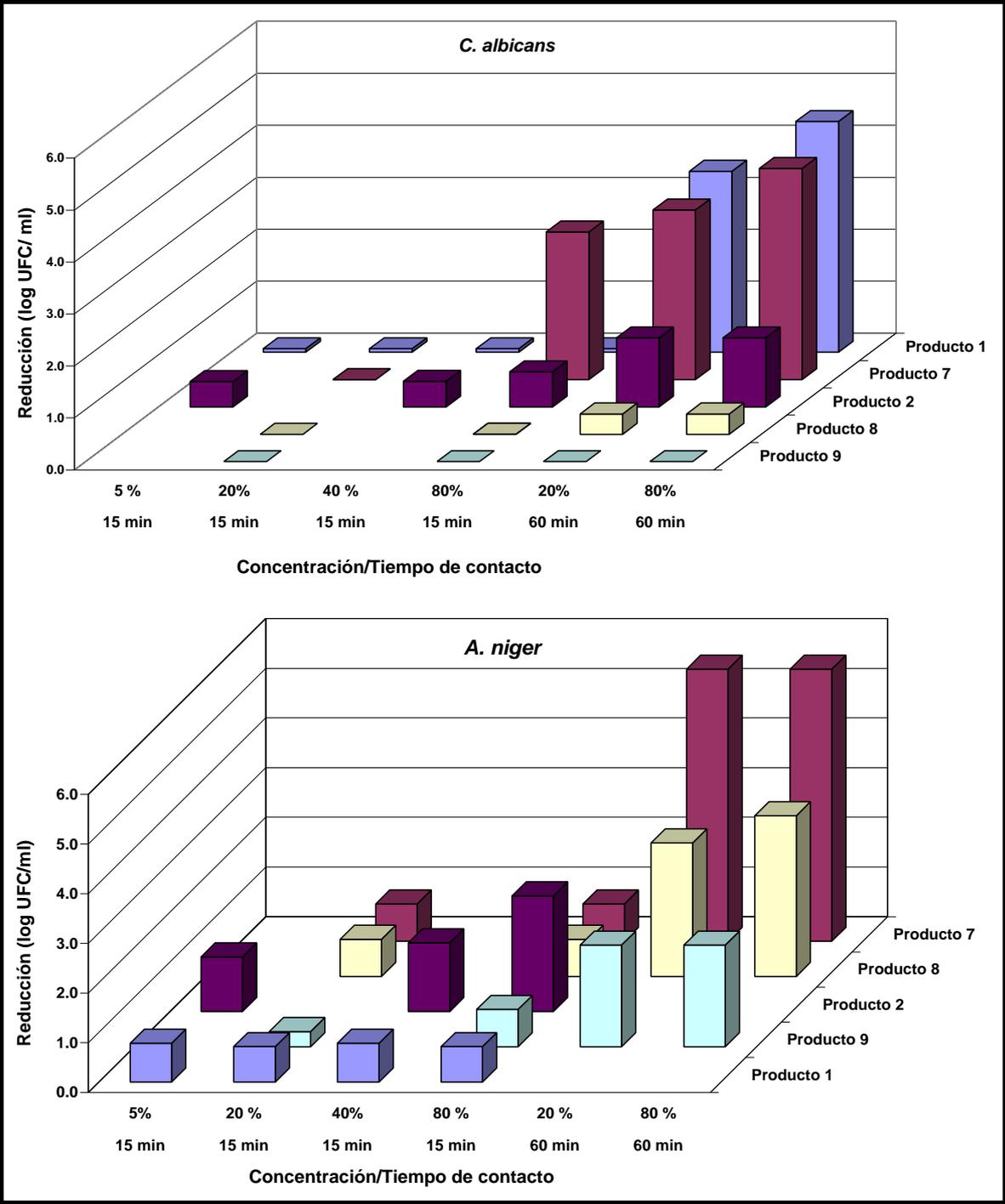
Producto	Principio Activo	Tiempo de contacto	Reducción		
			Concentración (log (UFC/ml) Placa	Reducción (log (UFC/ml) Impedancia	
1	Alcoholes	15	5	< 4	0.07
			40	< 4	0.07
			80	< 4	0.07
		60	20	< 4	3.48
			80	4.29	4.44
2	Ácido benzoico y etanol	15	5	< 4	0.49
			40	< 4	0.49
			80	< 4	0.68
		60	20	< 4	1.33
			80	< 4	1.33
7	Tensioactivos y conservantes	15	20	< 4	0.00
			80	< 4	2.84
		60	20	< 4	3.26
			80	6.33	4.07
8	Ácido benzoico	15	20	< 4	0.94
			80	< 4	0.00
		60	20	< 4	0.39
			80	< 4	0.39

		15	20	< 4	0.39
9	Ácido cítrico		80	< 4	0.39
			20	< 4	0.00
		60	80	< 4	0.00

Tabla 16. Evaluación de la actividad fungicida de los productos lavavajillas sobre *A. niger*, aplicando la norma 1650 en condiciones sucias y utilizando técnicas de recuento en placa e impedanciometría.

Producto	Principio Activo	Tiempo de contacto	Concentración	Reducción	Reducción
				(log (UFC/ml) Placa)	(log (UFC/ml) Bactometer)
1	Alcoholes	15	5	< 4	1.78
			40	< 4	1.67
			80	< 4	1.67
2	Ácido benzoico y etanol	15	5	< 4	1.10
			40	< 4	1.39
			80	< 4	2.33
7	Tensioactivos y conservantes	15	20	< 4	0.75
			80	< 4	0.75
		60	20	5.49	5.48
			80	5.49	5.48
8	Ácido benzoico	15	20	< 4	0.75
			80	< 4	0.75
		60	20	< 4	2.69
			80	< 4	3.24
9	Ácido cítrico	15	20	< 4	0.31
			80	< 4	0.75
		60	20	< 4	2.05
			80	< 4	2.05

Gráfica 5. Evaluación de la actividad fungicida de los productos lavavajillas sobre *C. albicans* y *A. niger*, aplicando la norma 1650 en condiciones sucias y utilizando técnicas de impedanciometría.



Respecto a los limpiadores generales del hogar, los resultados obtenidos del ensayo de la actividad fungicida valorado mediante impedanciometría y/o recuento en placa se muestran en las Tablas 17 y 18, y la Gráfica 6.

De las valoraciones que se realizaron se observó, coincidiendo con los resultados anteriormente obtenidos, que con diferencias estadísticamente significativas, el producto desinfectante comercial más efectivo sobre *C. albicans* y *A. niger* a la concentración (5%) y tiempo (15 minutos) más reducidos fue el producto 6 (con hipoclorito sódico). Por el contrario, el producto 11, presentó una eficacia nula tanto para *C. albicans* como para *A. niger* (Tabla 17 y 18).

La eficacia fungicida del producto 5 (con glutaraldehído) y el producto 10 (con cloruro de benzalconio) debe ser también considerada. Estos productos, productos mostraron ser eficaces tanto a los 15 como a los 60 minutos a una concentración igual o inferior a un 20% sobre *C. albicans* y a concentraciones de un 80% durante 15 minutos para *A. niger*. El producto 10 fue ser igualmente efectivo a una concentración del 20% durante 60 minutos sobre *A. niger*.

Otro producto comercial ensayado con cloruro de benzalconio fue el producto 3, que mostró una actividad fungicida estadísticamente inferior sobre *C. albicans* y *A. niger*, que el producto 8. Así, se observó que el producto 3 sólo fue efectivo frente a *C. albicans* a concentraciones del 50% durante 15 minutos, mientras que el producto 10 fue efectivo a un 20%. Igualmente a 60 minutos de contacto el producto 10 fue

efectivo a una concentración del 20%, que no se demostró con el producto 3, aunque la reducción fúngica fue importante. Estas diferencias, se reflejan igualmente frente *A. niger*, mostrando el producto 3 ser inefectivo a la concentración máxima del 80% durante 15 y 60 minutos, este último resultado deriva de los datos obtenidos en el estudio anterior. Estas diferencias probablemente vienen determinadas por la concentración de este amonio cuaternario en los productos ensayados.

Así, a las concentraciones y tiempos ensayados, entre los productos comerciales limpiadores generales del hogar, los que podrían ser considerados eficaces como fungicidas según la Norma 1650, son los productos 6 (con hipoclorito), el producto 5 (con glutaraldehído) y el producto 8 (con cloruro de benzalconio).

Tabla 17. Evaluación de la actividad fungicida de los productos limpiadores generales del hogar sobre *C. albicans*, aplicando la norma 1650 en condiciones sucias y utilizando técnicas de recuento en placa e impedanciometría.

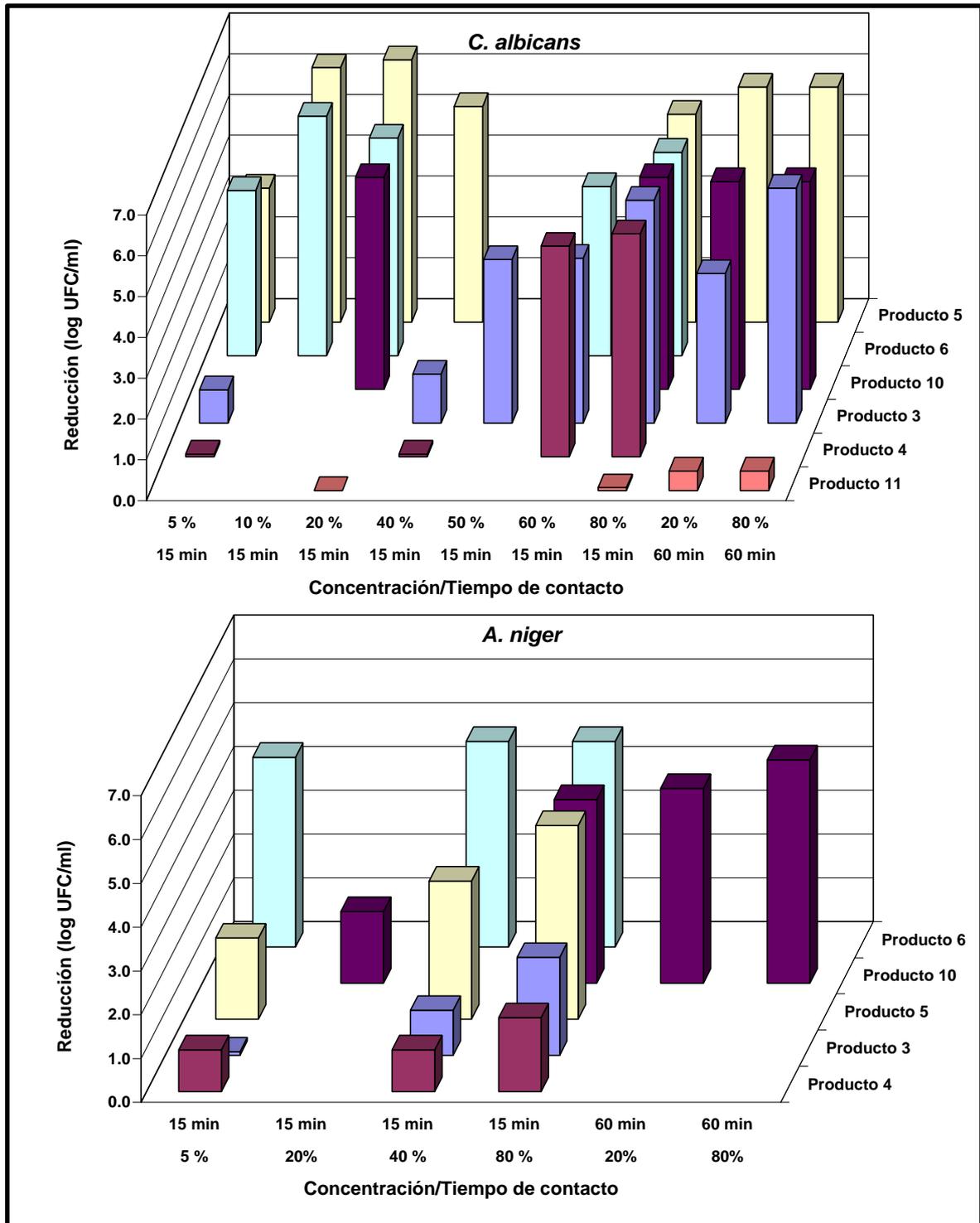
Producto	Principio Activo	Tiempo de contacto	Concentración	Reducción	Reducción
				(log (UFC/ml) Placa)	(log (UFC/ml) Impedancia)
3	Cloruro de benzalconio, ácido cítrico y etanol	15	5	< 4	0.82
			40	< 4	1.21
			50	6.11	4.01
			60	6.49	4.04
		60	80	4.36	5.47
			80	6.12	5.76
4	Peróxido de Hidrógeno	15	5	< 4	0.07
			40	< 4	0.07
			60	6.05	5.16
			80	5.83	5.47
5	Glutaraldehído	15	5	< 4	3.28
			10	4.67	6.24
			20	7.45	6.43
			40	5.60	5.28
		60	80	5.02	5.09
			80	6.60	5.76

6	Hipoclorito sódico	15	5	4.03	4.05
			10	5.37	5.87
			20	5.44	5.33
			40	4.29	4.15
			80	5.22	4.99
10	Cloruro de benzalconio	15	20	4.88	5.20
			80	5.92	5.20
		60	20	5.81	5.09
			80	5.81	5.09
11	Conservantes	15	20	3.34	0.00
			80	3.34	0.07
		60	20	3.82	0.48
			80	3.82	0.48

Tabla 18. Evaluación de la actividad fungicida de los productos limpiadores generales del hogar sobre *A. niger*, aplicando la norma 1650 en condiciones sucias y utilizando técnicas de recuento en placa e impedanciometría.

Produc- to	Principio Activo	Tiempo de contacto	Concentra- ción	Reducción (log (UFC/ml))	
				Placa	Bactometer
3	Cloruro de benzalconio, ácido cítrico y etanol	15	5	< 4	0.08
			40	< 4	1.03
			80	< 4	2.24
4	Peróxido de Hidrógeno	15	5	< 4	0.96
			40	< 4	0.96
			80	< 4	1.69
5	Glutaraldehído	15	5	< 4	1.85
			40	< 4	3.15
			80	4.10	4.42
6	Hipoclorito sódico	15	5	4.70	4.33
			40	4.70	4.69
			80	4.70	4.69
10	Cloruro de benzalconio	15	20	< 4	0.67
			80	4.19	4.18
		60	20	4.44	5.26
			80	5.10	5.78
11	Conservantes	15	20	< 4	ND
			80	< 4	ND
		60	20	< 4	ND
			80	< 4	ND

Gráfica 6. Evaluación de la actividad fungicida de los productos de limpieza del hogar sobre *C. albicans* y *A. niger*, aplicando la norma 1650 en condiciones sucias y utilizando técnicas de impedanciometría.



Los resultados obtenidos al realizar el ensayo de la actividad fungicida de los productos desinfectantes utilizados para el baño evaluados mediante impedanciometría y/o recuento en placa se presentan en las Tablas 19 y 20, y la Gráfica 7.

Se observó, que el producto que presentó una eficacia estadísticamente superior frente a *C. albicans* durante 15 minutos fue el producto 13 (con ácido fórmico, cítrico, salicílico, etanol e isopropanol), siendo efectivo como fungicida a un 80% de concentración. Sin embargo a los 60 minutos, la reducción obtenida a un 20% fue similar a la obtenida a los 15 minutos, por lo que en este caso el tiempo no aumenta la eficacia. Por el contrario, el producto 14 que contiene también ácido fórmico, cítrico y etanol no mostró en absoluto actividad fungicida sobre *C. albicans* a los 15 y 60 minutos.

El resto de productos (12, 15, 16, 17 y 18) presentaron una actividad fungicida sobre *C. albicans* durante 15 minutos muy reducida, no apreciándose diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Sin embargo, cuando el tiempo de contacto fue de 60 minutos, se observó un aumento estadísticamente significativo en la actividad del producto 18 (con tensioactivos), apreciándose que tanto a un 20 como a un 80% se produjo una disminución del recuento fúngico en más de cuatro unidades logarítmicas.

En los otros productos, cuya composición básica, era de ácido cítrico y alcohol, la actividad fungicida fue reducida, a excepción del producto 7 (con ácido

cítrico y alcohol-éter) que incrementó su actividad considerablemente a la concentración del 80%, pero la reducción fúngica fue inferior a las 4 unidades logarítmicas.

Con relación a la actividad fungicida sobre *A. niger* a un tiempo de contacto de 15 minutos, los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos sobre *C. albicans*, es decir, fue el producto 13, el que mostró capacidad de reducir 4 unidades logarítmicas a una concentración del 80%. A los sesenta minutos, a diferencia de lo observado con *C. albicans*, fue eficaz tanto a un 20 como a un 80%. Por otra parte, el producto 14 (que contenía también ácido fórmico y otros compuestos), que sobre *C. albicans* tenía un efecto casi nulo, sobre *A. niger* mostró una relativa actividad fungicida, especialmente a un 20 y 80% durante 60 minutos. Similares resultados se obtuvieron con el producto 18 (con tensioactivos).

El producto 12 (con butoxipropanol) también mostró actividad fúngica a las diferentes concentraciones y tiempos, pero la reducción fúngica obtenida fue inferior a las cuatro unidades logarítmicas. Finalmente, los productos que contenían en su composición ácido cítrico y etanol (producto 15, 16 y 17), fueron ineficaces sobre *A. niger*.

Así entre los productos desinfectantes para el baño, y las concentraciones ensayadas, sólo podría ser considerado con efecto fungicidas según la Norma 1650, el producto 13 motivado probablemente a la acción conjunta de sus componentes, tanto ácidos (fórmico, cítrico y salicílico) como alcoholes (etanol e isopropanol).

Tabla 19. Evaluación de la actividad fungicida de los productos desinfectantes para el baño sobre *C. albicans*, aplicando la norma 1650 en condiciones sucias y utilizando técnicas de recuento en placa e impedanciometría.

Producto	Principio Activo	Tiempo de contacto	Concentración	Reducción	Reducción
				(log (UFC/ml) Placa	(log (UFC/ml) Bactometer
12	2-n-butoxipropanol	15	20	< 4	0.00
			80	< 4	1.34
		60	20	< 4	1.80
			80	< 4	1.80
13	Ácido fórmico, ácido cítrico, ácido salicílico, etanol e isopropanol	15	20	< 4	2.55
			80	4.28	5.20
		60	20	< 4	2.55
			80	5.60	5.69
14	Ácido cítrico, fórmico y etanol	15	20	< 4	0.10
			80	< 4	0.10
		60	20	< 4	0.63
			80	< 4	0.02
15	Ácido cítrico y etanol	15	20	< 4	1.76
			80	< 4	0.62
		60	20	< 4	0.06
			80	< 4	0.21

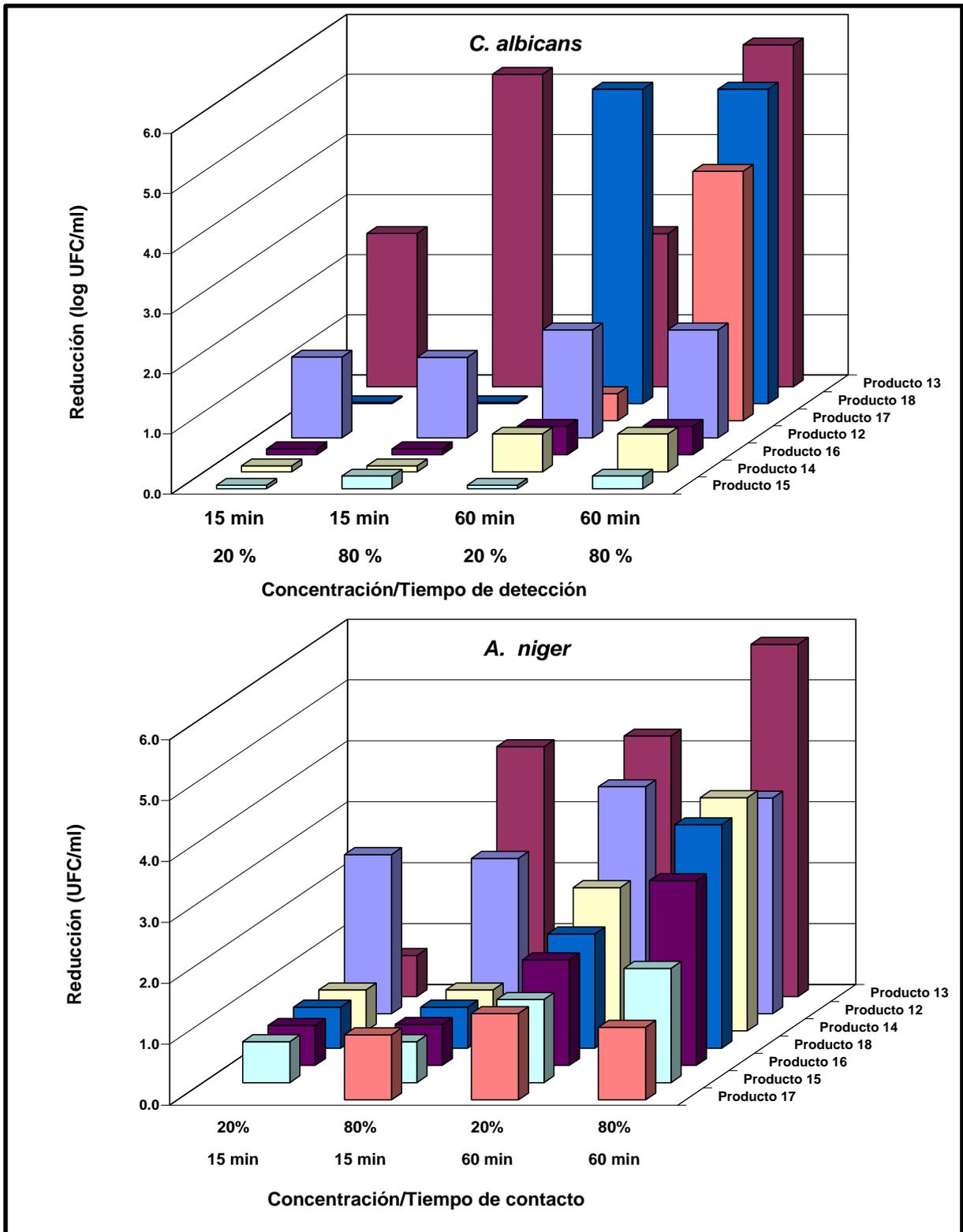
16	Ácido cítrico	15	20	< 4	1.78
			80	< 4	0.02
	más etanol	60	20	< 4	0.47
			80	< 4	0.47
17	Ácido cítrico y	15	20	< 4	ND
			80	< 4	ND
	alcohol-eter	60	20	< 4	0.45
			80	4.29	4.15
18	Tensioactivos	15	20	< 4	0.02
			80	< 4	0.02
		60	20	5.08	5.24
			80	5.95	5.24

Tabla 20. Evaluación de la actividad fungicida de los productos desinfectantes para el baño sobre *A. niger*, aplicando la norma 1650 en condiciones sucias y utilizando técnicas de recuento en placa e impedanciometría.

Producto	Principio Activo	Tiempo de contacto	Concentración	Reducción	Reducción
				(log (UFC/ml) Placa	(log (UFC/ml) Bactometer
12	2-n-butoxiopropanol	15	20	< 4	2.61
			80	< 4	2.55
		60	20	< 4	3.73
			80	< 4	3.73
13	Ácido fórmico, ácido cítrico, ácido salicílico, etanol e isopropanol	15	20	< 4	0.67
			80	4.11	4.10
		60	20	5.25	4.28
			80	5.80	5.78
14	Ácido cítrico, fórmico y etanol	15	20	< 4	0.67
			80	< 4	0.67
		60	20	< 4	2.36
			80	< 4	3.83
15	Ácido cítrico y etanol	15	20	< 4	0.67
			80	< 4	0.67
		60	20	< 4	1.37
			80	< 4	1.88

16	Ácido cítrico más etanol	15	20	< 4	0.66
			80	< 4	0.67
	60	20	< 4	1.74	
		80	< 4	3.04	
17	Ácido cítrico y alcohol-eter	15	20	< 4	1.07
			80	< 4	ND
	60	20	< 4	1.42	
		80	< 4	1.19	
18	Tensioactivos	15	20	< 4	0.67
			80	< 4	0.67
	60	20	< 4	1.88	
		80	< 4	3.67	

Gráfica 7. Evaluación de la actividad fungicida de los productos desinfectantes para el baño sobre *C. albicans* y *A. niger*, aplicando la norma 1650 en condiciones sucias y utilizando técnicas de recuento en placa e impedanciometría.



Finalmente, los resultados obtenidos al realizar el ensayo de la actividad fungicida de los productos desinfectantes utilizados para el lavado de la ropa mediante impedanciometría y/o recuento en placa se presentan en las Tablas 21 y 22, y la Gráfica 8.

Sólo se valoraron dos productos, y entre ellos el que presentó una actividad estadísticamente superior fue el producto 19 (con peróxido de hidrógeno y alcohol) mostrando una reducción superior a 4 unidades logarítmicas sobre *C. albicans* y *A. niger* a una concentración del 80% durante 15 y 60 minutos, sin embargo a una concentración del 20% durante 60 minutos, aunque aumenta su actividad fungicida considerablemente, la reducción que produce es inferior a la considerada efectiva. Sin embargo, el producto 20 (con perborato) sólo mostró efectividad sobre *C. albicans* a la concentración máxima del 80%, 60 minutos al realizar el ensayo a una temperatura de 40°C.

Tabla 21. Evaluación de la actividad fungicida de los productos desinfectantes para la ropa sobre *C. albicans*, aplicando la norma 1650 en condiciones sucias y utilizando técnicas de recuento en placa e impedanciometría.

Producto	Principio Activo	Tiempo de contacto	Concentración	Reducción	Reducción
				(log (UFC/ml) Placa)	(log (UFC/ml) Bactometer)
19	Peróxido de hidrógeno y etanol	15	20	< 4	0.47
			80	5.33	5.22
		60	20	< 4	1.78
			80	6.71	5.69

20	Perborato	15	20	< 4	ND
			80	< 4	ND
		60	20	3.85	0.75
			80	3.85	1.90
		60 (40°C)	20	3.85	1.49
			80	4.26	5.09

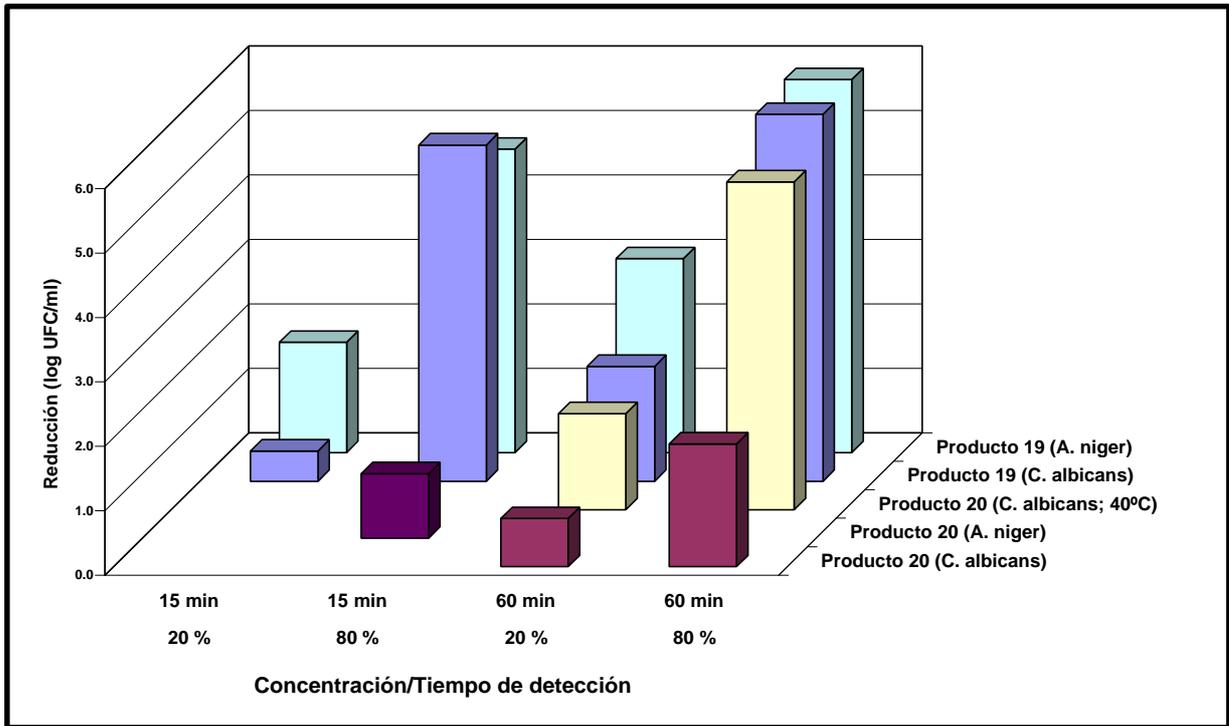
ND: No determinado

Tabla 22. Evaluación de la actividad fungicida de los productos desinfectantes para la ropa sobre *A. niger*, aplicando la norma 1650 en condiciones sucias y utilizando técnicas de recuento en placa e impedanciometría.

Producto	Principio Activo	Tiempo de contacto	Concentración	Reducción	Reducción
				(log (UFC/ml) Placa)	(log (UFC/ml) Bactometer)
19	Peróxido de hidrógeno y etanol	15	20	< 4	1.31
			80	4.71	5.48
		60	20	< 4	3.18
			80	5.79	5.48
20	Perborato	15	20	< 4	ND
			80	< 4	1.00
		60	20	< 4	ND
			80	< 4	ND

ND: No determinado

Gráfica 8. Evaluación de la actividad fungicida de los productos desinfectantes para la ropa sobre *C. albicans* y *A. niger*, aplicando la norma 1650 en condiciones sucias y utilizando técnicas de impedanciometría.



De los resultados obtenidos, se puede concluir que para determinar la concentración mínima inhibitoria de diferentes formulaciones químicas desinfectantes, el ensayo previo o screening a las dos concentraciones de 20 y 80% y dos tiempos es un método efectivo que facilitará posteriormente ajustar la concentración de uso aconsejable. Este sistema permite la evaluación de diferentes formulaciones o diferentes productos comerciales desinfectantes para un determinado uso, que asociado a un sistema de recuento de impedanciometría

permite la comparación de una gran cantidad de productos de una forma rápida y sencilla.

Además se debe considerar, que aunque estos instrumentos de determinación impedanciométrica tienen un coste inicial elevado derivado de su compra, el coste final del ensayo respecto a la técnica convencional es menor, sobre todo si se tiene en cuenta el coste adicional de los medios cultivo y el trabajo del personal asociado a la preparación de los medios, la siembra y el recuento final (Russell, 2000).

Finalmente y de acuerdo con las conclusiones del trabajo de Gibson y col. (1995), en la evaluación de la actividad desinfectante mediante recuento en placa no permite medir el estrés microbiano. Utilizando técnicas impedanciométricas, es posible determinar las células lesionadas, puesto que si se obtuviesen tiempos de detección por encima de las 32 horas para *C. albicans* y de 50 horas para *A. niger* sería indicativo de que el desinfectante lesiona las cepas fúngicas, siendo su crecimiento más lento. Sin embargo, con los métodos de recuento en placa no se puede evaluar porque sólo es posible determinar si hay o no crecimiento.

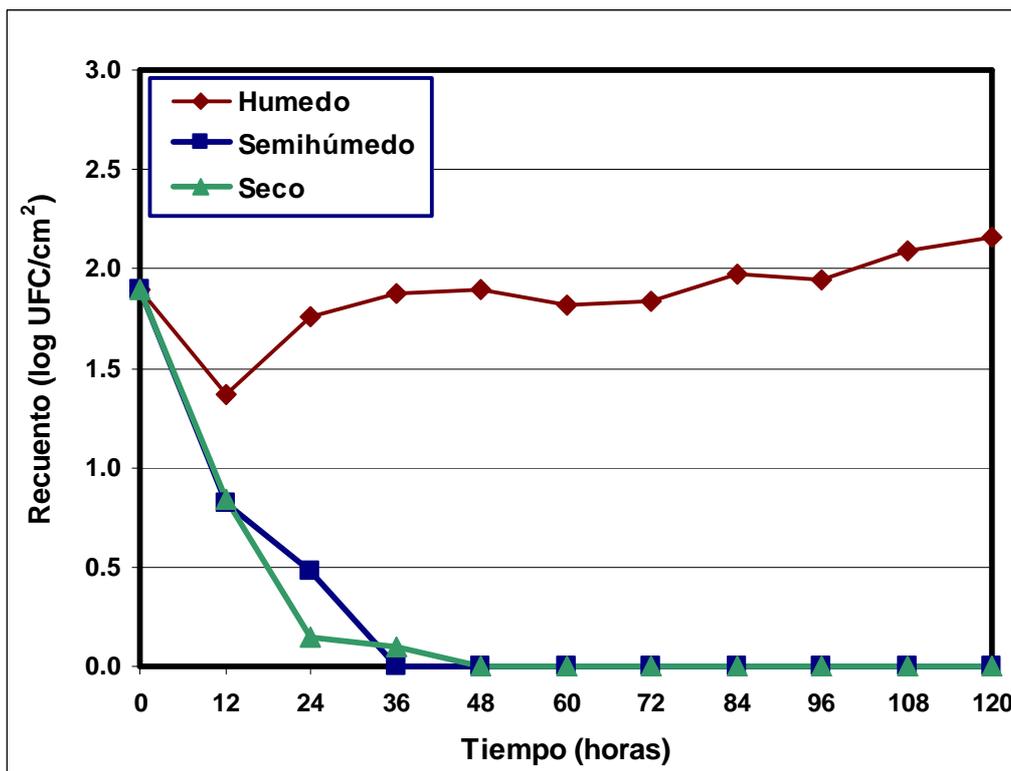
4.3 EFECTO DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES EN LA VIABILIDAD DE LAS CEPAS FÚNGICAS EN SUPERFICIES

4.3.1. Evaluación de la viabilidad en función de la cepa fúngica

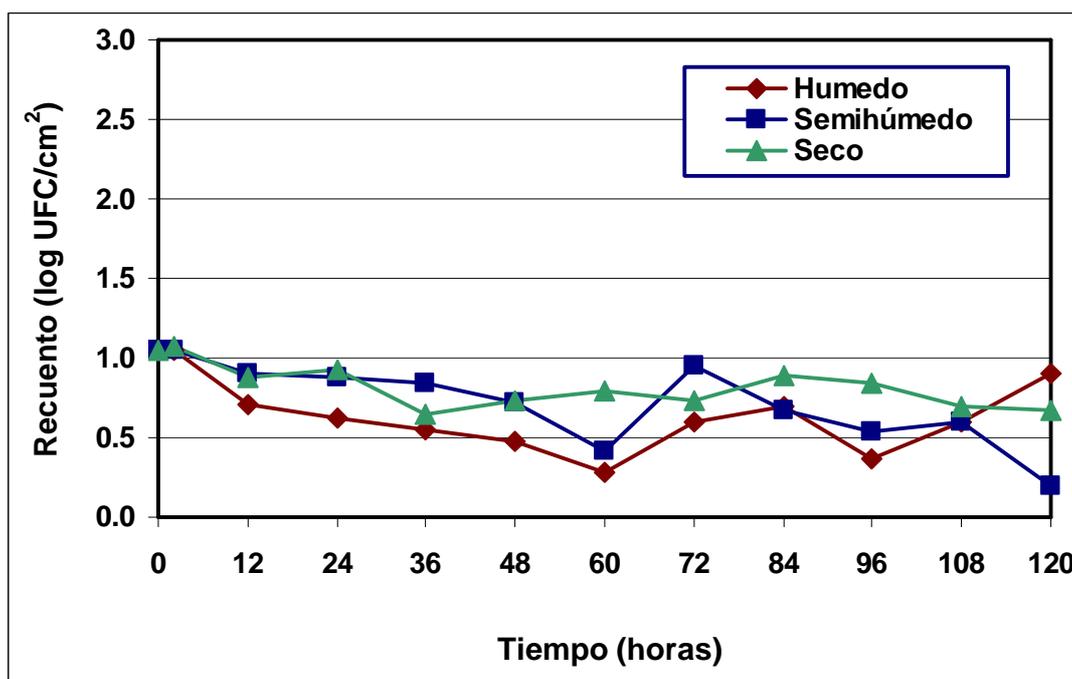
Los resultados obtenidos al realizar el ensayo de la evaluación del efecto de las condiciones ambientales, húmedo, semihúmedo y seco, durante 120 horas de las cepas fúngicas *C. albicans* y *A. niger* inoculadas en un tela 100% algodón y valorada mediante la técnica de recuento en placa se presentan en las gráfica 9 y 10.

Se observó que las condiciones ambientales afectan de forma diferente a las levaduras (*C. albicans*) que a las esporas de *A. niger*, mostrando las esporas de los mohos una mayor resistencia. Así, al evaluar el efecto de las condiciones ambientales en función de la cepa y el tiempo, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) cuando las telas se mantuvieron en condiciones húmedas, sin embargo, la disminución de las humedad afectó considerablemente a la viabilidad de las levaduras, apreciándose diferencias estadísticamente significativas entre *C. albicans* y *A. niger* tanto en condiciones de semihumedad como en condiciones secas (Gráfica 9 y 10).

Gráfica 9. Evolución de la supervivencia y desarrollo de *C. albicans* en diferentes condiciones ambientales.



Gráfica 10. Evolución de la supervivencia y desarrollo de *A. niger* en diferentes condiciones ambientales.



4.3.2. Efecto de las condiciones ambientales sobre *C. albicans*

En la Tabla 23 y gráfica 9 se muestran los resultados obtenidos en relación a la viabilidad de *C. albicans* en función de las condiciones ambientales. En los resultados obtenidos se observó que las condiciones ambientales tienen una influencia importante en la supervivencia y desarrollo de *C. albicans*. Así, al valorar el efecto de las condiciones ambientales en función del tiempo se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia y desarrollo de *C.*

albicans en condiciones húmedas respecto a las de semihumedad y sequedad. Cuando la humedad disminuye de forma importante, estas diferencias desaparecen, no apreciándose diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones de sequedad y semihumedad.

Concretamente, *C. albicans* en condiciones húmedas presentó una supervivencia constante durante las 120 horas de estudio, apreciándose un ligero incremento en el recuento a partir de las 108 horas. Aunque a las 12 horas se apreció una cierta disminución, ésta no fue estadísticamente significativa (Tabla 23 y Gráfica 9). Esa ligera disminución probablemente vino determinada por la adaptación de las células a unas condiciones de crecimiento en una superficie más desfavorables que las presentes en un medio de cultivo convencional, produciéndose un cierto agotamiento de los nutrientes aportados únicamente del medio de cultivo Sabouraud del inóculo inicial. Posteriormente, tras el proceso de adaptación, y con la escasez de nutrientes el mantenimiento del recuento de *C. albicans* se produjo probablemente como consecuencia del aprovechamiento de los restos derivados de la muerte celular que pueden ser utilizados por las levaduras que sobreviven como fuente de energía, coincidiendo con las observaciones realizadas por otros autores como Zobell en 1943 (Zottola, 1994).

Sin embargo, en condiciones de semihumedad se observó que a las 12 horas se produjo una disminución importante estadísticamente significativa en el recuento, que se mantuvo hasta las 24 horas hasta disminuir totalmente a las 36

horas (Tabla 23). Esta disminución en el recuento se apreció igualmente en condiciones de sequedad, aunque la disminución más importante y estadísticamente significativa se produjo a partir de las 12 horas (Tabla23).

Tabla 23. Evolución del recuento de *C. albicans* (log UFC/cm²) bajo diferentes condiciones ambientales.

Tiempo (horas)	Húmedo^A	Semihúmedo^B	Seco^B
0	1.89 ± 0.33 ^{ab}	1.89 ± 0.33 ^a	1.89 ± 0.33 ^a
12	1.37 ± 0.52 ^b	0.82 ± 0.81 ^b	0.84 ± 0.73 ^b
24	1.75 ± 0.19 ^{ab}	0.48 ± 0.67 ^b	0.15 ± 0.21 ^c
36	1.88 ± 0.16 ^{ab}	0.00 ± 0.00 ^c	0.10 ± 0.17 ^c
48	1.90 ± 0.05 ^{ab}	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^c
60	1.82 ± 0.06 ^{ab}	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^c
72	1.84 ± 0.07 ^{ab}	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^c
84	1.97 ± 0.31 ^{ab}	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^c
96	1.95 ± 0.33 ^{ab}	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^c
108	2.09 ± 0.30 ^{ab}	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^c
120	2.16 ± 0.63 ^{ab}	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^c

A-B: la misma letra en la misma fila significa que no existían diferencias significativas ($p < 0,05$)

a-c: la misma letra en la misma columna significa que no existían diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.3.3. Efecto de las condiciones ambientales sobre *A. niger*

En la Tabla y gráfica 24 se muestran los resultados obtenidos en relación a la viabilidad de las esporas de *A. niger* en función de las condiciones ambientales. En estos resultados la variabilidad obtenida fue muy elevada. Se apreció, que al contrario de lo observado con *C. albicans*, las condiciones ambientales no influían en la supervivencia y desarrollo de las esporas de *A. niger*, no observándose diferencias estadísticamente significativas en el recuento. En función del tiempo, tampoco se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en la evolución de los recuentos cuando las condiciones ambientales eran húmedas, semihúmedas o secas. Ello implica que independientemente de las condiciones ambientales, la resistencia y supervivencia de las esporas de *A. niger*, es muy elevada independientemente del grado de humedad ambiental existente.

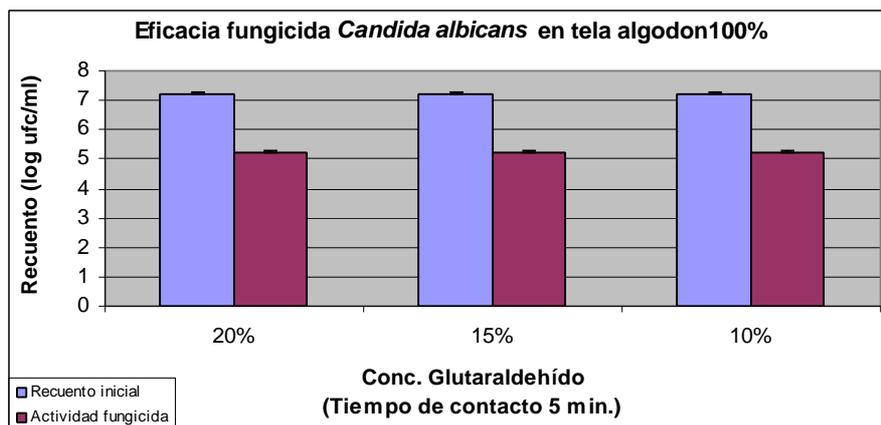
Tabla 24. Evolución del recuento de *A. niger* (log UFC/cm²) bajo diferentes condiciones ambientales.

Tiempo (horas)	Húmedo	Semihúmedo	Seco
0	1.05 ± 0.30	1.05 ± 0.30	1.05 ± 0.30
2	-	-	1.07 ± 0.30
12	0.70 ± 0.35	0.90 ± 0.00	0.88 ± 0.03
24	0.63 ± 0.13	0.88 ± 0.03	0.93 ± 0.10
36	0.55 ± 0.13	0.84 ± 0.20	0.65 ± 0.37
48	0.48	0.72 ± 0.10	0.73 ± 0.23
60	0.28 ± 0.49	0.42 ± 0.10	0.79 ± 0.28
72	0.60 ± 0.00	0.95 ± 0.08	0.73 ± 0.15
84	0.70	0.67 ± 0.33	0.88 ± 0.26
96	0.37 ± 0.64	0.53 ± 0.40	0.84 ± 0.28
108	0.60 ± 0.52	0.59 ± 0.51	0.69 ± 0.44
120	0.90 ± 0.00	0.20 ± 0.35	0.67 ± 0.52

4.4. ENSAYO CON TELA

A diferencia de la actividad fungicida del glutaraldehído en los ensayos en suspensión con relación a los ensayos con tela se observó una aparente mayor reducción logarítmica en las mismas condiciones: concentración, temperatura y tiempo de contacto (Grafico 11).

Grafico 11. Resultado del ensayo en tela con el producto cuyo principio activo es el glutaraldehído.



Se podría pensar que al momento de la neutralización no alcanza a todo el desinfectante que se encuentra embebido en las fibras de tela y como los microorganismos se adhieren a ella mantienen durante mas tiempo el contacto con los microorganismos, por lo que seria interesante que en lugar de neutralizar químicamente se empleara la dilución - neutralización por filtración con agua destilada estéril.

O el método de Koller y Wewalka, 1982 que para evaluar la eficacia desinfectante en el proceso de lavandería . Coloco piezas de tela contaminadas entre 2 filtros de membrana, por lo que se permitía el paso del detergente y desinfectante, pero reteniendo a los microorganismos, con lo cual el recuento de los microorganismos es más exacto.

Fotografía 3. *C. albicans* adheridas a las fibras de algodón de la tela

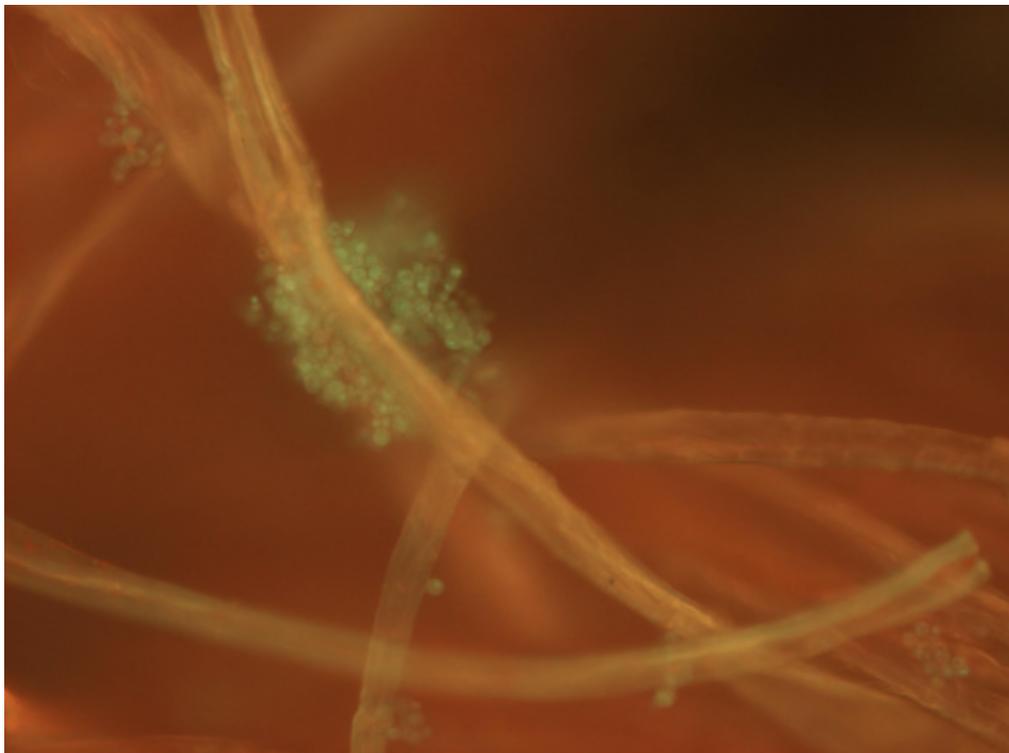


Tabla 25. Evaluación de la actividad fúngica de los productos desinfectantes sobre *C. albicans* en tela de algodón aplicando las normas 1275 y 1650 utilizando técnicas de recuento en placa

Produc- to	Principio Activo	Norma	Tiempo de Contacto		Reducción (log (UFC/ml)	Recuento
						inicial (log UFC/ml)
1	Alcoholes (LV)	1275	60	20	<4	7.30
			60	30	<4	7.30
			60	40	5.45	7.45
			60	50	5.45	7.45
		1650	60	50	<4	7.46
			60	60	< 4	7.46
2	Ácido benzoico y etanol (LV)	1275	60	70	<4	7.45
			60	80	< 4	7.45
3	Cloruro de benzalconio, ácido cítrico y etanol (LH)	1275	5	0,5	<4	7.25
			5	1	<4	7.25
			5	10	<4	7.25
			5	20	<4	7.25
			5	30	5.45	7.45
			5	40	5.45	7.45

		1650	15	60	<4	7.46
			15	70	< 4	7.46
			5	10	<4	7.27
			5	15	<4	7.27
5	Glutaraldehído (LH)	1275	5	20	4.07	7.27
			5	30	4.67	7.27
			5	40	5.27	7.27
		1650	15	60	5.46	7.46
			15	70	5.46	7.46
6	Hipoclorito Sódico (LH)	1275	5	0.01	<4	7.22
			5	0.02	<4	7.22
			5	0.04	<4	7.22
			5	0.1	< 4	7.25
			5	0.2	<4	7.25
		1650	5	0.4	<4	7.25
			5	0.5	5.45	7.45
			5	1	5.27	7.27
			15	5	5.46	7.46
			15	10	5.46	7.46

LV: Productos desinfectantes lavavajillas.

LH: Productos desinfectantes limpiadores del hogar

4.5.DISCUSIÓN

Cada vez alcanza mayor importancia la disminución en el empleo de aditivos a todos los niveles, especialmente de los conservantes, debido a un rechazo generalizado por parte de los consumidores (Taylor y col., 1999). Para prevenir la aparición de toxiinfecciones alimentarias se impone la aplicación de unos programas correctos de APPCC, especialmente, el empleo de sustancias limpiadoras y desinfectantes eficaces. La desinfección es la etapa final del programa de higienización, diseñado para eliminar los residuos macroscópicos y los cuerpos extraños y reducir el nivel de microorganismos para asegurar la seguridad y calidad de los alimentos (Holah, 1995a). Estos principios están recogidos como pre-requisitos en los programas de APPCC.

Normalmente se realiza un esfuerzo especial en la actividad desinfectante, pero poco se incide en la valoración de la eficacia fungicida. Si consideramos a los mohos y levaduras como microorganismos potencialmente patógenos, con implicaciones directas sobre la salud de los consumidores, podremos comprender la necesidad de incrementar los controles para evaluar la presencia de estos organismos y la capacidad potencial para asegurar su eliminación (Bundgaard-Nielsen y Nielsen, 1996).

Respecto a los mohos y levaduras, el comité técnico Europeo CEN/TC216/WG ha desarrollado pruebas (bactericidas y fungicidas) específicas para alimentos, industrias y mercados domésticos, siendo necesario que los

desinfectantes para la higiene de las industrias alimentarias contengan compuestos con actividad fungicida. Sin embargo, los datos de resistencia de mohos y levaduras a los tratamientos con desinfectantes son limitados, así como los datos en cuanto a la resistencia cruzada a las diversas familias de desinfectantes y entre especies de mohos y levaduras (Bundgaard-Nielsen y Nielsen, 1996).

4.5.1. Valoración de la actividad fungicida

Uno de los inconvenientes para poder tener un adecuado control de los mohos y de las levaduras en los alimentos y en las superficies es el elevado tiempo necesario para su detección con los protocolos de rutina, siendo un parámetro esencial en los programas de control microbiológicos (Taniwaki y col., 2001). Para ello, y según estos mismos autores, se necesitan métodos rápidos y simples para la detección y recuento sin comprometer la sensibilidad y eficacia.

En la Unión Europea existen unos doscientos cincuenta productos químicos de limpieza, de los cuales, aproximadamente cien, son utilizados como desinfectantes. Debido a sus propiedades físicas y químicas su acción no es lo suficientemente amplia para eliminar a todos los microorganismos, se hace necesario un empleo de diferentes sustancias o una rotación de las mismas (Jeffrey, 1995). Entre los requisitos exigibles para la inscripción en el registro oficial de plaguicidas de la Dirección General de Salud Pública, es necesario que

figure la eficacia del formulado frente a las plagas que se desean combatir, haciendo referencia en los productos desinfectantes si tienen actividad bactericida o fungicida. En la valoración de la actividad fungicida se debe explicitar que norma cumple (UNE 1275 o UNE 1650), la concentración de máxima eficacia y el tiempo de contacto (Anónimo, 1997; Anónimo, 1998b).

Como se puede apreciar en nuestros resultados, la aplicación de una u otra norma lleva a grandes diferencias entre los resultados de eficacia obtenidos. Al mismo tiempo, se ha puesto de manifiesto que la actividad antifúngica de muchos de los desinfectantes utilizados actualmente es relativamente baja, ya que no llegan a superar la norma EN 1275 (norma básica de evaluación en condiciones limpias). Por ejemplo, el ácido benzoico no actuó ni en *Candida albicans* ni en *Aspergillus niger*, a la máxima concentración (80%) y tiempo de contacto empleado (60 minutos); así como en *Aspergillus niger* no actuaron los alcoholes. Esta norma se ha establecido como el mínimo que ha de cumplir un producto fungicida para ser considerado como tal. Con menor razón la norma EN 1650 para condiciones sucias. Siguiendo esta norma no actuaron el ácido benzoico en *Candida albicans* ni en *Aspergillus niger*, además en *Aspergillus niger* tampoco actuaron los alcoholes, el cloruro de benzalconio, ni el peróxido de hidrogeno.

No obstante, estas normas se basan en pruebas de suspensión, un sistema de análisis en el que no se dan las condiciones habituales de uso. Debido a ello, y a la necesidad de comprobar la eficacia de estas sustancias, ha surgido la necesidad de establecer pruebas a los productos para constatar su eficacia real e

incorporar los desinfectantes a la higienización, así como seleccionar las concentraciones adecuadas que se deberán utilizar, lo cual no es fácil de determinar (Bruins y Dyer, 1995).

Un gran número de sustancias han sido ampliamente utilizadas como desinfectantes antes de valorar su eficacia mediante ensayos científicos para validar su eficacia (King, 1995). Aunque muchas de estas sustancias poseen actividad bactericida, por extensión, se ha entendido que pueden ser empleadas para destruir cualquier microorganismo. Nuestros resultados indican, sin embargo, que salvo el hipoclorito sódico y el glutaraldehído, ningún desinfectante de los estudiados posee una actividad general.

Uno de los elementos que hay que someter a discusión es, indudablemente, las técnicas empleadas para comprobar la eficacia de los desinfectantes. En nuestro estudio se han empleado las condiciones señaladas en la norma. Sin embargo, Sheldon y Brake (1991) señalaron que se obtienen resultados mejores cuando la incubación se realiza a 37°C. Nuestros datos son contrarios a estos autores, ya que a estas temperaturas es necesario un elevado tiempo de incubación, lo que hace que los microorganismos no se encuentren en las mejores condiciones posibles, con recuentos muy inferiores a los deseables. Si se incrementa la temperatura podría ocurrir que el recuento fuese inferior por un insuficiente desarrollo celular.

En cualquier caso, lo que sí es imprescindible es el seleccionar de forma adecuada los productos a emplear si se desea conseguir una buena higienización de las superficies. Es decir, un efectivo programa de limpieza y desinfección en la industria es vital, debiendo abarcar a los siguientes microorganismos: *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., *E. coli*, *Staphylococcus* spp. y *Aspergillus* spp. (Samberg y Meroz, 1995). Desgraciadamente, con el empleo de los productos desinfectantes estudiados, esta acción y este objetivo no se llega a alcanzar, ya que sólo el hipoclorito y glutaraldehído pueden conseguir este objetivo.

Por otra parte, los datos en la bibliografía relativos a la acción fungicida de diferentes desinfectantes dependen, como es lógico, del tipo de producto. Uno de los desinfectantes más empleados es el peróxido de hidrógeno. Sin embargo nuestros datos coinciden con los de Sheldon y Brake (1991), ya que es una sustancia que no ha manifestado una actividad excesivamente importante, no presentando actividad cuando la concentración disminuye. Esta resistencia puede deberse a la cubierta que la rodea (Foegeding, 1985), aunque no hay que descartar que se trata de células eucariotas, con una elevada concentración de catalasas en su protoplasma, lo que puede degradar rápidamente el principio activo, eliminando su actividad.

Curiosamente, un desinfectante no demasiado empleado como fungicida es el amonio cuaternario. Este producto ha sido considerado como particularmente efectivo para Mohos y Levaduras (Salvat y Colín, 1995). Nuestros resultados son

coincidentes con estos autores, aunque especialmente contra *Candida albicans* en el ensayo de ambas normas y en esporas de *Aspergillus niger* con la norma 1275.

Otros desinfectantes empleados en muchas ocasiones como antiséptico han sido los alcoholes en diferentes formas. La presencia de agua es esencial para que el alcohol sea efectivo para desnaturalizar las proteínas. El incremento en la resistencia puede ser causado por una disminución en la actividad interna del agua o una mayor estabilidad de la membrana (Bundgaard-Nielsen Y Nielsen, 1996). Nuestros datos son coincidentes, en cuanto a que presentan una actividad suficiente contra los mohos y levaduras. Aunque no contra las esporas.

En cualquier caso, e independientemente del desinfectante empleado, es necesario un tiempo de contacto suficiente para asegurar la desinfección. Por lo general los desinfectantes se formulan para que actúen en un mínimo de 5 minutos y así lograr reducir la población bacteriana en 5 logaritmos (Holah, 1995 b). Para los mohos y las levaduras, todas las normas internacionales indican que la reducción mínima tendrá que ser de 4 logaritmos. Nuestros datos nos indican que para estos hongos será necesario incrementar los tiempos, hasta 60 minutos, dependiendo del producto a emplear; lo que normalmente lo hace incompatible con la filosofía de emplear productos baratos en el menor tiempo posible. A excepción del hipoclorito sódico con el inconveniente de ser corrosivo.

Por otra parte, el uso de un solo desinfectante no es suficiente si queremos evitar resistencia a los compuestos activos. Por lo que se sugiere un plan de higienización rotativo de por lo menos dos productos para mantener el control de las contaminaciones de hongos (Bundgaard-Nielsen Y Nielsen, 1996). El problema que quizás nos vamos a encontrar es el de localizar dos productos diferentes con el suficiente espectro de acción.

4.5.2. Aplicación de técnicas de impedanciometría en la evaluación de la actividad fungicida.

Los métodos eléctricos para la detección de microorganismos son técnicas originalmente diseñadas para una rápida detección y cuantificación de microorganismos (Duran y Marshall, 2002). Se basan en determinar el recuento durante la fase de multiplicación, donde las grandes moléculas, como los hidratos de carbono, se convierten en metabolitos más pequeños, con carga iónica, y cambian las propiedades eléctricas del medio (Edmiston y Russell, 1998). Estos metabolitos se producen durante el crecimiento microbiano, donde se incrementa la conductancia y se reduce la impedancia del medio de cultivo (Bundgaard-Nielsen y Nielsen, 1996; Edmiston y Russell, 1998).

El tiempo que se requiere para lograr este cambio exponencial es conocido como Tiempo de Detección (DT) y es una función del recuento (ufc/ml) en las muestras (Edmiston y Russell, 1998). Así que el cambio eléctrico puede ser

correlacionado, de forma indirectamente proporcional, con él número de microorganismos (Firstenberg-Eden, 1983).

De cualquier manera, la gran ventaja de utilizar métodos rápidos, comparado con los tradicionales, es el obtener el resultado en horas y no en días lo que permite evaluar productos con capacidad para estimular o disminuir la capacidad de crecimiento de los microorganismos, lo que permite incrementar la capacidad de análisis con poco esfuerzo en tiempo y dinero (Russell, 2000).

Es por ello que las técnicas impedanciométricas nos permiten la evaluación rápida de los diferentes productos desinfectantes y sus agentes activos (Cordier y col., 1989). Además son alternativas simples y rápidas (6 minutos) para determinar la concentración de una solución desinfectante con un alto nivel de certeza ($P < 0,0002$) (Holan y col., 1990). Ahorrando tiempo cuando se requiera el análisis de múltiples muestras (Dhaliwal y col. , 1992).

La ventaja de las técnicas impedanciométricas es que no importa que los microorganismos estén en suspensión o adheridos a la superficie, mientras estén vivos ellos pueden cambiar las propiedades eléctricas del medio de incubación (Gibson y col. , 1995). Esto hace a la técnica particularmente adecuada a pruebas de desinfectantes en superficie, ya que no es necesario separar los organismos de la superficie de prueba para su cuantificación, esto deja el biofilm, o adherencia superficial, en el mismo estado morfológico y no los enfrenta a un

estrés por separación, por lo que no influirá negativamente en la eficacia del desinfectante, más bien todo lo contrario (Gibson y col. , 1995).

La determinación del recuento mediante técnicas impedanciométricas tiene la ventaja respecto a lo que se especifica en las diferentes normas, en las que el recuento se realiza mediante recuento en placa, que permite la valoración directa, sin diluciones, de la reducción fúngica real. Otra ventaja adicional e importante, al utilizar la metodología rápida de impedanciometría es el tiempo en el cual se obtienen los resultados. Mediante, la técnica de recuento en placa el tiempo de incubación en el caso de *C. albicans* es de 24 horas en una primera lectura y de confirmación a las 48 horas y para *A. niger* la primera lectura es a las 48 horas, realizándose lecturas de confirmación hasta las 96 horas. Sin embargo, mediante impedanciometría el tiempo necesario de confirmación de la actividad fungicida es de 31-32 horas para *C. albicans* y de 49-50 horas para *A. niger*. Tiempos de detección inferiores serían indicativos de la ineficacia de los productos químicos ensayados, de forma que en ocasiones sería posible obtener resultados de esta ineficacia en menos de 24 horas.

Adicionalmente, se debe considerar que en la determinación de la actividad fungicida de una producto químico, es importante la valoración de la concentración mínima inhibitoria, es decir, la concentración mínima del producto que tiene actividad frente a las cepas fúngicas de ensayo. Ello implica que se deben ensayar

un abanico de concentraciones hasta determinar cual es esta concentración óptima a un tiempo determinado. Es por ello que previamente a este ensayo, y para delimitar a qué intervalo el producto químico es efectivo como fungicida sería conveniente realizar un análisis previo o *screening*, que facilitará a *posteriori* acotar el intervalo de concentraciones de ensayo, para determinar finalmente la concentración mínima de inhibición.

En nuestro estudio, las concentraciones iniciales de ensayo previo o de *screening* se establecieron a un 80 y un 20% a dos tiempos de contacto (15 y 60 minutos). La decisión se derivó por una parte de los resultados obtenidos al aplicar la Norma UNE 1275 y 1650 en los seis productos anteriormente valorados, en los que se observó que la concentración óptima de los productos desinfectantes venía determinada sobre todo por la resistencia de las esporas de *A. Niger* (Sagripanti y Bonifacino, 1999). La elección de aplicar la Norma 1650, se derivó del hecho de que la evaluación de la actividad fungicida de los productos comerciales debía realizarse bajo las condiciones más desfavorables.

4.5.3. CONDICIONES AMBIENTALES

Los parámetros cinéticos del crecimiento microbiano así como las características fisiológicas dependen de las condiciones en las que el crecimiento microbiano tiene lugar: pH, temperatura, actividad del agua, pero también textura y estructura del medio (Bouix, M. Y col., 2002).

Los microorganismos se desarrollan preferentemente sobre medios con fuerte actividad de agua. Una vez que se abandona la zona 0,99-0,97 se observa una disminución general de la velocidad de crecimiento. Para los valores más bajos, el crecimiento se ralentiza (Banwart, 1981; Beuchart, 1983; Chirife, 1994).

En los resultados se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la cinética de crecimiento de las cepas fúngicas sometidas a los distintos tratamientos de humedad, semihumedad y sequedad durante las 120 horas de estudio. Los resultados del crecimiento en húmedo durante las 120 horas de *Candida albicans* mostraron una supervivencia durante todo el periodo, mientras que en el caso de las esporas de *Aspergillus niger* se observó una reducción aparente hasta las 48 y 60 horas y una posterior recuperación.

La disminución y ausencia de crecimiento especialmente en *C. albicans* en las condiciones de semihumedad y sequedad se debieron a la falta de disponibilidad de agua en el medio. La disponibilidad de agua (actividad de agua) influye en la tasa de crecimiento de los microorganismos afectando su viabilidad, y produciendo su muerte. En el caso de *Candida albicans*, la actividad de agua para su crecimiento es de 0,90-0,94, mientras que en el caso de *Aspergillus niger*, la actividad de agua para su crecimiento es de 0,78 (Banwart, 1981; Beuchart, 1983; Chirife, 1994).

En los programas de limpieza y desinfección se recomiendan el secado de las superficies (McEldowney y Fletcher, 1990). También el mantenimiento en seco

de las superficies es fundamental, ya que el agua es un factor esencial para la vida, en este caso de los microorganismos (Carpentier y Cerf, 1993).

4.6. ENSAYO CON TELA

A diferencia de la actividad fungicida del glutaraldehído en los ensayos en suspensión, con relación a los ensayos con tela, se observó una aparente reducción. En este caso no se encuentra una fácil justificación. En principio se podría pensar que al momento de la neutralización no alcanza a todo el desinfectante que se encuentra embebido en las fibras de tela, y como los microorganismos se adhieren a ella, mantienen durante más tiempo el contacto. En este caso podría ser interesante que en lugar de neutralizar químicamente se empleara la dilución - neutralización por filtración con agua destilada estéril.

Otra posibilidad sería aplicar el método de Koller y Wewalka (1982), que para evaluar la eficacia desinfectante en el proceso de lavandería, se colocan piezas de tela contaminadas entre 2 filtros de membrana, por lo que se permite el paso del detergente y desinfectante, pero retienen a los microorganismos, con lo cual el recuento de los microorganismos es más exacto.

No obstante, antes de que el desinfectante mojase la estructura del tejido, se produjo un mojado de la misma estructura con el inóculo microbiano, por lo que si esta teoría fuese cierta, no habría existido un incremento en la eficacia sino una

disminución. En consecuencia, otra justificación plausible sería que el desinfectante se une, por cualquier procedimiento, a la propia estructura del tejido. En este caso, puesto que los microorganismos se adhieren a las hebras de tejido, tendrán un mayor contacto y éste será directo, con lo que la eficacia aumentaría.

Esta última hipótesis sería especialmente interesante para el tratamiento de tejidos, puesto que algunos desinfectantes adecuadamente empleados permitirían una elevada eficacia desinfectante, pudiendo desarrollar en el futuro protocolos de higienización adecuados.

V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

1. Es posible la adaptación de la metodología estándar a otra rápida, con una reducción en el tiempo de incubación y una simplificación de las pruebas a realizar. Se ha constatado la aplicabilidad de las técnicas impedanciométricas utilizando Bactometer como sistema para evaluar el recuento de estos microorganismos y poder evaluar la eficacia fungicida de diferentes sustancias en un menor tiempo, y con una mayor eficacia, comparado con el recuento tradicional en placa de Petri.
2. La adaptación del protocolo normalizado a un método de screening se debería realizar seleccionando dos concentraciones de los productos a emplear (80% y 20%) a dos tiempos de contacto (15 y 60 minutos). Los resultados obtenidos permiten clasificar los productos por diferentes niveles de eficacia.
3. El producto con más amplio espectro fungicida es el hipoclorito sódico (lejía), tanto para levaduras como para esporas de mohos. Con este producto se consigue una reducción de más de 5 unidades logarítmicas de recuento con la menor concentración en menos de 5 minutos de contacto con gran diferencia respecto al resto.
4. El producto que manifestaba una menor actividad contra *Candida albicans* fue el peróxido de hidrógeno, probablemente debido a su potente actividad

catalasa. El peróxido no debería ser empleado para la desinfección de elementos contaminados con *Candida*.

5. Los productos estudiados poseen una actividad desigual, dependiendo de las condiciones del ensayo (concentración, el tiempo de exposición y el microorganismo utilizado), comparando los resultados obtenidos, después de aplicar las normas estándar, nos permiten clasificar por su efecto fungicida a los productos desinfectantes ensayados en 4 clases:

- Con respecto a la levadura (*Candida albicans*):
 - Actividad alta (hipoclorito sódico).
 - Actividad Media-alta (glutaraldehído, peróxido de hidrogeno y cloruro de benzalconio).
 - Actividad baja (alcoholes superiores).
 - Sin actividad (ácido benzoico).

- Con respecto al moho (*Aspergillus niger*).
 - Actividad alta (hipoclorito sódico).
 - Actividad media-alta (glutaraldehído).
 - Actividad baja (peróxido de hidrogeno, cloruro de benzalconio y alcoholes superiores).
 - Sin actividad (ácido benzoico).

VI. RESUMEN

RESUMEN

INTRODUCCIÓN:

Los datos epidemiológicos que poseemos en nuestro país señalan que la mayor parte de los brotes de toxiinfecciones alimentaria se desencadenan en el ámbito doméstico. Debido a ello, cada vez más se están desarrollando formulaciones químicas con actividad desinfectante para ser utilizadas en el hogar. La mayoría de los productos desarrollados tienen como objetivo el actuar como bactericidas. Sin embargo, poco se estudia respecto a su posible actividad fungicida (tanto destrucción de mohos como levaduras). Hay que destacar que en este grupo nos encontramos a microorganismos patógenos, como *Candida albicans* y otros alterantes, que pueden crecer en superficies como paredes, suelos y lugares de difícil acceso. Por este motivo, nuestro trabajo pretende comparar la actividad fungicida de los desinfectantes utilizados en el ámbito doméstico, para conocer su eficacia real y su aplicabilidad.

Al mismo tiempo, pretende evaluar el empleo de las técnicas impedanciométricas, ya que se trata de una metodología particularmente adecuada a pruebas de desinfectantes en superficies. El protocolo deja la adherencia en el mismo estado morfológico y no los enfrenta a un estrés por remoción y por lo tanto no influye en la eficacia del desinfectante (Gibson y col., 1995).

OBJETIVOS:

Evaluar la eficacia fungicida de los productos comerciales de uso doméstico, aplicando las normas internacionales de evaluación UNE EN-1275 y 1650.

Desarrollar una técnica rápida de evaluación de estos mismos productos comerciales.

Desarrollar sistemas que simulen situaciones reales de uso.

Verificar su eficacia, una vez adaptada la metodología, ensayar y comparar la eficacia de los diferentes desinfectantes en condiciones reales de uso.

MATERIAL Y MÉTODO:

La fase experimental del proyecto se realizó en 5 etapas:

Se aplicaron las normas Españolas UNE-EN 1275 y 1650 para la evaluación de la actividad fungicida en 20 productos comerciales.

Se diseñó un método rápido de screening a dos concentraciones y dos tiempos de contacto, para ayudar a discriminar los compuestos y poder encontrar su rango de acción.

Se adaptaron las normas a una técnica impedanciométrica, para automatizarla y permitir una detección de la actividad desinfectante en un menor tiempo.

Se analizaron los efectos de las condiciones ambientales en la viabilidad de las cepas fúngicas en varias superficies.

Se empleó la técnica de epifluorescencia directa, con tinción vital de fluorescencia y captura de imagen.

Se evaluó la actividad fungicida en tela de algodón

RESULTADOS:

Nuestros resultados señalan que el producto con hipoclorito sódico presenta la mayor actividad fungicida, tanto para las levaduras como para esporas de mohos, así como el glutaraldehído, que también superó las 2 normas UNE EN-1275 y 1650.

Al mismo tiempo, hemos constatado la aplicabilidad de la impedancia como sistema para evaluar el recuento de estos microorganismos y poder evaluar la eficacia fungicida de diversas sustancias en un menor tiempo y en una mayor eficacia.

CONCLUSIONES:

Es posible la adaptación de la metodología estándar a otra rápida, con una reducción en el tiempo de incubación y una simplificación de las pruebas a realizar.

La adaptación del protocolo normalizado a un método de screening se debería realizar seleccionando dos concentraciones de los productos a emplear (80% y 20%) a dos tiempos de contacto (15 y 60 minutos). Los resultados obtenidos permiten clasificar los productos por diferentes niveles de eficacia.

El producto con más amplio espectro fungicida es el hipoclorito sódico (lejía), tanto para levaduras como para esporas de mohos. Con este producto se consigue una reducción de más de 5 unidades logarítmicas de recuento con la menor concentración en menos de 5 minutos de contacto con gran diferencia respecto al resto.

El producto que manifestaba una menor actividad contra *Candida albicans* fue el peróxido de hidrógeno, probablemente debido a su potente actividad catalasa. El peróxido no debería ser empleado para la desinfección de elementos contaminados con *Candida*.

Los productos estudiados poseen una actividad desigual, dependiendo de las condiciones del ensayo (concentración, el tiempo de exposición y el microorganismo utilizado).

VII. BIBLIOGRAFIA

M. Abadias, N. Teixidó, J. Usall, A. Benabarre, and I. Viñas. Viability, Efficacy, and Storage Stability of Freeze-Dried Biocontrol Agent *Candida sake* Using Different Protective and Rehydration Media. *Journal of Food Protection* 64(6):856-861, 2001.

M. L. Abarca, M. R. Bragulat, G. Castellá, and F. J. Cabañes. Mycoflora and aflatoxin-producing strains in animal mixed feeds. *Journal of Food Protection* 57(3):256-258, 1994.

G. C. Ainsworth and P. K. C. Austwick. *Micosis de los animales*, León (España):Editorial academia, 1973.

S. F. Altekrause, M. L. Choen, and D. L. Swerdlow. Emerging foodborne diseases. *Emerg.Infect.Dis.* 3:285-293, 1997.

S. Andrews. Evaluation of surface disinfection procedures for enumerating fungi in food: a collaborative study. *International Journal of Food Microbiology* 29:177-184, 1996. 0168-1605.

F. Angelillo, N. M. A. Viggiani, L. Rizzo, and A. Blanco. Food Handlers and Foodborne Diseases: Knowledge, Attitudes, and Reported Behavior in Italy. *Journal of Food Protection* 63(3):381-385, 2000.

Anónimo. Antisépticos y desinfectantes químicos. Actividad fungicida básica. Método de ensayo y requisitos (fase 1). AENOR. Madrid:AENOR. UNE-EN 1275:1-28, 1997.

Anónimo. Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad fungicida de los antisépticos y desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios, en la industria, en el hogar y en colectividad. Método de ensayo y requisitos (fase 2, etapa 1). AENOR. Madrid: AENOR UNE-EN 1650:1-33, 1998.

S. Aoki, S. Ito-kuwa, K. Nakamura, V. Vidotto, and K. Takeo. Oxygen as possible tropic factor in hyphal growth of *Candida albicans*. *Mycoscience* 39:231-238, 1998.

M. G. Baldry. The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *Journal of Applied Bacteriology* 54(3):417-423, 1983.

E. Bazan-Mora, E. Sánchez-Paredes, E. Córdoba-Martínez, F. Hernández-Hernández, P. Manzano-Gayoso, and R. López-Martínez. Hallazgo de *Candida albicans* en manos de manejadores de alimentos. *Revista Mexicana de Patología Clínica* 48(1):37-41, 2001.

E. G. Beck, J. Borneff, L. Grun, K. O. Gundermann, E. Kanz, T. Lammers, K. Mulhens, C. A. Primavesi, B. Schmidt, R. Schubert, E. Weinhold, and H. P. Werner. Recommendations for the testing and the evaluation of the efficacy of chemical disinfectants procedures. *Zentralbl Bakteriol (Orig B)* 165(3-4):335-380, 1977.

C. Belloch, L. Lopez, B. Esteve, P. V. Martinez, M. D. G^a-lópez, and F. Uruburu. Colección Española de Cultivos Tipo. COLECCION ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO:UNIVERSITAT DE VALÉNCIA. 4, 1998.

E. Bessems. The effect of practical conditions on the efficacy of disinfectants. *International Biodeterioration & Biodegradation* 41:177-183, 1998.

L. R. Beuchat. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of Food Protection* 59(2):204-216, 1996.

L. R. Beuchat, J. M. Farber, E. H. Garrett, L. J. Harris, M. E. Parish, T.V.Suslow, and F. F. Busta. Standardization of a Method to Determine the Efficacy of Sanitizers in Inactivating Human Pathogenic Microorganisms on Raw Fruits and Vegetables. *Journal of Food Protection* 64(7):1079-1084, 2001a

L. R. Beuchat, L. J. Harris, T. E. Ward, and T. M. Kajs. Development of a Proposed Standard Method for Assessing the Efficacy of Fresh Produce Sanitizers. *Journal of Food Protection* 64(8):1103-1109, 2001b

J. Blancou. History of disinfection from early times until the end of the 18th century. *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz.* 14(1):21-39, 1995.

S. S. Block. *Disinfection, sterilization, and preservation.*, Londres:1991. 162 pages.

S. F. Bloomfield. The use of disinfectants in the home. *Journal of Applied Bacteriology* 45(135), 1978.

S. F. Bloomfield, M. Arthur, E. Looney, K. Begun, and H. Patel. Comparative testing of disinfectant and antiseptic products using proposed European suspension testing methods. *Letters in Applied Microbiology* 13:233-237, 1991.

S. F. Bloomfield and E. Looney. Evaluation of the 1987 European suspension test for antimicrobial activity of disinfectants. *Journal of Applied Bacteriology* 73:87-93, 1992.

S. F. Bloomfield, M. Arthur, B. Van Klingeren, J. T. Holah, and R. Elton. An evaluation of the repeatability and reproducibility of a surface test for the activity of disinfectants. *Journal of Applied Bacteriology* 76:86-94, 1994.

S. F. Bloomfield and E. Scott. Cross-contamination and infection in the domestic environment and the role of chemical disinfectants. *Journal of Applied Microbiology* 83 (1):1-9, 1997.

J. Borneff, HP. Werner, H. Van de Voorde, and G. Reybrouck. Critical assessment of methods for testing chemical disinfectants and disinfection procedures. *Zbl.Bakt.Hyg.B* 160(6):590-600, 1975.

J. Borneff, R. Hassinger, J. Wittig, and R. Edenharder. Distribution of Microorganisms in Household Kitchens II. Communication: Critical Evaluation of Results and Conclusions. *International Journal of Microbiology and Hygiene* 186:30-44, 1988a

J. Borneff, R. Hassinger, J. Wittig, and R. Edenharder. Distribution of Microorganisms in Household Kitchens I. Communication: Problems, Experiments, Results. *Zbl.Bakt.Hyg.B* 186:1-29, 1988b

J. Borneff. Effective Hygienic Measurements in Households Today. *International Journal of Microbiology and Hygiene* 187:404-413, 1989.

M. Bouix, J-Y. Leveau, and J-F. Mescle. Importancia de los fenómenos microbianos en los procesos alimentarios y biológicos. In: *Manual Técnico de Higiene, Limpieza y Desinfección*, edited by Ediciones A.Madrid Vicente and Mundi-Prensa, Madrid: 2002, p. 119-176.

L. Boulangé-petermann. Processes of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability: A review with special reference to the food industry. *Biofouling* 10(4):275-300, 1996.

C. Bousser. Combinación de la limpieza y la desinfección. In: *Manual técnico de higiene, limpieza y desinfección.*, edited by AMV Ediciones and Mundi-Prensa, Madrid: 2002, p. 303-320.

R. E. Brackett. Shelf stability and safety of fresh produce as influenced by sanitation and disinfection. *Journal of Food Protection* 55:808-814, 1992.

M. R. Bragulat, M. L. Abarca, M. T. Bruguera, and F. J. Cabañes. Técnicas de cuantificación fúngica en alimentos. *Revista Iberoamericana de Micología* 9:42-45, 1992a

M. R. Bragulat, M. L. Abarca, M. T. Bruguera, and F. J. Cabañes. Tecnicas de cuantificación fúngica en alimentos. *Revista Iberoamericana de Micología* 9:42-45, 1992b

S. Bredholt, J. Maukonen, K. Kujanpää, T. Alanko, U. Olofson, U. Husmark, A. M. Sjöberg, and G. Wirtanen. Microbial methods for assessment of cleaning and disinfection of food-processing surfaces cleaned in low-pressure system. *Eur Food Res Technol* 209:145-152, 1999.

G. Bruins and J. A. Dyer. Enviromental consideration of disinfectants used in agriculture. *Rev.sci.tech.Off.int Epiz.* 14(1):81-94, 1995.

D. J. Bueno, J. O. Silva, and G. Oliver. Mycoflora in Commercial Pet Foods. *Journal of Food Protection* 64(5):741-743, 2001.

L. Bullerman, L. Schroeder, and K. Y. Park. Formation and control of mycotoxin in food. *Journal of Food Protection* 47:637-646, 1984.

K. Bundgaard-Nielsen and P. V. Nielsen. Fungicidal effect of 15 Disinfectants against 25 fungal Contaminants Commonly Found in Bread and Cheese Manufacturing. *Journal of Food Protection* 59(3):268-275, 1996.

L. W. Bush, L. M. Benson, and J. H. White. Pig skin as test substrate for evaluating topical antimicrobial activity. *Journal of Clinic Microbiology* 24(3):343-348, 1986.

B. Carpentier, O. Cerf . Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology* 75:499-511, 1993.

G. R. Carter. *Fundamentos de Bacteriología y Micología Veterinaria*, Zaragoza, España:Acribia,S.A., 1994. 305 pages.

Y. C. Chen, K. M. Jackson, F. P. Chea, and D. W. Schaffner. Quantification and Variability Analysis of Bacterial Cross-Contamination Rates in Common Food Service Tasks. *Journal of Food Protection* 64(1):72-80, 2001.

K. C. Cheng and R. F. Levine. Chemical destruction of *Aspergillus niger* conidiospores. *Journal of Food Science* (35):62-66, 1970.

M. J. Collado. Métodos de control de desinfectantes. ALIMENTACIÓN, Equipos y Tecnología. (7):81-85, 1994.

J. E. Collins. Impact of changing consumer lifestyles on the emergence/reemergence of foodborne pathogens. *Emerg.Infect.Dis.* 3:471-479, 1997.

R. C. Cook, J. A. Hasler, L. K. Kim, D. L. deLeeuw, J. W. McCabe, P. M. Meehan, F. E. Mitchell, E. A. Shaheen, W. L. Smith, and A. G. Stanislowski. Bleach Uses and Benefits. The clorox company:1-58, 1996.

J. L. Cordier, T. Putallaz, and L. J. Cox. Impedimetric determination of activity of disinfectants and detergents on *Listeria*: Preliminary study. *International Journal of Food Microbiology* 8:293-297, 1989.

F. Criquelion, J. Durand, F. Olivier, G. Rauwel, and F. Sabat. Características generales de las funciones químicas desinfectantes. In: *Manual técnico de higiene, limpieza y desinfección*, edited by AMV Ediciones and Mundi-Prensa, Madrid: 2002, p. 247-282.

M. I. de Silóniz, M. J. Valderrama, and J. M. Peinado. A Chromogenic Medium for the Detection of Yeast with B-Galactosidase and B-Glucosidase Activities from Intermediate Moisture Foods. *Journal of Food Protection* 63(5):651-654, 2000.

B. P. Dey and F. B. Engley. Methodology for recovery of chemically treated *Staphylococcus aureus* with neutralizing medium. *Journal of Applied Environmental Microbiology* 45:1533-1537, 1983.

D. S. Dhaliwal, J. L. Cordier, and L. J. Cox. Impedimetric evaluation of the efficiency of disinfectants against biofilms. *Letters in Applied Microbiology* 15:217-221, 1992.

F. M. Driessen, De Vries J, and F. Kingma. Adhesion and growth of thermoresistant streptococci on stainless steel during heat treatment of milk. *Journal of Food Protection* 47:848-852, 1984.

D. G. Dunsmore and MA. Thomson. Bacteriological control of food equipment surface by cleaning systems. II. Sanitizer effects. *Journal of Food Protection* 44:21-27, 1981.

G. M. Duran and D. L. Marshall. Rapid Determination of Sanitizer Concentration Using Impedance-Based Methods. *Journal of Food Protection* 65(9):1422-1427, 2002. 032-028X.

A. L. Edmiston and Russell S.M. A Rapid Microbiological Method for Enumerating *Escherichia coli* from Broiler Chicken Carcasses. *Journal of Food Protection* 61(10):1375-1377, 1998.

J. D. Eifert and G. C. Sanglay. Chemistry of Chlorine Sanitizers in Food Processing. *Dairy, Food and Environmental Sanitation* 22(7):534-538, 2002.

G. I. Favier, M. E. Escudero, and A. M. S. de Guzmán. Effect of Chlorine, Sodium Chloride, Trisodium Phosphate, and Ultraviolet Radiation on the Reduction of *Yersinia enterocolitica* and Mesophilic Aerobic Bacteria from Eggshell Surface. *Journal of Food Protection* 64(10):1621-1623, 2001.

R. Firstenberg-Eden. Rapid estimation of the number of microorganisms in raw meat by impedance measurement. *Journal of Food Technol* 37:64-70, 1983.

P. M. Foegeding. Ozone inactivation of *Bacillus* and *Clostridium* spore populations and the importance of the spore coat to resistance. *Journal of Food Microbiology* 2:123-134, 1985.

J. F. Frank and R. A. N. Chmielewski. Effectiveness of Sanitation with Quaternary Ammonium Compound or Chlorine on Stainless Steel and Other Domestic Food-Preparation Surfaces. *Journal of Food Protection* 60(1):43-47, 1997.

J. F. Frank and R. Chimielewski. Influence of Surface Finish on the Cleanability of Stainless Steel. *Journal of Food Protection* 64(8):1178-1182, 2001.

F. García. Factores que intervienen en la higienización de la industria cárnica. *Cárnica 2000* 7:59-61, 1988.

R. A. García. Programa de limpieza e higiene. *Alimentaria* 3:29-50, 1989.

P. Gélinas and J. Goulet. Efficacité de huit désinfectants sur trois types de surfaces contaminées par *Pseudomonas aeruginosa*. *Can Journal of Microbiology* 29:1716-1730, 1983.

H. Gibson, R. Elton, W. Peters, and J. T. Holah. Surface and Suspension Testing: Conflict or Complementary. *International Journal of Biodeterioration & Biodegradation* :375-384, 1995.

A. Gillet. Mecanismos de acción de los desinfectantes y sus formulaciones. In: *Manual Técnico de Higiene, Limpieza y Desinfección*, edited by AMV Ediciones and Mundi-Prensa, Madrid: 2002, p. 283-302.

S. J. Gilling, E. A. Taylor, K. Kane, and J. Z. Taylor. Successful Hazard Analysis Critical Control Point Implementation in the United Kingdom: Understanding the Barriers through the Use of a Behavioral Adherence Model. *Journal of Food Protection* 64(5):710-715, 2001.

K. E. Glassmoyer and S. M. Russell. Evaluation of a Selective Broth for Detection of *Staphylococcus aureus* Using Impedance Microbiology. *Journal of Food Protection* 64(1):44-50, 2001.

G. Gómez. La desinfección en la industria alimentaria. *ALIMENTACIÓN, Equipos y Tecnología* 9:89-91, 1994.

A. G. Grow. Writing guidelines to require disinfection. *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz.* 14(2):469-477, 1995.

B. R. Gulati, P. B. Allwood, C. W. Hedberg, and S. M. Goyal. Efficacy of Commonly Used Disinfectants for the Inactivation of Calicivirus on Strawberry, Lettuce, and a Food-Contact Surface. *Journal of Food Protection* 64(9):1430-1434, 2001.

C. R. Hackney and J. Porter. Cleaning and Sanitation. In: *The Seafood Industry*, edited by M. Flick, 1995, p. 268-290.

L. J. Harris, L. R. Beuchat, T. M. Kajs, T. E. Ward, and C. H. Taylor. Efficacy and Reproducibility of a Produce Wash in Killing Salmonella on the Surface of Tomatoes Assessed with a Proposed Standard Method for Produce Sanitizers. *Journal of Food Protection* 64(10):1477-1482, 2001.

R. F. Hector. Compounds active against cell walls of medically important fungi. *Clinical Microbiology Reviews* 6((1)):1-21, 1993.

I. K. Hegna and O. G. Clausen. An investigation of the bactericidal and fungicidal effects of certain disinfectants by use of a capacity test. *Antimicrob Agents Chemother* 139(4):473-483, 1988.

R. Herruzo. Desinfectantes españoles para el siglo XXI. *Anales de la Real Academia Nacional de Medicina* :791-806, 2000.

Jr. A. Hinton, J. A. Cason, and K. D. Ingram. Enumeration and Identification of Yeasts Associated with Commercial Poultry Processing and Spoilage of Refrigerated Broiler Carcasses. *Journal of Food Protection* 65(6):993-998, 2002.

J. T. Holah, C. Higgs, S. Robinson, D. Worthington, and H. Spenceley. A conductance surface disinfection test for food hygiene. *Letters in Applied Microbiology* 11:255-259, 1990.

J. T. Holah. Special needs for disinfectants in food-handling establishments. *Rev.sci.tech.Off.int Epiz.* 14(1):95-104, 1995a

J. T. Holah. Progres Report on CEN/TC 216/Working Group 3: Disinfectant Test Methods for Food Hygiene, Institutional, Industrial and Domestic Applications. *International Journal of Biodeterioation & Biodegradation* :355-365, 1995c

J. T. Holah. Disinfection of food production areas. *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz.* 14(2):343-363, 1995b

ICMSF. Limpieza, desinfección e higiene. In: *Ecología Microbiana de los alimentos 1; Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos*, edited by Inc. Academic Press, Zaragoza España:Editorial Acribia, 1980, p. 242-312.

ICMSF. Hongos toxigénicos: *Aspergillus*. In: *Microorganismos de los alimentos, Características de los patógenos microbianos*, edited by Blackie Academic & Professional, Zaragoza, España.:Acribia, S.A., 1996, p. 403-443.

J. Y. Ikawa and J. S. Rossen. Reducing bacteria in household sponges. *Journal of Environmental .Health* 7:18-22, 1999.

S. A. Ismail, T. Deak, H. A. Abd El-Rahman, M. A. Yassien, and L. R. Beuchat. Presence and changes in populations of yeasts on raw and processed poultry products stored at refrigeration temperature. *International Journal of Food Microbiology* 62(1-2):113-121, 2000.

D.J. Jeffrey. Chemicals used as disinfectants: active ingredients and enhancing additives. *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz.* 14(1):57-74, 1995.

K. L. Josephson, J. R. Rubino, and I. L. Pepper. Characterization and quantification of bacterial pathogens and indicator organisms in household kitchen with and without the use of a disinfectant cleaner. *Journal of Applied Microbiology* 83:737-750, 1997.

R. F. Kahrs. General disinfection guidelines. *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz.* 14(1):105-122, 1995.

H. Kassa, B. Harrington, M. Bisesi, and S. Khuder. Comparisons of Microbiological Evaluations of Selected Kitchen Areas with Visual Inspections for Preventing Potencial Risk of Foodborne Outbreaks in Food Service Operations. *Journal of Food Protection* 64(4):509-513, 2001.

S. E. Keller, R. I. Merker, K. T. Taylor, H. L. Tan, C. D. Melvin, S. J. Chirtel, and A. J. Miller. Efficacy of Sanitation and Cleaning Methods in a Small Apple Cider Mill. *Journal of Food Protection* 65(6):911-917, 2002.

F. Kiermeier and H. Mrozek. Introducción. In: *Limpieza y Desinfección*, edited by Acibia S.A., Zaragoza, España: 2000, p. 1-20.

F. Kiermeier, G. Wildbrett, and H. Mrozek. Productos químicos auxiliares para la limpieza y desinfección. In: *Limpieza y desinfección en la industria alimentaria*, edited by Acibia S.A., Zaragoza, España: 2000, p. 21-66.

L. J. King. History and future perspectives of the use of disinfectants in animal health. *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz.* 14(1):41-46, 1995.

S. J. Knabel. Foodborne Illness: Rol of Home, Food Handling Practices. *Food Technology* 49(4):119-131, 1995.

W. Koller and G. Wewalka. A new method for the microbiological evaluation of disinfecting laundering procedures for textiles. *Zbl.Bakt.Hyg.B* 176(5-6):463-471, 1982.

H. D. Kusumaningrum, M. M. van Putten, F. M. Rombouts, and R. R. Beumer. Effects of Antibacterial Dishwashing Liquid on Foodborne Pathogens and Competitive Microorganisms in Kitchen Sponges. *Journal of Food Protection* 65(1):61-65, 2002.

R. J. W. Lambert, M. D. Johnston, and E.-A Simons. A Kinetic study of the effect of hydrogen peroxide and peracetic acid against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* using the Bioscreen disinfection method. *Journal of Applied Microbiology* 87:782-786, 1999.

W-C. Lee, M-J. Lee, J-S. Kim, and S-Y. Park. Foodborne Illness Outbreaks in Korea and Japan Studied Retrospectively. *Journal of Food Protection* 64(6):899-902, 2001.

S. J. Lewis and A. Gilmour. Microflora associated with the internal surface of rubber and stainless steel milk transfer pipeline. *J. Applied Bacteriology* 62:327-333, 1987.

S. Li, R. R. Marquardt, and D. Abramson. Immunochemical Detection of Molds: A Review. *Food Protection* 63(2):281-291, 2000.

A. H. Linton, W. B. Hugo, and D. A. Russell. *Disinfection in Veterinary and Farm Animal Practice*, Oxford:Blackwell Scientific Publications, 1987. 179 pages.

S. B. I. Luppens, F. M. Rombouts, and T. Abee. The Effect of the Growth Phase of *Staphylococcus aureus* on Resistance to Disinfectants in a Suspension Test. *Journal of Food Protection* 65(1):124-129, 2002.

M. T. Madigan, J. M. Martinko, and J. Parker. Eukarya: microorganismos eucarióticos. In: *Brock Biología de los Microorganismos*, edited by Prentice Hall Iberia, Madrid:Prentice Hall, 1999, p. 769-784.

T. F. Marahaba and M. B. Washington. Drinking water disinfection and by-products: History and current practice. *Advances in Environmental Research* 2(1):103-115, 1998.

P. Maris. Modes of action of disinfectants. *Rev.sci.Tech.Off.int.Epiz* 14(1):47-55, 1995.

P. M. Mäkela, H. J. Korkeala, and E. K. Sand. Effectiveness of Commercial Germicide Products Against the Ropy Slime-Producing Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Protection* 54(8):632-636, 1991.

G. McDonnell and D. Russell. Antseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 12:147-179, 1999.

T. A. McMeekin and C. J. Thomas. Aspects of the microbial ecology of poultry processing and storage. *Journal of Food Technology Aust.* (January):35-43, 1979.

McEldowney, S. And Fletcher, M. A model system for the study of food container leakage. *Journal of Applied Bacteriology.* 69(2):206-210, 1990.

E. B. Mosley, P. R. Elikor, and H. Hays. Destruction of food spoilage, indicator and pathogenic organisms by various germicides in solution and on a stainless steel surface. *Journal of Milk Food Technol* 39:830-836, 1976.

T. M. Mosteller and J. R. Bishop. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. *Journal of Food Protection* 56:34-41, 1993.

F. C. Odds. *Candida and candidosis*, London:1988. 59 pages.

F. C. Odds. Morphological change in *Candida albicans*. *Jpn Journal of Med.Mycol.* 34:99-111, 1993.

Ossowski and U. Duchmann. Der Einfluß des haushalts-üblichen Waschprozesses auf Mykotisch Kontaminierte Textilien. *Hautarzt* (48):397-401, 1997.

L. O. Pordesimo, E. G. Wilkerson, A. R. Womac, and C. N. Cutter. Process Engineering Variables in the Spray Washing of Meat and Produce. *Journal of Food Protection* 65(1):222-237, 2002.

A. Powell, M. Bobadilla-Ruiz, A. Whitfield, M. W. Griffiths, and A. Luedtke. Development, Implementation, and Analysis of an On-Farm Food Safety Program for the Production of Greenhouse Vegetables. *Journal of Food Protection* 65(6):918-923, 2002.

J. Puig-Duran. *Ingeniería, autocontrol y auditoria de la higiene en la industria alimentaria*, Madrid:1999.

G. Ramage, K. Vande Walle, B. L. Wickes, and J. L. Lopez-Ribot. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 45(9):2475-2490, 2001.

T. J. Ren and J. F. Frank. A survey of four fluid milk processing plants for airborne contamination using various sampling methods. *Journal of Food Protection* 55(1):38-42, 1992.

J. J. Rodríguez-Jerez. Comunicación personal. 2003.

R. A. Rosenthal, S. Buck, C. McNally, R. Abshire, and B. Schlech. Antimicrobial comparison of a new multi-purpose disinfecting solution to a 3% hydrogen peroxide system. *CLAO* 25(4):213-217, 1999.

P. Rusin, P. Orosz-Coughlin, and C. Gerba. Reduction of fecal coliform, coliform and heterotrophic plate counts bacteria in the household kitchen and bathroom by disinfection with hypochlorite cleaners. *Journal of Applied Microbiology* 85:819-828, 1998.

Russell S.M., D. L. Fletcher, and N. A. Cox. A rapid method for the determination of temperature abuse of fresh broiler chicken. *Journal of Poultry Science* 71:1391-1395, 1992.

Russell S.M. Comparison of the Traditional Three-Tube Most Probable Number Method with the Petrifilm, SimPlate, BioSys Optical, and Bactometer Conductance Methods for Enumerating *Escherichia coli* from Chicken Carcasses and Ground Beef. *Journal of Food Protection* 63(9):1179-1183, 2000.

W. A. Rutala and D. J. Weber. Uses of Inorganic Hypochlorite (Bleach) in Health-Care Facilities. *Clinical Microbiology Reviews* 10:597-610, 1997.

J-L. Sagripanti and A. Bonifacino. Bacterial spores survive treatment with sterilants and disinfectants. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 65(9):4255-4260, 1999.

M. R. J. Salton. Lytic agents, cell permeability and monolayer penetrability. *Gen.Physiol.* 52:277S-252S, 1968.

G. Salvat and P. Colin. Cleaning and disinfection practice in the meat industries of Europe. *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz.* 14(2):329-341, 1995.

Y. Samberg and M. Meroz. Application of disinfectants in poultry hatcheries. *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz.* 14(2):365-380, 1995.

D. Schwattz. La regresión. In: *Métodos estadísticos para médicos y biólogos.* Barcelona:Herder, 1988, p. 273-281.

E. Scott, S. F. Bloomfield, and C. G. Barlow. An investigation of microbial contamination in the home. *Journal Hygiene Camb.* 89(2):279-293, 1982.

E. Scott, S. F. Bloomfield, and C. G. Barlow. Evaluation of disinfectants in the domestic environment under "in use" conditions. *Journal Hygiene Camb.* 92:193-203, 1984.

E. Scott and S. F. Bloomfield. A bacteriological investigation of the effectiveness of cleaning and disinfection procedures for toilet hygiene. *Applied Bacteriology* 59(3):291-297, 1985.

E. Scott and S. F. Bloomfield. Investigations of the effectiveness of detergent washing, drying and chemical disinfection on contamination of cleaning cloths. *Journal of Applied Bacteriology* 68(3):279-283, 1990b

E. Scott and S. F. Bloomfield. The survival and transfer of microbial contamination via cloths, hands and utensils. *Journal of Applied Bacteriology* 68(3):271-278, 1990.a

E. Scott and S. F. Bloomfield. An in-use study of the relationship between bacterial contamination of food preparation surface and cleaning cloths. *Journal of Applied Microbiology* 16:173-177, 1993.

E. Scott. Foodborne disease and other hygiene issues in the home. *Journal of Applied Bacteriology* 80:5-9, 1996.

E. Scott. Hygiene issues in the home. *American Journal Infect Control* 27(6):522-525, 1999.

B. W. Sheldon and J. Brake. Hydrogen Peroxide as an Alternative Hatching Egg Disinfectant. *Journal of Poultry Science* 70:1092-1098, 1991.

E. Simone, M. Goosen, S. H. W. Notermans, and M. W. Borgdorff. Investigations of Foodborne Diseases by Food Inspection Services in The Netherlands, 1991 to 1994. *Journal of Food Protection* 60(4):442-446, 1997.

M. F. Simpanya, J. Allotey, and S. F. Mpuchane. A Mycological Investigation of Phane, an Edible Caterpillar of an Emperor Moth, *Imbrasis belina*. *Journal of Food Protection* 63(1):137-140, 2000.

A. Socias. La higiene en la industria cárnica. *Eurocarne* 10:15-22, 1992.

D. S. Spangenberg and S. C. Ingham. Comparison of Methods for Enumeration of Yeasts and Molds in Shredded Low-Moisture, Part-Skim Mozzarella Cheese. *Journal of Food Protection* 63(4):529-533, 2000.

E. H. Spaulding, K. R. Cundy, and F. J. Turner. Chemical disinfection of medical and surgical materials. In: *Disinfection, Sterilization and Preservation*, edited by Lea & Febiger, Philadelphia, PA.: 1977, p. 654-684.

J. P. Speirs, A. Anderson, and J. G. Anderson. A study of the microbial content of domestic kitchen. *International Journal of Environmental Health Res.* 5:109-122, 1995.

J. D. Stopforth, J. Samalis, J. N. Sofos, P. A. Kendall, and G. C. Smith. Biofilm Formation by Acid-Adapted and Nonadapted *Listeria monocytogenes* in Fresh Beef Decontamination Washings and Its Subsequent Inactivation with Sanitizers. *Journal of Food Protection* 65(11):1717-1727, 2002.

K. Takeuchi and J. F. Frank. Penetration of *Escherichia coli* O157:H7 into Lettuce Tissues as Affected by Inoculum Size and Temperature and the Effect of Chlorine Treatment on Cell Viability. *Journal of Food Protection* 63(4):434-440, 2000.

K. Takeuchi and J. F. Frank. Confocal Microscopy and Microbial Viability Detection for Food Research. *Journal of Food Protection* 64(12):2088-2102, 2001.

K. Takeuchi and J. F. Frank. Penetration of *Escherichia coli* O157:H7 into lettuce as influenced by modified atmosphere and temperature. *Journal of Food Protection* 64:1820-1823, 2001.

G. Tamási. Testing disinfectants for efficacy. *Rev.sci.Tech.Off.int.Epiz* 14(1):75-79, 1995.

M. H. Taniwaki, N. da Silva, A. A. Banhe, and B. T. Iamanaka. Comparison of Culture Media, Simplate, and Petrifilm for Enumeration of Yeast and Molds in Food. *Journal of Food Protection* 64(10):1592-1596, 2001.

R. V. Tauxe. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerg. Infect. Dis.* 3(4):425-434, 1997

J. H. Taylor, S. J. Roger, and J. T. Holah. A comparison of the bactericidal of 18 disinfectants used in the food industry against *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas aeruginosa* at 10 and 20°C. *Journal of Applied Microbiology* 87:718-725, 1999.

B. Terleckyj and D. Axler. Efficacy of disinfectants against fungi isolated from skin and nail infections. *American Podiatric Medical Association* 83(7):386-393, 1983.

B. Terleckyj and D. A. Axler. Quantitative neutralization assay of fungicidal activity of disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother* 31(5):794-798, 1987.

B. Terleckyj and D. Axler. Efficacy of Disinfectants Against Fungi Isolated From Skin and Nail Infections. *Journal of the American Podiatric Medical Association* 83(7):386-393, 1993.

R. Trujillo and N. Laible. Reversible inhibition of spore germination by alcohols. *Journal of Applied Microbiology* 20(4):620-623, 1970.

D. O. Ukuku and G. M. Sapers. Effect of Sanitizer Treatments on Salmonella Stanley Attached to the Surface of Cantaloupe and Cell Transfer to Fresh-Cut Tissues during Cutting Practices. *Journal of Food Protection* 64(9):1286-1291, 2001.

H. Van de Voorde, G. Reybrouck, P. Van Dijck, and M. J. Vranckx. The choice as test organisms in disinfectant testing. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg (B)* 179(2):125-129, 1984.

H. Van de Voorde, P. Van Dijck, and G. Reybrouck. Influence of the growth characteristics of *Candida albicans* on disinfectant testing. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg (B)* 184(2):160-166, 1987.

B. Van Klingeren, A. B. Leussink, and W. Pullen. A European collaborative study on the repeatability and reproducibility of standard suspension test for the evaluation of disinfectants in hygiene. Report of the National Institute of Public Health and Environmental Hygiene. 35901001, 1981.

B. Van Klingeren and DA. Mossel. Official evaluation of disinfectants in the Netherlands. *Zentralbl Bakteriol (Orig B)* 166(6):540-541, 1978.

J. Verran, R D. Boyd, K. Hall, and R. H. West. Microbiological and Chemical Analyses of stainless Steel and Ceramics Subjected to Repeated Soiling and Cleaning Treatments. *Journal of Food Protection* 64(9):1377-1387, 2001b

J. Verran, D. L. Rowe, and R D. Boyd. The Effect of Nanometer Dimension Topographical Features on the Hygienic Satus of Stainless Steel. *Journal of Food Protection* 64(8):1183-1187, 2001a

C. Vijayakumar and C. E. Wolf-Hall. Evaluation of Household Santizers for Reducing Levels of Escherichia coli on Iceberg Lettuce. *Journal of Food Protection* 65(10):1646-1650, 2002.

T. M. Waltimo, D. Orstavik, E. K. Siren, and M. P. Haapasalo. In vitro susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *International Journal of Endod* 32(6):421-429, 1999.

WHO. Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe. WHO:Fifth Report 1985-1989, 1992.

P. Whyte, J. D. Collins, K. McGill, C. Monahan, and H. O'Mahony. Distribution and Prevalence of Airborne Microorganisms in Three Commercial Poultry Processing Plants. *Journal of Food Protection* 64(3):388-391, 2001b

P. Whyte, J. D. Collins, K. McGill, C. Monahan, and H. O'Mahony. Quantitative Investigation of the Effects of Chemical Decontamination Procedures on the Microbiological Status of Broiler Carcasses during processing. *Journal of Food Protection* 64(2):179-183, 2001b

G. Wildbrett. *Limpieza y desinfección en la industria alimentaria*, Zaragoza: Acribia s.a., 2000. 349 pages.

J. K. Winkler. Principios generales: Esterilización y Desinfección. In: *Control sanitario de poblaciones animales*, edited by McGraw-Hill, México: 1987, p. 21-27.

K. Yu, M. C. Newman, D. D. Archbold, and T. R. Hamilton-Kemp. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 on Strawberry Fruit and Reduction of the Pathogen Population by Chemical Agents. *Journal of Food Protection* 64(9):1334-1340, 2001.

S. Zhang and M. J. Farber. The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. *Journal of Food Microbiol* 13:311-321, 1996.

P. Zhao, T. Zhao, P. Doyle, J. R. Rubino, and J. Meng. Development of a Model for Evaluation of Microbial Cross-Contamination in the Kitchen. *Journal of Food Protection* 61(8):960-963, 1998.

E.A. Zottola. Microbial Attachment and Biofilm Formation: A new problem for the food industry?. *Journal of Food Technology* 48(7):107-114, 1994.