



UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTADE DE VETERINARIA DE LUGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN E ANÁLISES ALIMENTARIAS

**DESARROLLO DEL ANÁLISIS DE PELIGROS Y PUNTOS DE
CONTROL CRÍTICO EN EXPLOTACIONES DE VACUNO LECHERO
EN GALICIA: ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE PATÓGENOS
ZONÓTICOS**



María José Vilar Ares



UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTADE DE VETERINARIA DE LUGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN E ANÁLISES ALIMENTARIAS

**DESARROLLO DEL ANÁLISIS DE PELIGROS Y PUNTOS
DE CONTROL CRÍTICO EN EXPLOTACIONES DE
VACUNO LECHERO EN GALICIA: ESTUDIO
EPIDEMIOLÓGICO DE PATÓGENOS ZONÓTICOS**

Memoria presentada por:

María José Vilar Ares

Para optar al grado de Doctor en Veterinaria

Lugo, Julio de 2007

Eduardo Yus Respaldiza, Profesor Titular del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela.

José Luis Rodríguez Otero, Profesor Titular del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela.

INFORMAN:

Que la Licenciada en Veterinaria Dña. **María José Vilar Ares** realizó en el Instituto de Investigación e Análises Alimentarias, Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela, bajo nuestra dirección, el trabajo “**Desarrollo del análisis de peligros y puntos de control crítico en explotaciones de vacuno lechero en Galicia: estudio epidemiológico de patógenos zoonóticos**”, que presenta para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firmamos el presente informe en Lugo a 2 de Mayo de 2007

Fdo. Eduardo Yus Respaldiza

Fdo. José Luis Rodríguez Otero

Fdo. María José Vilar Ares

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis directores de Tesis, al Dr. José Luis Rodríguez Otero y Dr. Eduardo Yus Respaldiza, por su visión crítica de todo el trabajo y sin cuya ayuda, apoyo y esfuerzo no habría logrado realizar este largo proyecto.

A Marisa Sanjuán, que en todo momento me animó a seguir adelante y a no abandonar esta segunda carrera.

A Javier que también sabe lo que es hacer una Tesis.

A Tania, del Aula de Productos Lácteos, y todas las chicas que estuvieron allí, que tanta paciencia demostraron con la llegada, a veces sin previo aviso, de muestras para su análisis.

A los veterinarios del Laboratorio de Sanidad y Producción Animal por las numerosas muestras analizadas, y en especial a Carmen Calvo y Santi, por enseñarme lo que es un laboratorio y por explicarme el “increíble y maravilloso mundo de la PCR”.

A Fco. Javier G^a Peña, por analizar tantas y tantas muestras como le envíe, así como por ayudarme con la explicación de los temas de laboratorio.

A la empresa Puleva Food, S.L. por colaborar con nosotros en la elaboración de todo el trabajo y en particular a Gonzalo Fuentes, pues con él todas las visitas a granjas fueron más interesantes, formativas y amenas.

A Jose A. Glez da Silva, Amparo Seijas y Elena Soto y en general a la empresa Lactalis, por ayudarnos a dar los primeros pasos en el tema del APPCC.

A todos los ganaderos que durante la realización de los estudios hicieron un hueco en su agenda para atenderme, e invitarme a algún que otro café.

A Gonzalo Fernández y Azucena Mora que siempre estuvieron cuando necesite su ayuda.

A los compañeros que pasaron por la Unidad, Paloma, Miguel, Mari y Carolina, que hicieron las mañanas mucho más amenas.

A M^a Eugenia que me ayudó con los temas en inglés y a Nacho por preparar el ordenador para la realización de los trabajos elaborados durante todo este tiempo.

A mis amigos que aún siguen ahí, a pesar de estar casi ilocalizable durante estos últimos años.

Y como no, a mi familia, padres y hermanas, por todo el cariño y apoyo recibido desde que decidí venir a Lugo.

Los trabajos de esta Tesis han podido realizarse gracias al proyecto con Código PGIDIT03RAG26103PR de la Xunta de Galicia.

INDICE

Capítulo 1

Introducción general	1
1. Sistema de análisis de peligros y puntos de control crítico	2
2. ATP bioluminiscencia	11
3. Infecciones por <i>Listeria</i> spp.	15
4. Infecciones por <i>Campylobacter</i> spp.	25
5. Infecciones por <i>Arcobacter</i> spp.	32
6. Región geográfica donde se realizaron los trabajos	36
7. Perfil de la Tesis	37
8. Referencias bibliográficas	37

Capítulo 2

Desarrollo de un sistema de análisis de peligros y puntos de control crítico en explotaciones de ganado vacuno lechero	49
--	----

Capítulo 3

Aplicación del ATP bioluminiscencia para determinar la limpieza del equipo de ordeño en explotaciones de ganado vacuno	81
--	----

Capítulo 4

Prevalencia y factores de riesgo asociados a <i>Listeria</i> spp. en granjas de vacuno lechero en Galicia	95
---	----

Capítulo 5

Distribución de <i>Arcobacter</i> spp. en heces de ganado vacuno lechero clínicamente sano en Galicia	113
---	-----

Capítulo 6

Prevalencia de <i>Campylobacter</i> spp. en explotaciones de ganado vacuno lechero en Galicia	127
---	-----

Capítulo 7

Discusión general 137

Capítulo 8

Conclusiones 147

Capítulo 9

Resumen 151

Capítulo 10

Summary 155

ABREVIATURAS

APPCC: Análisis de peligros y puntos de control crítico

ATP: Adenosín trifosfato

BP: Buenas prácticas

BC: Bacterial count

cel: Células

cfu: Unidades formadoras de colonias

CMT: Californian mastitis test

EH: Estándares de higiene

ELISA: Ensayo inmunoenzimático

ERHA: Eastern Regional Health Authority

HACCP: Hazard analyses and critical control point

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

IDF: International Dairy Federation

ICMSF: Comisión Internacional en Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos

IGE: Instituto Galego de Estatística

kg: Kilogramo

l: Litro

LIGAL: Laboratorio Interprofesional Galego de Análise do Leite

LRB: Logaritmo decimal del recuento bacteriano

LURL: Logaritmo decimal de las unidades relativas de luz

LURLcol: Logaritmo decimal de las unidades relativas de luz de los colectores

LURLpc: Logaritmo decimal de las unidades relativas de luz de los puntos de conexión al
circuito

LURLpz: Logaritmo decimal de las unidades relativas de luz de las pezoneras

LURLuf: Logaritmo decimal de las unidades relativas de luz de las unidades finales

MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

ml: Mililitro

mm: Milimetro

µg: Microgramo

µl: Microlitro

µm: Micrometro

OMS: Organización Mundial de la Salud
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PCC: Punto de control crítico
RB: Recuento bacteriano
RCS: Recuento de células somáticas
SCC: Somatic cell count
SD: Desviación estándar
Sig: Grado de significación
ufc: Unidades formadoras de colonia
URL: Unidades relativas de luz

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. SISTEMA DE ANÁLISIS DE PELIGROS Y PUNTOS DE CONTROL CRÍTICO

Aspectos históricos

El concepto de análisis de peligros y puntos de control crítico (APPCC) tiene su origen en los proyectos de producción e investigación alimentaria para el programa espacial de la Pillsbury Company que desarrolló el sistema junto con la National Aeronautics and Space Agency. Comenzó a funcionar en 1959, en la producción de alimentos para consumo en las cápsulas espaciales, con objeto de evitar la contaminación con microorganismos patógenos, toxinas o agentes químicos o físicos que pudiesen anular la misión espacial. Para ello se desarrolló este sistema preventivo, con el cual se controlaban los materiales, el ambiente y el personal implicados, así como los procesos de producción, almacenamiento y distribución de cada alimento, acompañado de un adecuado registro de datos que facilitaba su trazabilidad, garantizando que el alimento fuera seguro, sin depender exclusivamente del análisis del producto final (Pierson y Corlett, 1992; Hulebak y Schlosser, 2002).

El sistema APPCC se presentó públicamente por primera vez en 1971 en la National Conference on Food Protection y el primer documento lo publicó la Pillsbury Company en 1973, siendo utilizado por la Food and Drug Administration para controlar un problema de botulismo en alimentos enlatados bajos en acidez (Hulebak y Schlosser, 2002).

Actualmente las definiciones y principios del método APPCC se basan en la guía elaborada por el National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods en 1989 (Pierson y Corlett, 1992). Ese mismo año, el Codex Alimentarius incluyó el término APPCC con sus siete principios y posteriormente, en 1993, adoptó la guía para su aplicación en el anexo II de la Comisión del mencionado organismo. Desde ese momento esta metodología es reconocida internacionalmente por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) como un sistema efectivo para garantizar la producción de alimentos seguros, sanos e inocuos (FAO, 1998).

La metodología APPCC adquirió carácter oficial en la Unión Europea mediante la Directiva 93/43/CEE, entrando en vigor en diciembre de 1995. Esta directiva enumera los

7 principios que hacen falta para desarrollar el APPCC. El 12 de enero de 2000, la Comisión Europea adoptó el Libro Blanco sobre seguridad alimentaria, en el que se introduce la elaboración de guías de buenas prácticas de higiene y el sistema APPCC para que las empresas alimentarias identifiquen las actividades que son críticas para garantizar la seguridad de los alimentos (Comisión de las Comunidades Europeas, 2000).

Concepto, objetivos y fundamentos

El término APPCC proviene del inglés “Hazard Analysis Critical Control Point” (HACCP). También se puede denominar análisis de peligros en puntos de control crítico (APPCC), análisis de riesgos e identificación y control de puntos críticos (ARICPC) o método de los puntos críticos de inspección para el análisis de riesgos (PCCAR) (Mouwen y Prieto, 1998).

El concepto de APPCC fue definido por Mayes en 1992 como “un planteamiento sistemático para identificar y evaluar los peligros y riesgos microbiológicos asociados a la fabricación, distribución y uso de un determinado producto y sus medidas de control” (Hulebak y Schlosser, 2002).

El APPCC es un sistema preventivo del control de la calidad de un alimento, que puede aplicarse en cualquier punto de la cadena alimentaria en donde podría producirse un peligro de contaminación. Identifica los problemas antes de que aparezcan y aplica las medidas de control que son críticas para maximizar la seguridad alimentaria en cada etapa de producción (Cullor, 1997; Mortimore y Wallace, 2001). La implementación de este sistema no significa la completa eliminación de los peligros, sino su prevención y reducción a niveles que minimizan el riesgo de enfermedad de origen alimentario (Hulebak y Schlosser, 2002).

Los objetivos del APPCC son utilizar los resultados obtenidos con la monitorización de un procedimiento para identificar y cuantificar la magnitud del peligro y corregir los factores de riesgo (Gardner, 1997), y proporcionar la documentación que garantice que el proceso de producción está bajo control y es seguro (Hulebak y Schlosser, 2002). Constituye, por

tanto, la herramienta ideal para llevar a cabo el autocontrol por parte de las industrias alimentarias (Mouwen y Prieto, 1998).

Uno de los pilares del plan de APPCC es un documento escrito, manual u hoja de trabajo, con todos los procedimientos a realizar según sus principios y del cual debe tener copia todo el personal implicado en su desarrollo (Escriche y Doménech, 2004). Por lo tanto, la aplicación del plan APPCC se basa en la documentación en todas las fases para demostrar su funcionamiento, la verificación interna y externa y la revisión periódica del sistema para garantizar su efectividad (Ropkins y Beck, 2002).

Los beneficios que conlleva la aplicación de este sistema son los siguientes: aumenta la calidad y la seguridad alimentaria, proporciona confianza a los consumidores, facilita los intercambios comerciales, se puede aplicar a toda la cadena alimentaria, es flexible y aporta una evidencia documentada (Noordhuizen y Welpelo, 1996). Es esencial que el sistema se aplique a toda la cadena de producción (Mortimore y Wallace, 2001) y que sea capaz de adaptarse a los cambios en dicho proceso productivo (FAO, 1998). Actualmente es el método más efectivo para controlar las enfermedades de origen alimentario (Ropkins y Beck, 2002).

Etapas y principios del sistema

Los 7 principios que componen el APPCC (tabla 1.1) se agrupan en evaluación de riesgos, gestión de riesgos y documentación, realizados en 12 etapas (Noordhuizen y Welpelo, 1996; Hogue y col., 1998).

Tabla 1.1: Los 7 principios del sistema de análisis de peligros y puntos de control crítico según el Codex Alimentarius (Van Schothorst, 2004)

Principio 1	Analizar los peligros
Principio 2	Determinar los puntos de control crítico
Principio 3	Establecer los límites críticos
Principio 4	Establecer un sistema de monitorización para controlar los puntos de control crítico
Principio 5	Establecer las acciones correctoras
Principio 6	Establecer la documentación y los registros de los principios y su aplicación
Principio 7	Establecer verificaciones para confirmar que el sistema funciona correctamente

1. Creación de un equipo de trabajo

Será multidisciplinar e incluirá al personal representativo de las distintas áreas implicadas en el proceso de producción, aunque puede ser necesario el consejo de expertos externos en determinados aspectos. El número adecuado de personas oscila entre 4 y 6 (Noordhuizen y Welpelo, 1996; Mortimore y Wallace, 2001).

Es fundamental que todo el personal conozca el sistema, los beneficios que aporta y los recursos necesarios (Mortimore y Wallace, 2001). Las funciones de cada uno de los miembros estarán bien definidas (FAO, 1998) y las primeras tareas del equipo serán limitar la extensión del estudio para que sea manejable e identificar los peligros a controlar en cada fase de la cadena de producción (Van Schothorst, 2004).

2. Descripción del producto

Se realiza una descripción completa del producto: ingredientes y materias primas, propiedades químicas y físicas y características del procesado (FAO, 1998).

Una vez el producto esté terminado, la etiqueta debe indicar la información de su elaboración, envasado y almacenamiento, con las instrucciones y requisitos legislativos (Pierson y Corlett, 1992; Cullor, 1995b).

3. Identificación de la intención de uso

Se describe el uso esperado que le dará el consumidor al producto y se tendrá en cuenta a la población a la que va destinado, es decir, se indica el mercado al que va dirigido el producto (Noordhuizen y Welpelo, 1996).

4. Construcción de un diagrama de flujo

Es la descripción o imagen esquemática del proceso de producción que sirve como guía (Van Schothorst, 2004). Se desarrollará a nivel sectorial y de manera individual, incluyendo toda la información complementaria que sea relevante, pero procurando no sobrecargarlo (Ropkins y Beck, 2002; Escriche y Doménech, 2004).

La realización de este diagrama simplifica la gestión y comprensión del procedimiento del APPCC (Ropkins y Beck, 2002). Se elabora tras las entrevistas con el personal y la

observación de las distintas operaciones para obtener el producto, pudiendo apoyarse en los planos de las instalaciones. Se puede utilizar en su elaboración un modelo como guía del diagrama (FAO, 1998).

5. Verificación “in situ” del diagrama de flujo

Esta verificación es una primera revisión de los peligros. El equipo de trabajo debe comprobar el diagrama mediante la observación de todas las etapas de producción para realizar modificaciones cuando sea necesario (Pierson y Corlett, 1992).

6. Principio 1: Analizar los peligros

Se establecen los peligros en cada fase del proceso, clasificándose en cuanto a la gravedad de los efectos adversos producidos y la probabilidad de aparición. Con la ayuda del diagrama de flujo se pueden identificar todos los peligros potenciales en cada una de las etapas cuya prevención, eliminación o reducción a niveles aceptables sea esencial para la producción de alimentos seguros (Noordhuizen y col., 1997).

Se considera **peligro** cualquier agente presente en un alimento capaz de provocar un efecto adverso en la salud del consumidor como consecuencia de su ingestión (Mortimore y Wallace, 2001). La FAO define el peligro como “cualquier agente biológico, físico o químico que puede hacer que un alimento no sea seguro para el consumo” (FAO, 1998).

Específicamente se definen los peligros físicos como partículas o materiales extraños, como restos del material de envasado, que pueden estar presentes de manera anormal en el alimento y ser portadores de peligros microbiológicos (Escriche y Doménech, 2004).

Los peligros químicos son sustancias potencialmente tóxicas que pueden provocar la muerte, intoxicaciones crónicas de tipo acumulativo o cancerígeno o reacciones alérgicas. Se clasifican en (Mortimore y Wallace, 2001):

- productos químicos naturales como las micotoxinas y los alérgenos
- productos químicos añadidos como los plaguicidas, los productos de limpieza y los residuos de medicamentos
- productos químicos provenientes del material de envasado como el plomo

Los peligros biológicos pueden provocar dos consecuencias graves como son la transmisión de enfermedades y la alteración de la calidad del producto terminado mediante la modificación de las características organolépticas (Escriche y Doménech, 2004). Se distinguen peligros microbiológicos (moscas o insectos) y peligros microbiológicos (bacterias, virus, parásitos y mohos productores de micotoxinas) (Mortimore y Wallace, 2001; Escriche y Doménech, 2004). Hacen referencia, sobre todo, a las enfermedades de origen alimentario asociadas a productos crudos contaminados, ya que la mayoría de los microorganismos se destruyen o inactivan tras un tratamiento térmico o se minimizan mediante un manejo y almacenamiento adecuado del alimento (FAO, 1998).

El **riesgo** es una estimación de la probabilidad de aparición y gravedad de un peligro (Pierson y Corlett, 1992). El análisis de riesgos o peligros consiste en tres pasos:

a) *Evaluación de riesgos o peligros*

Se refiere a la identificación y cuantificación de los riesgos y se divide en tres pasos interrelacionados entre sí: i) identificación de todos los peligros que puedan estar asociados al producto, ii) caracterización del peligro mediante una evaluación cuantitativa y/o cualitativa de la gravedad de los efectos adversos relacionados, iii) evaluación cuantitativa y/o cualitativa de la probabilidad de aparición del peligro (FAO, 1998; Hulebak y Schlosser, 2002).

Tanto la gravedad como la probabilidad de un peligro pueden ser categorizadas como alto, medio y bajo o nulo. En muchos casos no hay datos suficientes para realizar una evaluación cuantitativa de los riesgos asociados a peligros biológicos, por lo que la única alternativa es la evaluación cualitativa (FAO, 1998).

b) *Gestión de riesgos o peligros*

Uno de los puntos más importantes del sistema APPCC es establecer las medidas preventivas o de control, una vez identificados los peligros (Noordhuizen y Welpelo, 1996; Mortimore y Wallace, 2001). Las medidas de control son factores o actividades que se utilizan para prevenir, eliminar o reducir un peligro hasta un nivel aceptable (FAO, 1998). Cuando no existen mecanismos por los que un peligro pueda ser controlado en todo el proceso y el riesgo asociado a él sea inaceptable, el método de producción debería modificarse (Ropkins y Beck, 2002).

c) *Comunicación de riesgos o peligros*

Es un proceso interactivo de intercambio de información entre el personal implicado en el análisis y terceras partes interesadas (FAO, 1998).

El análisis de peligros implica realizar un estudio de las condiciones de producción, manejo, almacenamiento, envasado, distribución y consumo de un alimento y permite identificar aquellas áreas que pueden contribuir a la aparición de un peligro, determinándose así los puntos de control crítico (PCCs) (Pierson y Corlett, 1992).

La identificación de los peligros varía en función del tipo de industria y del producto final; por ejemplo, en una fábrica de conservas se considera peligro biológico la presencia de toxina botulínica, mientras que en una industria cárnica un peligro es la contaminación con microorganismos saprofitos intestinales (Mouwen y Prieto, 1998).

7. Principio 2: Determinar los puntos de control crítico

Un PCC es cualquier punto, etapa o proceso en la cadena alimentaria donde mediante la aplicación de una serie de medidas el peligro puede ser evitado, eliminado o reducido a un nivel aceptable. La pérdida de control de un PCC podría conducir a un riesgo inaceptable de seguridad alimentaria (Noordhuizen y col., 1997; Cullor, 1997b; Hulebak y Schlosser, 2002).

Las características idóneas de un PCC son (Pierson y Corlett, 1992):

- estar relacionados con el peligro
- ser específicos, cuantificables o su valoración debe ser si/no
- los criterios para establecerlos se basan en la literatura científica
- estar disponible la tecnología para controlarlos y a coste bajo
- la monitorización es continua
- al controlarlos se eliminan o reducen los peligros potenciales

Los PCCs se eligen en función de los factores de riesgo o peligros identificados (Noordhuizen y col., 1997), pudiendo haber más de un PCC para un peligro. Todos los PCCs deben estar interconectados a través del sistema de monitorización y vigilancia (Noordhuizen y Frankena, 1999).

Una operación controlada con un número excesivo de PCCs puede hacer que la aplicación del sistema sea difícil de implementar, monitorizar y documentar (Panisello y col., 2000). Por ello, se utiliza un árbol de decisiones que consiste en una serie lógica de preguntas que se responden para cada peligro identificado en cada etapa en la que pueda aparecer. El objetivo es seleccionar los PCCs imprescindibles para hacer el sistema compatible con los recursos humanos y económicos disponibles (Pierson y Corlett, 1992; Escriche y Doménech, 2004).

Si el sistema APPCC sugiere que en cierta etapa no es posible controlar el peligro y éste no se elimina o reduce a un nivel aceptable en un paso posterior, el proceso debería modificarse eliminando esta etapa o incluyendo una medida de control anterior o posterior (Van Schothorst, 2004).

8. Principio 3: Establecer los límites críticos

Representan el límite de seguridad, es decir, son el criterio que debe cumplir cada PCC para obtener alimentos seguros. Puede haber más de un parámetro de evaluación por cada PCC identificado (FAO, 1998).

Estos límites críticos son los niveles de tolerancia y objetivo. El nivel objetivo es más estricto y se utiliza para reducir el riesgo de desviación cuando existe una tendencia hacia la pérdida de control en el PCC, asegurando que nunca suceda una alteración con respecto al límite crítico de tolerancia (Noordhuizen y Welpelo, 1996; Hulebak y Schlosser, 2002).

Los límites críticos se basan en los textos o normas legales y/o en el conocimiento científico relacionado con el tipo de peligro a controlar. Pueden ser químicos (niveles de micotoxinas, pH), físicos (temperatura del tanque refrigeración) o microbiológicos (ausencia de *Listeria monocytogenes*) (Mortimore y Wallace, 2001; Escriche y Doménech, 2004).

9. Principio 4: Establecer un sistema de monitorización para controlar los PCCs

Consiste en programar una serie de medidas, pruebas y observaciones en un PCC que demuestren que está bajo control, es decir, dentro de los límites críticos. El sistema debe proporcionar un aviso de alarma precoz que ayude a prevenir o minimizar la alteración del

producto cuando hay desviaciones e indique la causa del problema (Hogue y col., 1998; Van Schothorst, 2004).

Las acciones de monitorización deben ser rápidas y específicas de cada PCC, depender de los límites críticos y su objetivo será garantizar que cada PCC esté siempre bajo control (Pierson y Corlett, 1992). La monitorización puede realizarse de manera continua o discontinua, con periodicidad suficiente para garantizar el control del PCC (Mortimore y Wallace, 2001).

10. Principio 5: Establecer las acciones correctoras

Estas acciones deben eliminar el peligro potencial creado por una desviación del límite crítico en un PCC determinado (Hogue y col., 1998; Ropkins y Beck, 2002) para garantizar la seguridad del producto final y prevenir otra posible desviación (Van Schothorst, 2004). La diversidad de posibles desviaciones en cada PCC puede hacer necesario la existencia de más de una medida correctora (FAO, 1998).

11. Principio 6: Establecer la documentación y los registros de los principios y su aplicación

La documentación supone una prueba escrita del desarrollo de todas las actividades que permite un seguimiento retrospectivo y posibilita la verificación del sistema. Los registros son la única referencia disponible que asegura la trazabilidad del producto. La documentación contendrá las actas de las reuniones del equipo, el diagrama de flujo y los registros de la identificación de peligros, las medidas preventivas, la vigilancia de los PCCs, etc. (Pierson y Corlett, 1992; Cullor, 1995b; Escriche y Doménech, 2004).

12. Principio 7: Establecer verificaciones para confirmar que el sistema funciona correctamente

La verificación proporciona información adicional para garantizar que la aplicación del sistema APPCC conlleva la producción de alimentos seguros (Van Schothorst, 2004). La realización de verificaciones periódicas mejora el plan establecido al trabajar sobre los puntos débiles y eliminar las medidas innecesarias (FAO, 1998). Se pueden identificar varios pasos en el proceso de verificación: i) revisar que los límites críticos de los PCCs son adecuados y suficientes, ii) verificar los registros para garantizar que el plan APPCC

funciona correctamente, iii) realizar una inspección de todo el proceso y un informe por escrito (Mortimore y Wallace, 2001; Hulebak y Schlosser, 2002).

Generalmente la verificación de un sistema se realiza mediante una auditoria interna o externa. La auditoria es un examen sistemático e independiente para determinar si las actividades y los resultados obtenidos cumplen con los procedimientos establecidos, son adecuados para alcanzar los objetivos fijados y si se implementan correctamente (Couto y Factor, 2000).

La certificación es una forma específica de verificación, normalmente realizada por una tercera parte independiente, cuyo objetivo es comprobar si el sistema APPCC se realiza según el estándar. No está entre sus funciones emitir un juicio sobre la seguridad del producto (Van Schothorst, 2004).

Debe revisarse la aplicación del sistema APPCC y hacer los cambios necesarios cuando se producen modificaciones en el producto o en el proceso (FAO, 1998).

2. ATP BIOLUMINISCENCIA

Fundamento

La quimioluminiscencia se produce cuando una molécula emite un fotón como resultado de una reacción química exogénica en la que uno de los productos intermedios o finales queda en un estado electrónico excitado. Cuando el producto excitado transfiere su energía a otra sustancia con características adecuadas de fluorescencia se produce la luminiscencia (Gorus y Schram, 1979). La bioluminiscencia es un caso especial de quimioluminiscencia, propuesta en 1960 como una técnica para estimar la actividad microbiana en los procesos biológicos (Chu y col., 2000).

Por otra parte, todos los microorganismos vivos se pueden detectar midiendo su energía celular que se encuentra en forma de adenosin trifosfato (ATP). El ATP no está asociado a células muertas, ni es absorbido por superficies o coloides, por lo que existe una

proporción constante entre la concentración de ATP y el número de células o bacterias viables. Por lo tanto, la determinación de la cantidad de ATP es una estimación fiable de los microorganismos metabólicamente activos presentes, ya que la concentración de ATP de una célula viva permanece relativamente constante, pudiendo variar ligeramente según las condiciones ambientales y la fase de crecimiento (Lai-King y col., 1985; Griffiths, 1993; Corbitt y col., 2000; Venkateswaran y col., 2003).

La cantidad de ATP se mide mediante la bioluminiscencia generada en una reacción estequiométrica:



Esta reacción se produce cuando una forma reducida de luciferina (fenol heterocíclico termoestable) junto con una molécula de ATP en presencia de luciferasa (enzima termoestable) se libera como oxiluciferina, es decir, se produce una descarboxilación oxidativa de la luciferina y la liberación de fotones. Por cada molécula de ATP consumida se produce un fotón (Green y col., 1999; Puig-Durán, 2002; Delahaye y col., 2003).

El complejo enzimático luciferina-luciferasa que es específico para la medición de ATP se detectó por primera vez de manera natural en la cola de la luciérnaga *Photinus pyralis* (Aycicek y col., 2006).

Cuando la reacción de la bioluminiscencia se realiza en condiciones óptimas, la señal lumínica resultado del balance entre reducción y oxidación es estable durante horas; no obstante, en condiciones de campo la emisión de luz será menor porque depende de la demanda de oxígeno activo (Champiat y col., 2001).

La luz producida en la bioluminiscencia se mide en un tubo detector multiplicador y se expresa en unidades relativas de luz (URL) cuantificadas mediante un fotómetro o luminímetro (Gorus y Schram, 1979; Murphy y col., 1998; Champiat y col., 2001).

Con la ATP bioluminiscencia se han logrado límites de detección de 10^{-5} $\mu\text{g/l}$ ó $\mu\text{g/kg}$ de ATP en la muestra (Puig-Durán, 2002). Usando tests con soluciones estándar de ATP, 1 $\mu\text{g/l}$ de ATP debería producir una intensidad de luz de 1036 URLs (Chu y col., 2000).

Utilidades

En la implementación de programas de APPCC, la ATP bioluminiscencia ha sido utilizada en la rápida detección de microorganismos vivos y su monitorización y, en general, en la valoración de la contaminación (Champiat y col., 2001).

Monitorización de la higiene

La higiene de las superficies, instrumentos y equipos en la industria alimentaria afecta a la calidad de los productos procesados, siendo las biopelículas uno de los principales problemas en la higienización de los equipos como consecuencia de la liberación de las bacterias que pueden contener (Oulahal-Lagsir y col., 2000).

La ATP bioluminiscencia es un sistema rápido de monitorización de la higiene. Se ha demostrado su utilidad en superficies y equipos de la industria alimentaria, al detectar contaminación de origen microbiano y de origen orgánico. La monitorización de la higiene es probablemente el uso de esta técnica más frecuente en la industria alimentaria; así, las superficies de plantas de procesamiento, de vehículos para el transporte y de equipos de ordeño en las granjas lecheras han sido evaluadas (Murphy y col., 1998; Oulahal-Lagsir y col., 2000).

Las superficies que presentan lecturas bajas de ATP implican ausencia de contaminación, pero si son altas sólo indicaran presencia de ATP, que puede proceder de microorganismos vivos o de otras fuentes orgánicas (Poulis y col., 1993). Una superficie de contacto con alimentos limpia estará libre de ATP (Nieuwenhof, 1996), ya que la mayoría de los productos desinfectantes inhiben la actividad metabólica y alteran la membrana celular, disminuyendo la emisión de luz (Puig-Durán, 2002).

Los resultados de las lecturas pueden verse influenciados por factores ambientales tales como el pH, la temperatura, la concentración iónica, los restos de detergentes y

desinfectantes que alteran a los componentes implicados en la reacción, provocando una disminución de la cantidad de luz emitida (Nieuwenhof, 1996; Green y col., 1999; Venkateswaran y col., 2003).

Los valores obtenidos con la medición del ATP y el uso de los cultivos microbiológicos son compatibles; sin embargo, es difícil establecer una relación entre la microbiología tradicional y la medición del ATP, puesto que las técnicas miden poblaciones microbianas diferentes. Cuando el ATP total es bajo, la microbiología tradicional es más sensible; por ejemplo, si hay esporas el contenido de ATP será menor que si hay formas vegetativas. A pesar de esto, la bioluminiscencia es capaz de detectar bajos niveles de microorganismos. La medición de valores altos de ATP no implica necesariamente presencia de bacterias (Poulis y col., 1993; Davidson, y col., 1999; Chu y col., 2000).

En función del ratio ATP/ufc se pueden establecer hipótesis sobre el tipo y actividad de los microorganismos que están presentes. Si la relación es baja, puede deberse a la presencia de bacterias Gram negativas o formas de resistencia bacteriana (esporas). Si la relación es alta podría tratarse de levaduras o bacterias Gram positivas, con una actividad metabólica elevada (Venkateswaran y col., 2003).

Por lo tanto, la utilización de la ATP bioluminiscencia como método de evaluar los equipos de la industria alimentaria no sustituye la cuantificación de la carga microbiana por los métodos tradicionales (Aycicek y col., 2006).

Otras utilidades

1. Evaluación de la calidad microbiológica de la leche cruda y pasteurizada. Se han desarrollado diferentes métodos basados en la ATP bioluminiscencia para estimar la carga bacteriana en la leche; sin embargo, muchos carecen de la sensibilidad suficiente como consecuencia de las altas concentraciones de ATP no bacteriano presente (asociado a las micelas de caseína o en las células somáticas) (Brovko y col., 1991; Samkutty y col., 2001). La concentración bacteriana mínima capaz de detectarse es 10^6 unidades formadoras de colonia por mililitro (ufc/ml) (Griffiths, 1993). Diversas investigaciones han estudiado el modo de mejorar la sensibilidad, incorporando un paso de filtración u otros procedimientos para concentrar las bacterias, junto con una lisis selectiva de las

células somáticas. Con estos procedimientos se consigue aumentar el límite de detección hasta 10^4 ufc/ml en 5 ó 10 minutos (Griffiths, 1993).

Además, la estimación de las concentraciones de células somáticas podría utilizarse como un índice para la detección de mamitis (Griffiths, 1993).

2. Evaluación de la presencia de enzimas de importancia para la elaboración de productos lácteos como proteasas, lipasas, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, etc. (Griffiths, 1993).

3. Evaluación de la higiene de la piel de la ubre de las vacas antes del ordeño. Se sabe que el control de las mamitis y la calidad de la leche están asociados a las prácticas higiénicas aplicadas en la preparación de la vaca para el ordeño (Finger y Sischo, 2001).

4. Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de enterobacterias, cocos Gram positivos, etc. (Wheat y col., 1989).

5. En el diagnóstico de infecciones del tracto urinario tiene suficiente sensibilidad para detectar hasta 10^5 ufc/ml, límite considerado para la existencia de infección (Kolbeck y col., 1985; Selan y col., 1992).

3. INFECCIONES POR *LISTERIA* SPP.

Aspectos históricos

Hülphers, en 1911, aisló un microorganismo llamado *Bacillus hepatis* de focos necróticos de hígado de conejo. En 1924, Murray aisló a partir de sangre de conejos con leucocitosis mononuclear pequeños bacilos Gram positivos que denominaron *Bacterium monocytogenes*. En 1927, Pirie aisló *Listerella hepatolytica* a partir de un gerbo y comprobó que era el mismo microorganismo que *Bacterium monocytogenes*, con lo que cambió el nombre a *Listerella monocytogenes*. En 1940 este término fue modificado a *Listeria monocytogenes* y adoptado en la sexta edición del Manual Bergey de Bacteriología Sistemática, siendo aprobado en 1954 por la Comisión Judicial en

Nomenclatura y Taxonomía Bacteriológica (Cooper y Walker, 1998; Bell y Kyriakides, 2000).

El primer caso de listeriosis en personas fue confirmado en 1929 por Nyfeldt. Sin embargo, fue en la década de los 80 cuando se produjo un aumento importante en el número de casos de listeriosis asociados al consumo de alimentos contaminados (Amaro, 2002).

Etiología

Listeria spp. son bacilos Gram positivos que miden aproximadamente $0,5 \mu\text{m} \times 0,5$ a $2 \mu\text{m}$. Son ligeramente móviles, ya que presentan de 1 a 6 flagelos peritricos. Bioquímicamente son catalasa positivas, oxidasa e indol negativas, hidrolizan la esculina y fermentan la glucosa (Low y Donachie, 1997; Quinn y col., 2004).

Son bacterias no esporuladas y anaerobios facultativos, pudiendo crecer en ambientes con una concentración de CO_2 del 10% (Cooper y Walker, 1998). Crecen bien en medios comunes como agar sangre o MacConkey, aunque suelen necesitar medios selectivos. Las colonias típicas son redondeadas, translúcidas, verde-azuladas y brillantes con una superficie de textura fina. *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* presentan zonas de β -hemólisis, mientras que *L. ivanovii* presenta una amplia zona de hemólisis (Ryser y Marth, 1991; Quinn y col., 2004).

Dentro del género *Listeria* se engloban 6 especies, según la última edición del Manual Bergey de Bacteriología Sistemática de 1986 (Quinn y col., 2004):

- no patógenas: *L. innocua*, *L. grayi* y *L. welshimeri*
- patógenas y hemolíticas: *L. seeligeri*, *L. ivanovii* (*L. ivanovii* subespecie *ivanovii* y *L. ivanovii* subespecie *londoniensis*) y *L. monocytogenes*

L. monocytogenes es la única reconocida como patógena en humanos, sin embargo, también se han aislado en personas *L. ivanovii* y *L. seeligeri* (Donnelly, 1990; Quinn y col., 2004).

Actualmente dentro de las especies de *Listeria* se distinguen 16 serovares o serotipos, no específicos de especie, en base a los antígenos somático “O” y flagelar “H”. Los más frecuentes en presentación y asociados a enfermedades son 1/2a, 1/2b y 4b (Wiedmann, 2003; Quinn y col., 2004).

En cuanto a su resistencia fisico-química, indicar que *L. monocytogenes* es un microorganismo mesófilo o psicrotrofo que puede sobrevivir en condiciones adversas para otras bacterias en un intervalo de temperaturas entre los 3 y los 45°C, con un óptimo entre 30 y 37°C. Es capaz de crecer a temperaturas de refrigeración y al cambio de temperatura del tanque de refrigeración de las granjas cuando se añade leche recién ordeñada (Blenden y col., 1987; Donnelly, 1990; Bell y Kyriakides, 2000).

Los parámetros mínimos requeridos por la Pausteurized Milk Ordinance para garantizar la destrucción de *Listeria* son 71,7°C durante 15 segundos, por lo tanto, es importante realizar una pasteurización correcta. No obstante, algunas teorías abogan que es capaz de sobrevivir a la pasteurización gracias a su localización intracelular en los leucocitos (Bunning y col., 1992; Hahn, 1996; Wiedmann, 2003).

El rango de pH para su supervivencia en el ambiente es de 4,4 a 9,6, siendo el punto crítico para su crecimiento pH 5,5, con un óptimo a pH neutro. En ensilados puede multiplicarse a pH igual o superior a 4,5 (Cullor, 1995a; Wiedmann, 2003).

Sobreviven sin multiplicarse durante períodos prolongados en productos con baja actividad de agua, es halotolerante, capaz de crecer con un 20% de ClNa y persistir un año a pH 6 con el 16% de ClNa (Bell y Kyriakides, 2000). Es sensible a numerosos desinfectantes comunes como los hipocloritos, el amonio cuaternario, el dodecilsulfato, etc. (Bell y Kyriakides, 2000).

Epidemiología

Listeria spp., además de los rumiantes, puede infectar a numerosas especies animales como las aves, peces, crustáceos, insectos y roedores (Cullor, 1995a). En monogástricos, la listeriosis es menos común (Low y Donachie, 1997). La tasa de morbilidad media en los

rumiantes oscila entre un 0,2 y 8%, aunque en diversos países europeos como Noruega, Holanda, Reino Unido, Francia y Alemania las infecciones por *Listeria* spp. en rumiantes se presentan con una alta incidencia, mientras que en España no existe mucha información, por lo que su importancia podría estar subestimada (Vázquez-Boland y col., 1996; Contreras y col., 1997).

En rumiantes, los animales más susceptibles son los adultos y los menores de 5 meses (Bastien y Brouillet, 2000). Los factores que causan estrés o las enfermedades que alteran la resistencia de los animales a la infección por *Listeria* spp. favorecen la excreción de estas bacterias (Blenden y col., 1987; Vishinsky y col., 1993).

L. monocytogenes es una bacteria ubicua que se ha aislado del suelo, vegetales, materia fecal, aguas residuales y material en descomposición. También en alimentos para animales como ensilados y en alimentos de origen animal como leche (Pak y col., 2002; Wiedmann, 2003).

Pueden actuar como reservorios los pastos, las aguas estancadas, los ensilados y los animales domésticos o silvestres portadores asintomáticos. Aproximadamente entre el 2% y el 8% de la población sana, tanto en humanos como en animales, son portadores fecales asintomáticos, por lo que algunos autores consideran esta bacteria parte de la flora normal del tracto intestinal (Cooper y Walker, 1998; Bell y Kyriakides, 2000). Los animales y la especie humana pueden excretar *L. monocytogenes* a través de las heces durante 3 años sin presentar signos clínicos (Cullor, 1995a; Vázquez-Boland y col., 2001). Este tipo de excreción está asociada al consumo de alimentos contaminados con esta bacteria (Husu, 1990).

Las fuentes de infección para los animales son diversas: las heces de animales portadores que contaminan el agua de bebida y los alimentos, las camas y los suelos de los establos. La principal fuente de contagio para el ganado es el ensilado (Cullor, 1997a; Bastien y Brouillet, 2000). La asociación entre consumo de ensilado de mala calidad y listeriosis en rumiantes fue confirmada en 1960 (Husu, 1990). Un factor que puede contribuir a aumentar la incidencia de listeriosis por consumo de ensilado son los altos niveles de hierro, factor de crecimiento para *Listeria* spp. (Quinn y col., 2004).

En la figura 1.1 se muestra el ciclo infectivo de *Listeria spp.* en los rumiantes. Las camas y los suelos de los establos pueden estar contaminados por una higiene deficiente (Cooper y Walker, 1998). Las listerias pueden sobrevivir más de 8 meses en invierno, incluso hasta 2 años en suelos húmedos y de 1 a 18 meses en heces (Husu, 1990; Brisabois y col., 1997).

En la leche puede persistir sin inactivarse a un pH 6,6-6,8 y es capaz de multiplicarse en los procesos de maduración de determinados quesos (Brisabois y col., 1997; Pak y col., 2002), aunque su crecimiento está condicionado a la presencia de glucosa (Bunning y col., 1992).

Algunas especies del género *Listeria* pueden aparecer en nichos ambientales similares; así, la presencia de *L. innocua* en la leche se utiliza como indicador potencial de la existencia de *L. monocytogenes* (Donnelly, 1990).

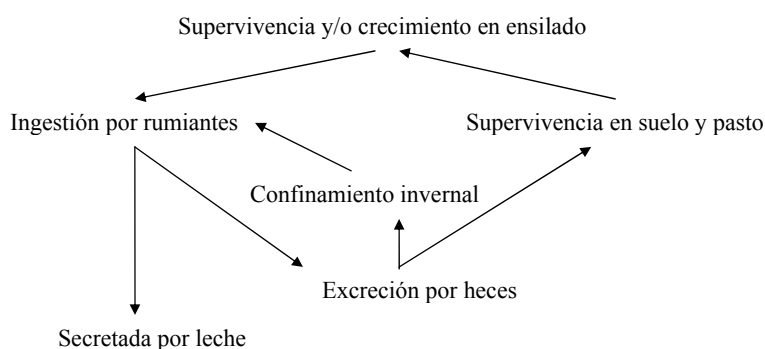


Figura 1.1: Ciclo infectivo de *Listeria spp.* en rumiantes (Ryser y Marth, 1991)

Listeria spp. puede alcanzar la leche de tanque en las explotaciones de vacuno lechero por dos rutas:

1. Vía intramamaria: tras una infección generalizada que cause mastitis, o bien a partir de animales que sufran mastitis subclínicas, aunque sea infrecuente aislar *L. monocytogenes* en vacas con mastitis (Sharp, 1989; Vishinsky y col., 1993; Bourry y Poutrel, 1996).

En este caso de mastitis subclínicas, excepto por el elevado recuento de células somáticas (RCS), la composición de la leche parece normal (Winter y col., 2004) con niveles de

contaminación de *L. monocytogenes* entre 10^3 y 10^5 ufc/ml de leche de cuarterón (Brisabois y col., 1997).

El verdadero peligro de que las listerias pasen a la cadena alimentaria se produce cuando son excretadas por animales sin síntomas clínicos durante meses, después de sufrir mamitis o listeriosis clínica (Cullor, 1997a).

2. Vía extramamaria: de origen ambiental, normalmente asociada a contaminación fecal durante la realización de un ordeño no higiénico (Sharp, 1989; Ryser y Marth, 1991). La contaminación por esta causa tiene una alta frecuencia de presentación con predominio del serogrupo 1/2a (Sanaa y Ménard, 1994).

La prevalencia de *L. monocytogenes* en leche de tanque de refrigeración de granjas en diversos países oscila entre el 1% de Suecia y el 6,5% de EE.UU. (Waak y col., 2002; Van Kessel y col., 2004).

Patogenia

L. monocytogenes es la causa de todos los casos de listeriosis en humanos y del 90% en los animales. Las infecciones por *L. ivanovii* y *L. seeligeri* que afectan a ganado ovino y vacuno son raras en humanos y menos virulentas que las causadas por *L. monocytogenes* (Ryser y Marth, 1991; Cooper, y Walker, 1998).

La vía oral, con la ingesta de alimentos contaminados, es la principal ruta de entrada de *Listeria* spp. tanto en los animales como en el hombre (Contreras y col., 1997; Vázquez-Boland y col., 2001; McLauchlin y col., 2004).

Los rumiantes se alimentan de materia vegetal, cuyas características físicas pueden causar pequeñas heridas en la mucosa oral, por lo que si comen ensilado contaminado estarán constantemente expuestos a *Listeria* spp. (Vázquez-Boland y col., 2001; McLauchlin y col., 2004).

Una de las causas para sufrir listeriosis es la proliferación ilimitada de *L. monocytogenes* en individuos inmunocomprometidos. La exposición reiterada frente a *L. innocua* puede también estimular una inmunidad frente a diferentes especies patógenas de listeria (Instituto de Salud Carlos III, 1998; Vázquez-Boland y col., 2001).

L. monocytogenes es un patógeno que puede afectar a un gran número de tejidos y órganos; sin embargo, las principales formas clínicas de listeriosis tienen como órganos diana el sistema nervioso central y el útero grávido, a los que llegan vía sanguínea (Vázquez-Boland y col., 2001; McLauchlin y col., 2004).

L. monocytogenes sintetiza una β -hemolisina, la listeriolisina O como principal factor de virulencia y mediador de la supervivencia intracelular que está presente en todas las formas patógenas (Bunning y col., 1992; Bourry y Poutrel, 1996).

Formas clínicas

Además de los síntomas generales como depresión, fiebre, debilidad e incluso mamitis en vacuno, clínica o subclínica, las tres principales formas clínicas asociadas a *L. monocytogenes* tanto en personas como en animales son (Blenden y col., 1987; Contreras y col., 1997; Low y Donachie, 1997):

- forma nerviosa, también llamada “enfermedad del círculo” que afecta sobre todo a rumiantes y aparece con relativa frecuencia en rebaños de ovino y caprino
- forma reproductiva, detectada principalmente en rumiantes, pero también en muchas otras especies de animales domésticos, provocando abortos, partos prematuros, etc.
- forma visceral o septicémica que es poco común y si aparece afecta a los neonatos como consecuencia de una infección intrauterina

Diagnóstico

La confirmación del diagnóstico se realiza mediante el aislamiento y posterior identificación de *Listeria* spp. a partir de los órganos afectados (Blenden y col., 1987).

Según la norma de la International Dairy Federation (IDF) 143A:1995 para la detección de *Listeria* spp. se deben seguir al menos tres pasos: i) enriquecimiento en un medio líquido selectivo, ii) aislamiento e identificación presuntiva, iii) confirmación de la identidad (IDF, 1995). En el método clásico de identificación se utilizan galerías API junto con el test CAMP para distinguir entre las especies de listeria (Amaro, 2002).

Existen numerosos métodos para identificar *Listeria* spp. (Bourry y Poutrel, 1996; Low y Donachie, 1997) basados en:

- inmunoensayos: ensayo inmunoenzimático (ELISA) aplicable en alimentos y en detección de mamitis bovinas, técnicas de serodiagnóstico como el “dot-blot” y la fijación de complemento
- pruebas de ADN: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la electroforesis en gel de campo pulsante en productos lácteos
- métodos bioquímicos y otros

Tratamiento

L. monocytogenes es susceptible a la mayoría de los agentes antibacterianos, aunque puede presentar problemas por su localización intracelular. En muchos casos el antibiótico de elección es la ampicilina (Ryser y Marth, 1991).

Puede ocurrir una recuperación espontánea de la enfermedad en ganado vacuno; sin embargo, en ovejas y cabras después de la aparición de los primeros síntomas el tratamiento suele ser ineficaz (Ryser y Marth, 1991; Cooper y Walker, 1998). En vacas con mamitis, la terapia de secado podría eliminar la listeria o reducir la posibilidad de que colonice de forma generalizada la ubre. Los animales que puedan ser portadores crónicos es mejor eliminarlos (Sharp, 1989).

En personas es posible una recuperación espontánea, aunque es mejor aplicar una terapia antibiótica de manera precoz (Low y Donachie, 1997).

Prevención y control

Un método para disminuir la incidencia de la listeriosis, en humanos y en animales, es reducir el número de microorganismos presentes en los alimentos; no obstante, la eliminación total de *L. monocytogenes* de todos los alimentos puede resultar imposible (Bell y Kyriakides, 2000).

Se deben aplicar las medidas higiénicas y sanitarias adecuadas para evitar que *Listeria* spp. entre en la cadena alimentaria. Para ello hay que reducir la incidencia de listerias en las unidades de producción animal, con unas buenas prácticas de manejo, realizando un ordeño higiénico y limpiando adecuadamente la sala y el equipo de ordeño, usando piensos y ensilados de buena calidad, etc.

El control de la calidad del ensilado es uno de los puntos más importantes, debiéndose realizar un buen corte, prensado y sellado y evitar la humedad. Se usará materia prima libre de *Listeria* spp. y cuando se abran los silos, se medirá el pH y chequeará la presencia de mohos. Tampoco se debe usar el ensilado de los bordes, ni de la parte superior, porque en estos puntos la fermentación es menor (Low y Donachie, 1997; Bastien y Brouillet, 2000).

Otra recomendación sería aislar y tratar a los animales enfermos que sufren listeriosis de forma crónica. Después de un brote se deben destruir los cadáveres, el ensilado y el material en contacto con los enfermos y los alojamientos se limpiaran y desinfectaran (Contreras y col., 1997).

Las vacunas con listerias muertas no son eficaces y las elaboradas con listerias vivas o atenuadas, basadas en los serovares 1/2a y 4b de *L. monocytogenes*, no presentan un modelo experimental para probar su eficacia. La vacunación sólo se debe utilizar en aquellos casos donde se presente una alta incidencia de listeriosis clínica para intentar disminuir la prevalencia de la infección y también en rebaños que hayan manifestado la infección de manera recurrente (Ryser y Marth, 1991).

Aspectos zoonóticos

En la década de los 80, se reconoció a la listeriosis como una enfermedad de origen alimentario según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2002). *L. monocytogenes* es responsable del 99% de las listeriosis en personas, siendo los serogrupos 1/2a, 1/2b o 4b los que aparecen en la mayoría de los brotes, aunque no son los que con más frecuencia se encuentran en los alimentos (Hahn, 1996; Wiedmann, 2003).

En los países desarrollados entre 2 y 15 personas por cada millón sufren listeriosis clínica, así se considera que la incidencia de listeriosis es relativamente baja (Pak y col., 2002). Ello es debido a que *L. monocytogenes* tiene un potencial patógeno más bajo que otras bacterias zoonóticas, considerando su amplia distribución y la alta frecuencia de contaminación de los alimentos. La incidencia de listeriosis en humanos es baja, salvo la aparición ocasional de brotes. Otros estudios indican que es una bacteria no adaptada al hombre que actúa como patógeno oportunista (Vázquez-Boland y col., 2001; McLauchlin y col., 2004).

Las principales formas de contagio son la vía oral, la vía respiratoria y la vía cutánea que causa pústulas o pápulas en brazos de veterinarios, ganaderos y trabajadores de laboratorio. Las personas pueden entrar en contacto con el microorganismo a través del consumo de diversos tipos de alimentos contaminados y mediante el contacto con plantas, insectos, aire, arena u otros hombres (infecciones nosocomiales) (Vázquez-Boland y col., 1996; Low y Donachie, 1997).

L. monocytogenes se ha aislado en numerosos tipos de alimentos crudos o cocinados, contaminados posteriormente al tratamiento térmico: leche cruda y pasteurizada, quesos, helados, verduras, embutidos crudos o fermentados, pollo, pescado, etc. (McLauchlin y col., 2004).

Los brotes más importantes de listeriosis en humanos estuvieron relacionados con el consumo de:

1. Vegetales: en 1981 en Canadá hubo 18 muertos por consumo de ensalada de coles (Blenden y col., 1987; Wesley y Ashton, 1991).

2. Productos lácteos: en 1983, 14 muertos por consumo de leche pasteurizada en Massachusetts. En 1985, en California, 42 personas por consumo de queso fresco estilo mejicano (Blenden y col., 1987; Wesley y Ashton, 1991). Durante 1989, en USA se declararon 49 casos por consumo de leche pasteurizada. Entre 1983 y 1987 en Suiza, hubo 32 muertos por consumo del queso Vacherin (Hahn, 1996; Amaro, 2002).

3. Productos cárnicos: en Francia, en 1992, hubo 63 muertos, por consumir lengua de cerdo con gelatina. En el Reino Unido, entre 1987 y 1989, el consumo de paté belga causó más 90 muertos (Amaro, 2002).

La incidencia de listeriosis en humanos en Europa fue máxima en los años 80 (Amaro, 2002) debido, entre otras causas al aumento del consumo de productos preparados y conservados en refrigeración, al aumento de la población susceptible y al aumento en la vigilancia y mejora del diagnóstico (Brisabois y col., 1997). En España existe una Red de Vigilancia Epidemiológica que registra los casos declarados por el Sistema de Información Microbiológico. Este sistema notificó 208 casos de listeriosis entre los años 1988 y 1998 (Instituto de Salud Carlos III, 1998).

En general la listeriosis en humanos se produce de forma esporádica, siendo considerados como grupos de riesgo los recién nacidos, las mujeres embarazadas, las personas mayores y las inmunodeprimidas. En estos grupos de riesgo, la listeriosis puede causar una mortalidad entre un 30% y un 40% (Donnelly, 1990; Vázquez-Boland y col., 1996).

4. INFECCIONES POR *CAMPYLOBACTER* SPP.

Aspectos históricos

En 1909 a partir de abortos de ovejas, se aisló una bacteria parecida a los vibrios. En 1919, Smith aisló el microorganismo de fetos de abortos bovinos y lo asignó al género *Vibrio* por su apariencia espiral. En 1946, Levy relacionó algunas infecciones gastrointestinales humanas con estas especies, sin embargo, el primer caso de campilobacteriosis en personas se describió en 1938. En 1963, Sebald y Veron designaron un nuevo género

denominado *Campylobacter* (significa “bacilo curvado”) ya que demostraron que *V. fetus*, *V. jejuni* y *V. coli* se distinguen de los vibrios por la composición de bases de ADN (Alonso, 2002; Quinn y col., 2004; Moore y col., 2005).

Etiología

En la familia *Campylobacteraceae* se incluyen 16 especies y 8 subespecies del género *Campylobacter*. Entre las especies de *Campylobacter* se encuentran: *C. fetus* (*C. fetus* subespecie *fetus* y *C. fetus* subespecie *venerealis*), *C. coli*, *C. hyointestinalis* (*C. hyointestinalis* subespecie *hyointestinalis* y *C. hyointestinalis* subespecie *lawsonii*), *C. jejuni* (*C. jejuni* subespecie *jejuni* y *C. jejuni* subespecie *doylei*), *C. lari*, *C. sputorum* (*C. sputorum* subespecie *bubulus* y *C. sputorum* subespecie *fecalis*) y *C. upsaliensis* (Quinn y col., 2004; Glenn y Post, 2005).

Hay especies no patógenas, saprofitas en el ambiente (Quinn y col., 2004).

Las especies termófilas se denominan así por su capacidad para crecer a altas temperaturas y su incapacidad para hacerlo a temperaturas inferiores a 30°C y entre ellas se encuentran *C. jejuni* subespecie *jejuni*, *C. coli* y *C. lari* entre otras (Altekruse y col., 1998; Quinn y col., 2004).

Campylobacter spp. son bacilos Gram negativos que miden 0,2 a 0,9 μm \times 0,5 a 5 μm y que cuando se dividen permanecen unidos, con forma de gaviota, de S y a veces largas espirales. No forman esporas. Los movimientos en sacacorchos son típicos, debido a los flagelos polares. Son bioquímicamente casi inertes, no fermentadores, oxidasa positivos y de reacciones variables a la catalasa (Nachamkin, 1995; Quinn y col., 2004).

Son bacterias microaerofilas, aunque algunas especies pueden crecer en condiciones de aerobiosis o anaerobiosis (Alonso, 2002; Quinn y col., 2004). Las colonias de *Campylobacter* normalmente son grises, redondas, ligeramente elevadas, lisas y translúcidas (Nachamkin, 1995). Crecen mejor en medios nutritivos suplementados con sangre, aunque la mayoría de las especies crecen en agar MacConkey (Quinn y col., 2004).

No utilizan carbohidratos y la energía se produce por el metabolismo de los aminoácidos o de los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Alonso, 2002).

Epidemiología

Campylobacter spp. tiene distribución mundial. Algunos datos al respecto se indican en el capítulo 6 de esta Tesis.

La mayoría de las especies de este género, especialmente las especies termófilas, son hospedadores naturales de aves, al ser su temperatura corporal de 42°C, óptima para el crecimiento de *C. jejuni*. Tanto las personas como los animales domésticos y silvestres pueden actuar como portadores asintomáticos de esta bacteria, ya que las condiciones de microaerofilia y las altas temperaturas de su tracto intestinal constituyen un hábitat idóneo para su crecimiento (Stanley y col., 1998b; Alonso, 2002), de este modo, *Campylobacter* spp. se ha aislado de las heces de vacas, ovejas, cerdos, pollos, patos y aves silvestres (Rosef y col., 1983).

La excreción de *Campylobacter* spp. en ganado bovino es intermitente, con picos de eliminación en primavera y otoño. Este hecho puede deberse a factores ambientales como la temperatura que influye sobre la presencia de aves migratorias, roedores e insectos, en los cambios de alimentación o agua de bebida. También pueden influir los cambios hormonales durante el parto y el ordeño o los factores que provocan estrés (Stanley y col., 1998b; Louis y col., 2005).

La resistencia de las especies de *Campylobacter* termófilas y microaerofilas a los factores físicos es relativamente baja, siendo sensibles al oxígeno atmosférico, al $\text{pH} \leq 5$, a la radiación gamma, a la salinidad, a los desinfectantes como los amonios cuaternarios, formaldehídos, etc. y a la sequía (Altekruse y col., 1998). Pueden permanecer viables durante más de 3, 4 y 5 semanas en heces, agua y en orina, respectivamente, a 4°C (Busato y col., 1999; Stanley y Jones, 2003).

Las botas de los ganaderos son un vehículo de transmisión y mantenimiento de *Campylobacter* spp. en las granjas. Los purines de los animales en los pasillos, patios de

recreo y pastos pueden ser fuente de contagio para posibles vectores de este patógeno como las aves silvestres y las moscas (Moore y col., 2005).

La contaminación del agua por heces juega un papel importante en el ciclo biológico de *Campylobacter* spp. en explotaciones ganaderas; así, los animales con acceso a aguas no cloradas excretan más microorganismos que los que beben aguas cloradas. A pesar de esto, su aislamiento de fuentes acuáticas es poco frecuente (Altekruse y col., 1998; Stanley y col., 1998a).

La presencia de *Campylobacter* spp. en ganado vacuno está relacionada con la contaminación de la leche en la explotación y las canales en el matadero, así como con la contaminación ambiental tras la eliminación de efluentes de mataderos y de granjas (Stanley y col., 1998a).

Se ha aislado *Campylobacter* spp. en alimentos de origen animal como la leche y los productos avícolas y pueden permanecer viables en refrigeración y congelación (Zanetti y col., 1996). Las bacterias del género *Campylobacter* alcanzan la leche a través de la contaminación fecal durante el ordeño, aunque también ocasionalmente a partir de vacas con mamitis asintomática en ganado vacuno (Cullor, 1995a; Hahn, 1996).

La prevalencia de *C. jejuni* y *C. coli* en ganado vacuno lechero depende del tipo de muestra analizada (las heces recogidas del recto presentan más frecuentemente estas bacterias que las tomadas del suelo), del medio de aislamiento usado, de la edad del animal (la prevalencia en terneros es entre 10 y 100 veces más alta que en adultos), de la estación del año y de la localización geográfica; así, la prevalencia varía en el ganado vacuno entre 0,8% y 100% (Busato y col., 1999; Wesley y col., 2000; Stanley y Jones, 2003).

Patogenia

Se sabe poco de los mecanismos de patogenicidad de *Campylobacter* spp. La dosis infectiva no es muy elevada, incluso entre 500 y 1000 microorganismos son capaces de

causar la enfermedad. La principal vía de transmisión de la mayoría de las especies es la ruta oro-fecal (Alonso, 2002; Quinn y col., 2004).

Los signos y síntomas de la infección sugieren un mecanismo invasivo; estudios tanto “in vivo” como “in vitro” sugieren que la bacteria, tras sobrevivir al pH ácido del estómago coloniza la capa mucosa intestinal según indica el Eastern Regional Health Authority (ERHA, 1999).

Entre los factores de virulencia de *C. jejuni* se encuentran una adhesina, una citotoxina y una toxina termolábil. A su vez, utiliza sideróforos exógenos para la obtención de hierro (Nachamkin, 1995; Quinn y col., 2004).

Formas clínicas

Muchas de las infecciones entéricas causadas por *Campylobacter* spp. en animales domésticos son subclínicas (ERHA, 1999). No obstante, *C. fetus* provoca abortos esporádicos en vacuno y ovino (Busato y col., 1999), *C. jejuni* se ha aislado en casos de mamitis bovina (Atabay y Corry, 1998) y vacas con elevados RCS (Neill y col., 1982), y en enteritis de perros, gatos y terneros con diarrea (Harvey y col., 2004), y *C. coli* aparece con mayor frecuencia en cerdos, causando cuadros diarreicos o sin síntomas de enfermedad (Altekruse y col., 1998).

Algunas especies de *Campylobacter* no termófilas son capaces de provocar enfermedad en animales domésticos (ERHA, 1999).

Diagnóstico

No existe ningún protocolo estándar de aislamiento para la detección de estos microorganismos (Mateo y col., 2005). Se pueden recoger muestras de contenido abomasal fetal en casos de abortos, moco genital en anestro de casos de infertilidad y bilis en la hepatitis vibrionica aviar (Alonso, 2002).

Debido a su morfología característica, las especies de *Campylobacter* pueden detectarse mediante una tinción directa de Gram a partir de deposiciones de pacientes con enteritis aguda (Nachamkin, 1995). El aislamiento puede realizarse mediante la filtración de membrana y posterior pase a medio sólido o líquido en condiciones microaerófilas y/o mediante medios de aislamiento selectivos (Allos, 2001).

Los métodos de elección para la identificación son las técnicas moleculares basadas en la PCR por su rapidez, especificidad y sensibilidad (Mateo y col., 2005): PCR-ELISA se utiliza en cultivos negativos de muestras fecales procedentes de animales sospechosos, PCR a tiempo real en muestras de alimentos, PCR retro-transcriptasa que distingue entre células viables y muertas de *C. jejuni* (Moore y col., 2005).

Aspectos zoonóticos

A pesar de que un amplio número de especies de *Campylobacter* están implicadas en los brotes de enteritis humanas, las más comunes son las termófilas, de las cuales *C. jejuni* es el responsable de más del 90% de los casos (Hahn, 1996; López y col., 2003); sin embargo, si se aplican técnicas de diagnóstico más precisas se identifican otras bacterias implicadas, entre las que se encuentra *Arcobacter butzleri* (Butzler, 2004).

La transmisión entre personas es raro que ocurra, con contagio más frecuente por contacto con animales de compañía infectados (Allos, 2001).

C. jejuni es uno de los microorganismos más comunes en los casos esporádicos de enteritis bacteriana en los países desarrollados, siendo una de las principales causas de toxiinfecciones alimentarias a nivel mundial, con mayor tasa de incidencia en niños y adultos jóvenes (Warner y col., 1986; Butzler, 2004; Louis y col., 2005).

Se ha comprobado que puede ser suficiente una dosis infectiva de 500 bacterias para provocar la enfermedad. Normalmente, la vía de contagio es el consumo de alimentos contaminados, principalmente productos avícolas, aunque también a través de agua de bebida y leche (Rodríguez López, 1988; Altekruse y col., 1998; ERHA, 1999), carnes de cerdo, cordero y ternera mal cocinadas o a la brasa y champiñones frescos (Cullor, 1995a).

Existe una cierta estacionalidad en la infección a personas con picos en las estaciones cálidas (Zanetti y col., 1996). La aparición de brotes se ha asociado al consumo de leche cruda: entre 30 y 80 brotes en EE.UU. entre 1973 y 1992, 4 de los 21 brotes ocurridos en Inglaterra y Gales entre 1992 y 1994. En EE.UU. desde 1978 a 1986, de los 57 brotes de origen alimentario causados por *C. jejuni*, 26 fueron debido al consumo de leche cruda y 11 al de agua contaminada (Hahn, 1996).

Las personas que viajan a países en vías de desarrollo presentan el riesgo de desarrollar la campilobacteriosis llamada “diarrea del viajero”, ya que en estos países se reconoce la enfermedad como endémica (Rodríguez López, 1988; López y col., 2003).

Los casos de diarreas por *C. jejuni* y *C. coli* son los más frecuentes y clínicamente indistinguibles. Los pacientes pueden no presentar síntomas o padecer un cuadro severo con síntomas generales de fiebre, diarrea, etc. (Busato y col., 1999; Allos, 2001). La enfermedad puede tener complicaciones de tipo neurológico, reumático o renal, aunque son poco frecuentes, excepto en pacientes inmunocomprometidos (Altekruse y col., 1998; Butzler, 2004). El síndrome de Guillain-Barré parece estar asociado a las infecciones por ciertos serotipos de *Campylobacter* (Abu-Halaweh y col., 2005; Louis y col., 2005).

El tratamiento de elección son las fluoroquinolonas, pero debido al aumento de resistencias frente a este antibiótico entre la población humana, coincidiendo con su uso en piensos para pollos, se ha sustituido por la eritromicina (Allos, 2001; Butzler, 2004).

Prevención y control

Para evitar la entrada de *Campylobacter* en la cadena alimentaria debe actuarse a nivel primario, implementado unas buenas prácticas (BP) agrarias de manera conjunta a un programa de APPCC (Moore y col., 2005): evitar el contacto con personas y otros animales (aves), usar desinfectantes en los baños para botas, lavar las manos y usar ropa específica. Para evitar su paso a los alimentos, como la leche del tanque de granja, cuando ya está presente en el establo se debe realizar un ordeño higiénico (Altekruse y col., 1998).

Si ha llegado a los alimentos, se realizaran los tratamientos térmicos de manera correcta. Una adecuada pasteurización elimina el riesgo de transmisión de campilobacteriosis, ya que a temperaturas superiores a 60°C estas bacterias se destruyen (Warner y col., 1986; Rodríguez López, 1988). También se podría aplicar irradiación, decontaminación química, etc. (Moore y col., 2005).

5. INFECCIONES POR *ARCOBACTER* SPP.

Aspectos históricos

El género *Arcobacter* fue propuesto en los noventa por Ellis. En 1977, se aisló por primera vez a partir de fetos bovinos y porcinos abortados, siguiendo el protocolo establecido para *Leptospira*, clasificándose como *Campylobacter* aerotolerantes y nombrados *C. cryaerophila* y *C. nitrofigilis* (Alonso, 2002; Quinn y col., 2004). En 1991, fueron reclasificados en el género *Arcobacter* basándose en los resultados de los estudios moleculares realizados (Rice y col., 1999).

Etiología

Al igual que las especies de *Campylobacter*, el género *Arcobacter* pertenece a la familia *Campylobacteraceae* y está formado por 6 especies: *A. butzleri*, *A. cibarius*, *A. cryaerophilus*, *A. halophilus*, *A. nitrofigilis* y *A. skirrowii* (Donachie y col., 2005; Houf y col., 2005).

Arcobacter spp. son bacilos Gram negativos, ligeramente curvados, con forma de S o helicoidales y miden 0,2 a 0,9 μm \times 1 a 3 μm . No forman esporas y son móviles, con un único flagelo polar (Nachamkin, 1995; Glenn y Post, 2005).

Bioquímicamente son catalasa positivos, reducen los nitratos, pero no los nitritos y no producen sulfuro de hidrógeno (Glenn y Post, 2005).

En cultivo *Arcobacter* spp. tiene una morfología similar a *Campylobacter* spp.; así, las colonias son pequeñas y circulares, de forma convexa, de tonalidad blanca, crema o gris y no hemolíticas, excepto *A. skirrowii* que puede ser α -hemolítico (Golla y col., 2002; Glenn y Post, 2005).

En general se diferencian del género *Campylobacter* en que crecen en aerobiosis con temperaturas de crecimiento óptimas menores (15-37°C). Son capaces de crecer en presencia de 2,5% de ClNa, lo que hace que sea un microorganismo mejor adaptado para sobrevivir en el medio ambiente (Nachamkin, 1995; Moreno y col., 2004).

Epidemiología

Al igual que el género *Campylobacter*, las especies de *Arcobacter* se aíslan con mayor frecuencia en aves, por lo que se les considera un reservorio de importancia (Houf y col., 2002; Öngör y col., 2004). Los animales de diferentes especies pueden actuar como portadores asintomáticos de distintas cepas de *Arcobacter*, aislándose en vacas, ovejas, cerdos, caballos, perros y en personas (Glenn y Post, 2005).

La prevalencia en ganado vacuno depende de manera significativa del método de laboratorio utilizado para su aislamiento e identificación, de la edad de los animales y de la estacionalidad, oscilando entre 3,6 y 14,3% en heces de animales clínicamente sanos (Kabeya y col., 2003; Öngör y col., 2004; Van Driessche y col., 2005).

El material utilizado en las explotaciones ganaderas y el agua pueden actuar como vectores de entrada y de dispersión de *Arcobacter* spp. (Van Driessche y col., 2005). Así, el agua juega un papel importante en la transmisión de estos microorganismos, sobre todo, si no está clorada, ya que las especies de *Arcobacter* son sensibles al cloro. Se han aislado en ríos, aguas subterráneas, residuales, aguas marinas, etc. pudiendo sobrevivir a 5°C más de 16 días en agua de pozo (Rice y col., 1999; Moreno y col., 2004).

Formas clínicas

A. butzleri, *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii* son especies patógenas para personas y animales (Öngor y col., 2004; Van Driessche y col., 2004; Glenn y Post, 2005):

- *A. butzleri* se ha aislado a partir de abortos bovinos y porcinos y en casos de diarreas de estas especies.
- *A. cryaerophilus* está asociado a mamitis bovinas, abortos porcinos, ovinos y equinos, y se ha aislado también a partir de heces diarreicas.
- *A. skirrowii* se ha aislado de muestras fecales de pollos, cerdos y corderos con diarreas, de fetos abortados bovinos, porcinos y ovinos y de exudado prepucial de toros.
- De *A. cibarius* se desconoce su potencial zoonótico, aunque se cree que es similar a *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii* (Houf y col., 2005).

Diagnóstico

Para el aislamiento y la identificación de las especies de *Arcobacter* se han utilizado técnicas similares a las descritas para *Campylobacter* spp., por lo que se cree que la verdadera incidencia de las infecciones por esta bacteria se ha subestimado (Houf y col., 2000; Barros-Velázquez y col., 2002; Neubauer y Hess, 2006). Debido a sus requerimientos bioquímicos, no existe una prueba estándar de aceptación general para la identificación de esta bacteria (Harmon y Wesley, 1997; Öngor y col., 2004).

Se han recuperado especies de *Arcobacter* tras incubación en condiciones microaeróbicas a 37°C por el método de filtración en medios no selectivos (Nachamkin, 1995). La mayor parte de las pruebas para la identificación de *A. butzleri* incluyen el crecimiento en glicina al 1% y en CINa al 1,5% (Harmon y Wesley, 1997).

Las especies de *Arcobacter* pueden diferenciarse con los métodos basados en el uso de la PCR mediante el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados o de restricción, y de sondas de hibridación (Barros-Velázquez y col., 2002; On y col., 2003; Neubauer y Hess, 2006)

Aspectos zoonóticos

Se considera a *Arcobacter* spp. como un agente patógeno zoonótico emergente de origen alimentario, siendo una de las principales causas de enteritis entre la población humana (Moreno y col., 2004); de este modo, *A. butzleri* es considerado un “serio peligro” para la salud humana por la Comisión Internacional en Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMFS, 1988).

A. butzleri y *A. cryaerophilus* con mayor frecuencia pueden causar enteritis, con síntomas como diarrea y, en algunos casos, bacteriemia, aunque los mecanismos de patogenia en las personas enfermas no están muy claros (Hsueh y col., 1997; Wesley y col., 2000; Golla y col., 2002). Recientemente se ha aislado *A. skirrowii* asociado a diarreas crónicas (Vandamme y col., 1992).

Una importante vía de entrada de *A. butzleri* es la mucosa intestinal inflamada tras la ingestión de alimentos o aguas contaminadas (Vandamme y col., 1992), ya que esta especie se ha aislado de alimentos de origen animal como carnes de pollo, pavo, cerdo, ternera, etc., sobre todo, en países en vías de desarrollo (Hsueh y col., 1997; Wesley y col., 2000; On y col., 2003).

Prevención y control

Para evitar la entrada de *Arcobacter* en la cadena alimentaria debe actuarse a nivel primario, por ejemplo, mediante la aplicación de un programa de APPCC. Así unas adecuadas prácticas de manejo de desinfección, como la cloración del agua de bebida de los animales, son esenciales para evitar la entrada de este agente infeccioso en la cadena alimentaria (Rice y col., 1999; Moreno y col., 2004).

6. REGIÓN GEOGRÁFICA DONDE SE REALIZARON LOS TRABAJOS

Los estudios que integran esta Tesis Doctoral fueron elaborados en diversas explotaciones de ganado vacuno de aptitud lechera localizadas en las provincias de Lugo y A Coruña y que suministraban la leche a dos empresas presentes en Galicia, Puleva Food, S. L. y Lactalis durante el período de tiempo comprendido entre 2003-2006.

En el año 2003, según indica el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), el número de vacas de ordeño en Galicia representaba el 47,3% del número total en España, siendo la producción láctea el 31,4% de la producción total española (MAPA, 2003). Ese mismo año, había censadas 440951 vacas de ordeño en las provincias de Lugo y A Coruña, el 86,3% del total de Galicia distribuidas en 20469 granjas, el 75,1% del conjunto de explotaciones gallegas, datos obtenidos del Instituto Galego de Estatística (IGE, 2003).

Galicia es la principal Comunidad Autónoma de España en producción de leche, abarcando aproximadamente, según datos de los últimos tres años, algo más de un tercio de la producción total del Estado, lo que representaba en el año 2004 alrededor del 1,6% de la producción total de la Unión Europea (MAPA, 2005).

Para el cálculo del tamaño de muestra de parte de los estudios de esta Tesis Doctoral, utilizamos los datos de la Campaña de Saneamiento Ganadero de Galicia del año 2005, datos que posteriormente fueron ratificados a través de los reflejados por el IGE. Así, en 2005 el censo de vacas de ordeño en Galicia representó el 36,7% del total de España y la producción láctea representaba el 34,0% de la producida en España (MAPA, 2005). En ese mismo año, las provincias de A Coruña y Lugo tenían censadas 326220 vacas lecheras distribuidas en 15933 granjas, correspondiendo al 86,7% y el 79,2%, respectivamente, del total de vacas y explotaciones ganaderas de la Comunidad Autónoma de Galicia (IGE, 2005).

7. PERFIL DE LA TESIS

Para la elaboración de la presente Tesis Doctoral se realizaron una serie de estudios como parte integral del planteamiento del APPCC con una finalidad eminentemente práctica basados en la aportación de datos sobre la influencia que las distintas prácticas de manejo tienen en la producción de leche segura, sana e inocua en las explotaciones de ganado vacuno.

En el capítulo 2 se describe el proceso de adaptación e implementación de un sistema de APPCC en las granjas bovinas, con el objeto de evitar alteraciones de la calidad higio-sanitaria de la leche del tanque de refrigeración. El sistema se basó en la aplicación de las buenas prácticas ganaderas como parte del programa de APPCC utilizadas como medidas preventivas para la aparición de los peligros: presencia de patógenos mamarios, saprofitos o zoonóticos (*Listeria* spp., *Campylobacter* spp. y *Arcobacter* spp.) y presencia de residuos de medicamentos o inhibidores como detergentes, desinfectantes, etc.

El capítulo 3 hace referencia a la utilidad de la ATP bioluminiscencia como método de monitorización de la higiene de las superficies de los equipos de ordeño y su relación con la calidad bacteriana de la leche del tanque de refrigeración.

Finalmente, en los tres últimos capítulos se estudian las prevalencias de los agentes patógenos potencialmente zoonóticos como *Listeria* spp. en muestras de leche del tanque, ensilado y heces de vacas en lactación recogidas en las granjas y *Campylobacter* spp. y *Arcobacter* spp. en heces de vacas en lactación. Así mismo, se analiza la influencia que ejercen algunas de las prácticas de manejo realizadas por los ganaderos sobre la aparición de estas bacterias en las granjas.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abu-Halaweh, M.; Bates J.; Patel, B. K. C. 2005. Rapid detection and differentiation of pathogenic *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by real time PCR. *Res Microbiol*, 156: 107-114.

Allos, B. M. 2001. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. *Clin Infect Dis*, 32: 1201-1206.

Alonso, J. M. 2002. Géneros *Campylobacter* y *Helicobacter*. En: Manual de Microbiología Veterinaria. Vadillo, S. y col. Ed. McGraw Hill, Interamericana, D. L. Madrid. Pp: 253-258.

Altekruse, S. F.; Swerdlow, D. L.; Stern, N. J. 1998. *Campylobacter jejuni*. Microbial food borne pathogens. *Vet Clin N Am-Food Anim Pract*, 14: 31-40.

Amaro López, M. A. 2002. Listeriosis de origen alimentario. Curso Sanidad Animal y Salud Pública: Zoonosis. Murcia.

Atabay, H. I.; Corry, J. E. L. 1998. The isolation and prevalence of *Campylobacters* from dairy cattle using a variety of methods. *J Appl Microbiol*, 84: 733-740.

Aycicek, H.; Oguz, U.; Karci, K. 2006. Comparison of results of ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing methods for the determination of surface cleanliness at a hospital kitchen. *Int J Hyg Environ Health*, 209: 203- 206.

Barros-Velázquez, J.; Jiménez, A.; Villa, T. G. 2002. Speciation of thermotolerant *Campylobacter* isolates involved in foodborne disease by means of DNA restriction analysis and molecular probes. *J Agric Food Chem*, 50: 6563-6568.

Bastien, J.; Brouillet, P. 2000. Mieux gérer au quotidien les pathologies dans les élevages en tenant compte du risque sanitaire pour le lait: un impératif pour les vétérinaires de demain. *SNGTV. Commission Qualité du Lait*, Paris.

Bell, C.; Kyriakides, A. 2000. *Listeria*: una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza.

Blenden, D. C.; Kampelmacher, E. H.; Torres-Anjel, M. J. 1987. Listeriosis. *JAVMA- J Am Vet Med Assoc*, 191: 1546-1551.

Bourry, A.; Poutrel, B. 1996. Bovine mastitis caused by *L. monocytogenes*: kinetics of antibody responses in serum and milk after experimental infection. *J Dairy Sci*, 79: 2189-2195.

Brisabois, A.; Lafarge, V.; Brouillaud, A.; Buyser, M. L.; Collette, C.; Gari-Bastuji, B.; Thorel, M. F. 1997. Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers: situation en France et en Europe. *Rev Sci Tech Off Int Epizoot*, 16: 452-471.

Brovko, L. Y.; Froudjian, V. G.; Babunova, V. S.; Ugarova, N. N. 1991. Quantitative assessment of bacterial contamination of raw milk using bioluminescence. *J Dairy Res*, 66: 627-631.

Bunning, V. K.; Crawford, R. G.; Tierney, J. T.; Peeler, J. T. 1992. Thermotolerance of heat shocked *Listeria monocytogenes* in milk exposed to high temperature, short time pasteurization. *Appl Environ Microbiol*, 58: 2096-2098.

Busato, A.; Hofer, D.; Lentze, T.; Gaillard, C.; Burnens, A. 1999. Prevalence and infection risks of zoonotic enteropathogenic bacteria in Swiss cow calf farms. *Vet Microbiol*, 69: 251-263.

Butzler, J. P. 2004. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clin Microbiol Infect*, 10: 868-876.

Champiat, D.; Matas, N.; Monfort, B.; Frass, H. 2001. Applications of bioluminescence to HACCP. *Luminescence*, 16: 193-198.

Chu, C. P.; Lee, D. J.; Chang, B. V.; Liao, C. S. 2000. Using ATP bioluminescence technique for monitoring microbial activity in sludge. *Biotechnol Bioeng*, 75: 4469-4474.

Comisión de las Comunidades Europeas. 2000. Libro Blanco sobre seguridad alimentaria. 12 de enero de 2000, Bruselas.

Contreras de Vera, A.; Corrales Romero, J. C.; Sánchez López, A. 1997. En: Enfermedades infecciosas de los rumiantes. Ed. DM. Murcia. Pp: 187-193.

Cooper, J.; Walker, R. D. 1998. Listeriosis. Microbial food borne pathogens. *Vet Clin N Am- Food Anim Pract*, 14: 113-125.

Corbitt, A. J.; Bennion, N.; Forsythe, S. J. 2000. Adenylate kinase amplification of ATP bioluminescence for hygiene monitoring in the food and beverage industry. *Lett Appl Microbiol*, 30: 443-447.

Couto, L. X.; Factor, J. L. 2000. Auditoria de sistemas HACCP. *Alimentaria*, 309: 61-84.

Cullor, J. S. 1995a. Common pathogens that cause foodborne disease: can they be controlled on the dairy? *Vet Med*, 90: 185-194.

Cullor, J. S. 1995b. Implementing the HACCP program on your clients' dairies. *Vet Med*, 90: 290-295.

Cullor, J. S. 1997a. Risk and prevention of contamination of dairy products. *Rev Sci Tech Off Int Epizoot*, 16: 472-481.

Cullor, J. S. 1997b. HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points): is it coming to the dairy? *J Dairy Sci*, 80: 3449-3452.

Davidson, C. A.; Griffith, C. J.; Peters, A. C.; Fielding, L. M. 1999. Evaluation of two methods for monitoring surface cleanliness-ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing. *Luminescence*, 14: 33-38.

Delahaye, E.; Welté, B.; Levi, Y.; Leblon, G.; Montiel, A. 2003. An ATP based method for monitoring the microbiological drinking water quality in a distribution network. *Water Res*, 37: 3689-3696.

Directiva 93/43/CEE del Consejo de 14 de junio de 1993 relativa a la higiene de los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea.

Donachie, S. P.; Bowman, J. P.; On, S. L. W.; Alam, M. 2005. *Arcobacter halophilus* sp. nov. the first obligate halophile in the genus *Arcobacter*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55: 1271-1277.

Donnelly, C. W. 1990. Concerns of microbial pathogens in association with dairy foods. *J Dairy Sci*, 73: 1656-1661.

Eastern Regional Health Authority, ERHA. 1999. A review of Campylobacteriosis in humans and animals from the eastern region. For the ERHA Committee by the Campylobacter Subcommittee. Citado: 24/10/2006. Disponible en: www.fsai.ie/extranet/zoonoses/ERZC/ERZC_campylobacter.pdf

Escriche, I.; Doménech, E. 2004. El APPCC, elemento clave para garantizar la seguridad alimentaria. Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo. Universidad Politécnica de Valencia. Ed. UPV, Valencia.

Finger, R.; Sisco, W. M. 2001. Bioluminescence as a technique to evaluate udder preparation. *J Dairy Sci*, 84: 818-823.

Gardner, I. A. 1997. Testing to fulfill HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points). Requirements: principles and examples. *J Dairy Sci*, 80: 3453-3457.

Glenn Songer, J.; Post, K. W. 2005. The genera *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Arcobacter*. En: Veterinary Microbiology, bacterial and fungal agents of animal diseases. Elsevier Saunders. Missouri. Pp: 223-231.

Golla, S. C.; Murano, E. A.; Johnson, L. G.; Tipton, N. C.; Cureington, E. A.; Savell, J. W. 2002. Determination of the occurrence of *Arcobacter butzleri* in beef and dairy cattle from Texas by various isolation methods. *J Food Prot*, 65: 1849-1853.

Gorus, F.; Schram, E. 1979. Applications of Bio and Chemiluminescence in the clinical laboratory. *Clin Chem*, 25: 512-519.

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

Griffiths, M. W. 1993. Applications of bioluminescence in the dairy industry. *J Dairy Sci*, 76: 3118-3125.

Hahn, G. 1996. Pathogenic bacteria in raw milk-situation and significance. Proceedings, IDF Symposium on Bacteriological quality of raw milk. IDF. Austria. Pp: 67-83.

Harmon, K. M.; Wesley, I. V. 1997. Multiplex PCR for the identification of *Arcobacter* and differentiation of *Arcobacter butzleri* from others arcobacters. *Vet Microbiol*, 58: 215-227.

Harvey, R. B.; Droleskey, R. E.; Sheffield, C. L.; Edrington, T. E.; Callaway, T. R.; Anderson, R. C.; Drinnon, D. L. J.; Ziprin, R. L.; Scott, H. M.; Nisbet, D. J. 2004. *Campylobacter* prevalence in lactating dairy cows in the United States. *J Food Prot*, 67: 1476-1479.

Hogue, A. T.; White, P. L.; Heminover, J. A. 1998. Pathogen reduction and hazard analysis and critical control point (HACCP) systems for meat and poultry. Microbial food borne pathogens. *Vet Clin N Am-Food Anim Pract*, 14: 151-164.

Houf, K.; Tutenel, A.; De Zutter, L.; Van Hoof, J.; Vandamme, P. 2000. Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and identification of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii*. *FEMS Microbiol Lett*, 193: 89-94.

Houf, K., L. de Zutter, J. Van Hoof, P. Vandamme, P. 2002. Assessment of the genetic diversity among *Arcobacters* isolated from poultry products by using two PCR based typing methods. *Appl Environ Microbiol*, 68: 2172-2178.

Houf, K.; On, S. L. W.; Coenye, T.; Mast, J.; Van Hoof, J.; Vandamme, P. 2005. *Arcobacter cibarius* sp. nov., isolated from broiler carcasses. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55: 713-717.

Hsueh, R. R.; Teng, L. J.; Yang, P. C.; Wang, S. K.; Chang, S. C.; Ho, S. W.; Hsieh, W. C.; Luh, K. T. 1997. Bacteriemia caused by *Arcobacter cryaerophilus* 1B. *J Clin Microbiol*, 35: 489-491.

Hulebak, K. L.; Schlosser, W. 2002. Hazard Analysis and Critical control point (HACCP). History and conceptual overview. *Risk Anal*, 22: 547-552.

Husu, J. R. 1990. Epidemiological studies on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in the feces of dairy cattle. *J Vet Med B*, 37: 276-282.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods, ICMFS. 1988. Microorganisms in Foods. Application of the Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) system to ensure microbiological safety and quality. Blackwell Scientific Publications. London.

Instituto Galego de Estatística (IGE). Explotación do rexistro de gando bovino 2005. Citado: 22/01/2007. Disponible en: http://www.ige.eu/ga/economicas/agro_pesca/rexistro_bovino.index.htm

Instituto Galego de Estatística (IGE). Explotación do rexistro de gando bovino 2003. Citado: 14/12/2007. Disponible en: http://www.ige.eu/ga/economicas/agro_pesca/rexistro_bovino.index.htm

International Dairy Federation, IDF. 1995. Milk and milk products: detection of *L. monocytogenes*. *International IDF Standard*, 143A/1995.

Instituto de Salud Carlos III. 1998. Listeriosis. Boletín Epidemiológico Semanal, 6: 297-299.

Kabeya, H.; Maruyama, S.; Morita, Y.; Kubo, M.; Yamamoto, K.; Ara, S.; Izumi, T.; Kobayashi, Y.; Katsube, Y.; Mikami, T. 2003. Distribution of *Arcobacter* species among livestock in Japan. *Vet Microbiol*, 93: 153-158.

Kolbeck, J. C.; Padett, R. A.; Estevez, E. G.; Harrell, L. J. 1985. Bioluminescence screening for bacteriuria. *J Clin Microbiol*, 21: 527-530.

Lai-King, N. G.; Taylor, D. E.; Stiles, M. E. 1985. Estimation of *Campylobacter* spp. in broth culture by bioluminescence assay of ATP. *Appl Environ Microbiol*, 49: 730-731.

López, C.; Agostini, A.; Giacoboni, G.; Cornero, F.; Tellechea, D.; Trinidad, J. J. 2003. Campilobacteriosis en una comunidad de bajos recursos de Buenos Aires, Argentina. *Rev Sci Tech Off Int Epizoot*, 22: 1013-1020.

Louis, V. R.; Gillespie, I. A.; O'Brien, S. J.; Russek-Cohen, E.; Pearson, A. D.; Colwell, R. R. 2005. Temperature driven campylobacter seasonality in England and Wales. *Appl Environ Microbiol*, 71: 85-92.

Low, J. C.; Donachie, W. 1997. A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. *Vet J*, 153: 9-29.

Mateo, E.; Carcamo, J.; Urquijo, M.; Perales, I.; Fernández Astorga, A. 2005. Evaluation of a PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in retail poultry products. *Res Microbiol*, 156: 568-574.

McLauchlin, J.; Mitchell, R. T.; Smerdon, W. J.; Jewell, K. 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *Int J Food Microbiol*, 92: 15-33.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). Encuestas ganaderas 2003. Citado: 22/01/2007. Disponible en: <http://www.mapa.es/estadistica/pags/encuestaganadera/encuesta2003.pdf>.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). Producción de leche de vaca en explotaciones 2005b. Citado: 22/01/2007. Disponible en: <http://www.mapa.es/estadistica/pags/Lactea/lactea:anual.htm>

Moore, J. E.; Corcoran, D.; Dooley, J. S. G.; Fanning, S.; Lucey, B.; Matsuda, M.; McDowell, D. A.; Mègraud, F.; Millar, B. C.; O'Mahony, R.; O'Riordan, L.; O'Rourke, M.; Rao, J. R.; Rooney, P. J.; Sails, A.; Whyte, P. 2005. *Campylobacter*. *Vet Res*, 36: 351-382.

Moreno, Y.; Alonso, J. L.; Botella, S.; Ferrús, M. A.; Hernández, J. 2004. Survival and injury of *Arcobacter* after artificial inoculation into drinking water. *Res Microbiol*, 155: 726-730.

Mortimore, S.; Wallace, C. 2001. HACCP. Enfoque práctico. Ed. Acribia, Zaragoza.

Mouwen, J.; Prieto, M. 1998. Aplicación del sistema ARICPC-HACCP a la industria cárnica. *Cienc Tecnol Aliment*, 2: 42-46.

Murphy, S. C.; Kozlowski, S. M.; Bandler, D. K.; Boor, K. J. 1998. Evaluation of adenosine triphosphate-bioluminescence hygiene monitoring for trouble shooting fluid milk shelf life problems. *J Dairy Sci*, 81: 817-820.

Nachamkin, I. 1995. *Campylobacter* and *Arcobacter*. En: Manual of Clinical Microbiology. P. R. Murray y col. D. C. ASM Press, Washington. Pp: 483-491.

Neill, S. D.; Mackie, D. P.; Logan, E. F. 1982. *Campylobacter* mastitis in dairy cows. *Lett Vet Rec*, 110: 505-506.

Neubauer, C.; Hess, M. 2006. Detection and identification of food borne pathogens of the genera *Campylobacter*, *Arcobacter* and *Helicobacter* by multiplex PCR in poultry and poultry products. *J Vet Med B*, 53: 376-381.

Nieuwenhof, F. 1996. Raw milk, hygiene management and ATP bioluminescence. Proceedings, IDF Symposium on Bacteriological quality of raw milk. IDF, Austria. Pp: 113-118.

Noordhuizen, J. P. T. M.; Welpelo, H. J. 1996. Sustainable improvement of animal health care by systematic quality risk management according to the HACCP concept. *Vet Q*, 18: 121-126.

Noordhuizen, J. P. T. M.; Frankena, K.; Van der Hoofd, C. M.; Graaf, E. A. M. 1997. Application of quantitative methods in veterinary epidemiology. Wageningen Pers, Wageningen. Pp: 275-310.

Noordhuizen, J. P. T. M.; Frankena, K. 1999. Epidemiology and quality assurance: applications at farm level. *Prev Vet Med*, 39: 93-110.

On, S. L. W.; Harrington, C. S.; Atabay, H. I. 2003. Differentiation of *Arcobacter* species by numerical analysis of AFLP profiles and description of a novel *Arcobacter* from pig abortion and turkey faeces. *J Appl Microbiol*, 95: 1096-1105.

Öngor, H.; Çetinkaya, B.; Açıık, M. N.; Atabay, H. I. 2004. Investigation of Arcobacters in meat and faecal samples of clinically healthy cattle in Turkey. *Lett Appl Microbiol*, 38: 339-44.

Organización Mundial de la Salud, OMS. 2002. Food safety and foodborne illness. Citado: 24/10/2006. Disponible en: <http://www-who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en>

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO. 1998. Food quality and safety systems. A training manual on food hygiene and the hazard analysis and critical control point (HACCP) system. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Oulahal-Lagsir, N.; Martial-Gros, A.; Bonneau, M.; Blum, L. J. 2000. Ultrasonic methodology coupled to ATP bioluminescence for the non-invasive detection of fouling in food processing equipment-validation and application to a dairy factory. *J Appl Microbiol*, 89: 433-441.

Pak, S. I.; Spahr, U.; Jemmi, T.; Salman, M. D. 2002. Risk factors for *L. monocytogenes* contamination of dairy products in Switzerland, 1990-1999. *Prev Vet Med*, 53: 55-65.

Panisello, P. J.; Rooney, R.; Quantick, P. C.; Stanwell-Smith, R. 2000. Application of foodborne disease outbreak data in the development and maintenance of HACCP systems. *Int J Food Microbiol*, 59: 221-234.

Pierson, M. D.; Corlett, D. A. 1992. HACCP. Principles and applications. Chapman & Hall, New York.

Poullis, J. A.; de Pijper, M.; Mossel, D. A. A.; Dekkers, P. P. A. 1993. Assessment of cleaning and disinfection in the food industry with the rapid ATP bioluminescence technique combined with the tissue fluid contamination test and a conventional microbiological method. *Int J Food Microbiol*, 20: 109-116.

Puig-Durán Fresco, J. 2002. Control de la eficacia de la limpieza y desinfección de forma rutinaria. En: Ingeniería, autocontrol y auditoria de la higiene en la industria alimentaria. Ed. Mundi Prensa. Madrid. Pp:130-133.

Quinn, P. J.; Markey, B. K.; Carter, M. E.; Donnelly, W. J.; Leonard, F. C. 2004. Especies de *Listeria* y Especies de *Campylobacter*. En: Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. Ed. Acribia, S. A. Zaragoza. Pp: 87-90 y 205-210.

Rice, E. W.; Rodgers, M. R.; Wesley, I. W.; Johnson, C. H.; Tanner, S. A. 1999. Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water. *Lett Appl Microbiol*, 28: 31-35.

Rodríguez López, L. A. 1988. Infecciones alimentarias causadas por el género *Campylobacter*. Enfermedades y otros riesgos asociados con el consumo de alimentos. Ed. Lit. Colegio Oficial de Veterinarios de Ourense.

Ropkins, K.; Beck, A. J. 2002. Application of hazard analysis critical control points (HACCP) to organic chemical contaminants in food. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 42: 123-149.

Rosef, O.; Gondrosen, B.; Kapperud, G.; Underdal, B. 1983. Isolation and characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from domestic and wild mammals in Norway. *Appl Environ Microbiol*, 46: 855-859.

Ryser, E. T.; Marth, E. H. 1991. Listeriosis and food safety. Ed. Marcel Dekker, Inc, Madison, Wisconsin.

Samkutty, P. J.; Gough, R. H.; Adkinson, R. W.; McGrew, P. 2001. Rapid assessment of the bacteriological quality of raw milk using ATP bioluminescence. *J Food Prot*, 64: 208-212.

Sanaa, M.; Ménard, J. L. 1994. Contamination du lait cru par *L. monocytogenes*: origines, facteurs de risque, prévention. *Rec Méd Vet*, 170: 437-442.

Selan, L.; Berlutti, F.; Passariello, C.; Thaller, M. C.; Renzini, G. 1992. Reliability of a bioluminescence ATP assay for detection of bacteria. *J Clin Microbiol*, 30: 1739-1742.

Sharp, M. W. 1989. Bovine mastitis and *Listeria monocytogenes*. *Lett Vet Rec*, 11: 512-513.

Stanley, K.; Cunningham, R.; Jones, K. 1998a. Isolation of *Campylobacter jejuni* from groundwater. *J Appl Microbiol*, 85: 187-191.

Stanley, K. N.; Wallace, J. S.; Currie, J. E.; Diggle, P. J.; Jones, K. 1998b. The seasonal variation of thermophilic campylobacters in beef cattle, dairy cattle and calves. *J Appl Microbiol*, 85: 472-480.

Stanley, K.; Jones, K. 2003. Cattle and sheep farms as reservoirs of *Campylobacter*. *J Appl Microbiol*, 94: 104-113.

Vandamme, P.; Pugina, P.; Benzi, G.; Van Etterijck, R.; Vlaes, L.; Kersters, K.; Butzler, J. P.; Lior, H.; Lauwers, S. 1992. Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian school. *J Clin Microbiol*, 30: 2335-2337.

Van Driessche, E.; Houf, K.; Vangroenweghe, F.; Nollet, N.; De Zutter, L.; Vandamme, P.; Van Hoof, J. 2004. Occurrence and strain diversity of *Arcobacter* species isolated from healthy Belgian pigs. *Res Microbiol*, 155: 662-666.

Van Driessche, E.; Houf, K.; Vangroenweghe, F.; De Zutter, L.; Van Hoof, J. 2005. Prevalence, enumeration and strain variation of *Arcobacter* species in the faeces of healthy cattle in Belgium. *Vet Microbiol*, 105: 149-154.

Van Schothorst, M. 2004. A simple guide to understanding and applying the hazard analysis critical control point concept. International Life Sciences Institute. ILSI Europe, Belgium.

Vázquez-Boland, J. A.; Gamallo, J. A.; Ripio, M. T.; Domínguez-Bernal, G.; Lara, M.; Vega, Y.; Maribarm, R. C.; Suárez, M. 1996. Listeriosis animal: aspectos epidemiológicos y diagnósticos, implicaciones en salud pública y situación en España. *Med Vet*, 13: 333-341.

Vázquez-Boland, J. A.; Kuhn, M.; Berche, P.; Chakraborty, T.; Domínguez-Bernal, G.; Goebel, W.; González-Zorn, B.; Wehland, J.; Kreft, J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev*, 14: 584-640.

Venkateswaran, K.; Hattori, N.; La Duc, M. T.; Kern, R. 2003. ATP as a biomarker of viable microorganisms in clean-room facilities. *J Microbiol Methods*, 52: 367-377.

Vishinsky, Y.; Grinberg, A.; Ozery, R. 1993. *Listeria monocytogenes* udder infection and carcass contamination. *Vet Rec*, 6: 484.

Warner, D. P.; Bryner, J. H.; Beran, G. W. 1986. Epidemiologic study of campylobacteriosis in Iowa cattle and the possible role of unpasteurized milk as a vehicle of infection. *Am J Vet Res*, 47: 254-258.

Wesley, I. V.; Ashton, F. 1991. Restriction enzyme analysis of *Listeria monocytogenes* strains associated with food borne epidemics. *Appl Environ Microbiol*, 57: 969-975.

Wesley I. V.; Wells, S. J.; Harmon, K. M.; Green, A.; Schroeder-Tucker, L.; Glover, M.; Siddique, I. 2000. Fecal shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in dairy cattle. *Appl Environ Microbiol*, 66: 1994-2000.

Wheat, P. F.; Spencer, R. C.; Hastings, J. G. M. 1989. A novel luminometer for rapid antimicrobial susceptibility tests on gram positive cocci by ATP bioluminescence. *J Med Microbiol*, 29: 277-282.

Wiedmann, M. 2003. ADSA Foundation Scholar Award- An integrated science based approach to dairy food safety: *Listeria monocytogenes* as a model system. *J Dairy Sci*, 86: 1865-1875.

Winter, P.; Schilcher, F.; Bagò, Z.; Schoder, D.; Egerbacher, M.; Baumgartner, W.; Wagner, W. 2004. Clinical and histopathological aspects of naturally occurring mastitis caused by *Listeria monocytogenes* in cattle and ewes. *J Vet Med*, 51: 176-179.

Zanetti, F.; Varoli, O.; Stampi, S.; De Luca, G. 1996. Prevalence of thermophilic *Campylobacter* and *Arcobacter butzleri* in food of animal origin. *Int J Food Microbiol*, 33: 315-321.

CAPÍTULO 2

**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE ANÁLISIS DE
PELIGROS Y PUNTOS DE CONTROL CRÍTICO EN
EXPLOTACIONES DE GANADO VACUNO LECHERO**

INTRODUCCIÓN

El sector lácteo ha experimentado un gran desarrollo tanto a nivel productivo como en controles de calidad microbiológica e higiene de la leche (recuento bacteriano (RB), RCS y control de residuos). No obstante, para evaluar dicha calidad, estos parámetros presentan ciertas limitaciones al tratarse de análisis realizados en el producto final y no facilitar, por tanto, la aplicación de métodos preventivos en los casos en que se determinen valores inadecuados (Diéguez y col., 2004).

Por otro lado, en los últimos años se generó una gran alarma social y en consecuencia caída de los mercados de alimentos de origen animal debido, en parte, a los últimos casos de alerta sanitaria (Escriche y Doménech, 2004). Como consecuencia, actualmente, el consumidor exige garantías de calidad del producto, tanto analíticas como de las condiciones de su producción (respeto al medio ambiente, bienestar animal, etc.). Así, el objetivo global de la seguridad alimentaria es garantizar, desde el punto de vista sanitario, las producciones alimentarias de origen animal desde la granja hasta el consumidor.

La aplicación de los principios de gestión de riesgos de patógenos a la salud animal debe incluir el control de los peligros relacionados con la introducción de microorganismos patógenos en la granja, la propagación una vez introducidos, así como los relacionados con la salida de esos patógenos fuera de la granja, en este caso a través de la leche (Noordhuizen y Welpelo, 1996). También es fundamental tener conocimientos de la microbiología de la leche y de los factores que afectan a la supervivencia y multiplicación microbiana.

Se han desarrollado una serie de métodos de control de la calidad, como son las BP y los estándares de higiene (EH), ambas consideradas en algunos casos como prerrequisitos para el APPCC (Escriche y Doménech, 2004). De ellos, el método con mejor relación coste-beneficio para controlar los peligros de origen alimentario es el sistema APPCC. Las diferencias entre estos métodos se refieren a la orientación de la calidad del producto o del proceso y a diversas características como la simplicidad, la laboriosidad, la documentación necesaria, etc. (tabla 2.1) (Noordhuizen y Frankena, 1999).

Los EH describen los pasos a aplicar para una prevención directa de la contaminación de los productos finales. Se engloban el control de la calidad del agua, la limpieza y desinfección, el control de plagas, la trazabilidad de las materias primas, etc. En muchos casos se han aplicado en explotaciones ganaderas lecheras como requisito previo a la correcta implementación del APPCC para la obtención de leche segura y de calidad (Agricultura and Agri-Food Canada, 2001).

Las BP agrarias lecheras son como una guía práctica para el ganadero que cubre diferentes aspectos: la salud animal, la higiene de la leche y del ordeño, la alimentación y agua de bebida de los animales, el bienestar animal y el medio ambiente. Se basan en prevenir los problemas antes de su aparición (Morgan, 2004).

Tabla 2.1: Comparación de las principales características de los diferentes métodos de control y mejora de la calidad (Noordhuizen y Welpelo, 1996, modificado)

Características	BP	APPCC	Normas ISO
Estado sanitario demostrable	no	si	si
Acciones correctoras específicas	no	si	si
Documentación necesaria	si	si	mucha
Oportunidad de certificación	no	si	si
Simplicidad	¿si?	si	no
Especificidad en granja	no	alta	¿si?
Inversión de trabajo	bajo	bajo	alto
Grado de autogestión	no	alto	no
Proporción coste-beneficio esperado	baja	alta	no
Integración en otros sistemas de calidad	difícil	si	no aplicable
Relación con los procedimientos industriales	no	si	si

Hasta la actualidad, la metodología del APPCC se ha empleado en las granjas de vacuno lechero para gestionar la mamitis (Cullor, 1995), para reducir el riesgo de aparición de medicamentos en la leche de tanque (Zorraquino, 1998) e, incluso, se ha desarrollado un ejemplo de utilidad de este sistema en el control de la introducción de *Salmonella dublin* en el rebaño (Noordhuizen, 1997).

Sin embargo, el sistema APPCC no se ha aplicado como método de mejora de las condiciones de producción que garanticen la obtención de una leche de calidad. El objetivo de este trabajo fue la adaptación e implementación de un sistema de APPCC para granjas de vacuno lechero con objeto de obtener leche de calidad higiénica y

microbiológica adecuada, logrando unos niveles de RCS menores de 200×10^3 células por mililitro (cel/ml), de RB menores de 20×10^3 ufc/ml, ausencia de residuos (medicamentos, detergentes, fitosanitarios) y ausencia de microorganismos patógenos.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se trabajó en 187 explotaciones de ganado vacuno de aptitud lechera de Galicia que suministraban la leche producida a dos empresas presentes en esta Comunidad Autónoma: Lactalis y Puleva Food, S.L.

En cada explotación se cubrió un cuestionario mediante una entrevista personal con el ganadero sobre distintos aspectos y características de la granja (anexo 1), agrupados en alimentación y bebida para las vacas, estado sanitario y tratamiento de los animales, gestión de medicamentos y ordeño, almacenamiento y calidad de la leche.

Tomando como referencia el manual del sistema APPCC elaborado por la FAO, en cada una de las granjas se aplicaron los 7 principios que componen la metodología del APPCC y que se agrupan en evaluación de riesgos, gestión de riesgos y documentación (FAO, 1998):

Principio 1: Analizar los peligros,

Principio 2: Determinar los PCCs,

Principio 3: Establecer los límites críticos,

Principio 4: Establecer un sistema de monitorización para controlar los PCCs,

Principio 5: Establecer las acciones correctoras cuando un PCC no está bajo control,

Principio 6: Establecer la documentación y los registros de los principios y su aplicación,

Principio 7: Establecer verificaciones para confirmar que el sistema funciona correctamente.

Estos principios se desarrollaron en 12 etapas.

RESULTADOS

1. Propuesta de creación de un equipo de trabajo

Al comienzo del desarrollo de este trabajo se realizaron una serie de visitas a las granjas con la finalidad de informar a los ganaderos de los principios y etapas del sistema, los beneficios que aporta su implementación y los recursos necesarios para su desarrollo.

Posteriormente, se celebró una reunión con todo el personal implicado en la producción de leche, en donde se distribuyeron las funciones que debía cumplir cada grupo. Como resultado, el equipo de trabajo estaba integrado por personal de todas las áreas implicadas en la producción de la leche de vaca:

- Los ganaderos titulares de las explotaciones o empleados, si existen, realizan los autocontroles, aplican las medidas preventivas y guardan registro de la documentación necesaria para garantizar la trazabilidad de la producción de leche segura y de calidad.
- Los veterinarios asesoran en calidad de la leche y control de mamitis, pero también en problemas de tipo sanitario.
- Los técnicos de mantenimiento del equipo de ordeño y del tanque de refrigeración de la leche realizan las revisiones y reparaciones cuando sea necesario.
- Los auditores internos o inspectores de la empresa lechera comprueban la aplicación del sistema APPCC, es decir, determinan si las actividades realizadas en las explotaciones se llevan a cabo correctamente.
- Los auditores externos comprueban si el protocolo de actuación en las explotaciones se realiza según el sistema APPCC.
- El equipo del Instituto de Investigación e Análises Alimentarias de la Universidad de Santiago de Compostela realiza los estudios y ensayos para el diseño, el desarrollo y la mejora continuada del sistema APPCC, en colaboración con las industrias lecheras.

Cada cierto periodo de tiempo se realizaron reuniones entre los miembros del equipo para evaluar el funcionamiento del sistema del APPCC, en donde se intercambiaron ideas, actualizaron datos, etc.

2. Descripción del producto

Según la Directiva 92/46/CEE es “leche producida por la secreción de las glándulas mamarias de una o más vacas, que no haya sido calentada por encima de 40°C, ni haya sido sometida a un tratamiento con un efecto equivalente”.

A su vez, el Reglamento (CE) 853/2004 establece “la leche cruda de vaca destinada al consumo directo o la elaboración de productos lácteos debe contener un RB (media geométrica móvil observada durante un período de 2 meses, con un mínimo de dos muestras al mes) inferior a 100×10^3 ufc/ml y RCS (media geométrica móvil observada durante un período de 3 meses, con un mínimo de una muestra al mes) inferior a 400×10^3 cel/ml”.

La descripción del producto final que se quiere obtener con este planteamiento de trabajo es la leche de tanque de refrigeración de las granjas de vacuno lechero con unos valores medios mensuales de RB menores de 20×10^3 ufc/ml, de RCS menores de 200×10^3 cel/ml y ausencia de microorganismos patógenos zoonóticos e inhibidores.

3. Identificación de la intención de uso

Leche cruda para su consumo directo tras los tratamientos térmicos aplicados en las fábricas de las empresas lecheras o como materia prima de la industria transformadora para la elaboración de derivados lácteos.

4. Construcción de un diagrama de flujo

Se realizó una descripción del proceso de producción de la leche en forma de diagrama de flujo que sirvió como guía del estudio. El diagrama se completó tras haber efectuado las visitas, las entrevistas y la observación de las distintas operaciones y con la ayuda de los planos de las instalaciones.

En él se indican los movimientos habituales del ganado y del personal, la entrada de las materias primas, así como todos los procesos implicados en la obtención de la leche.

En la figura 2.1 se presenta el diagrama de flujo del proceso de producción de leche estandarizado para las explotaciones de ganado vacuno de leche visitadas.

5. Verificación “in situ” del diagrama de flujo

Se debe confirmar que todas las actividades importantes conducentes a la producción de leche han sido identificadas; para ello, tras la elaboración del diagrama, se comprobó si se ajustaba a cada explotación y se completó o modificó cuando fue necesario.

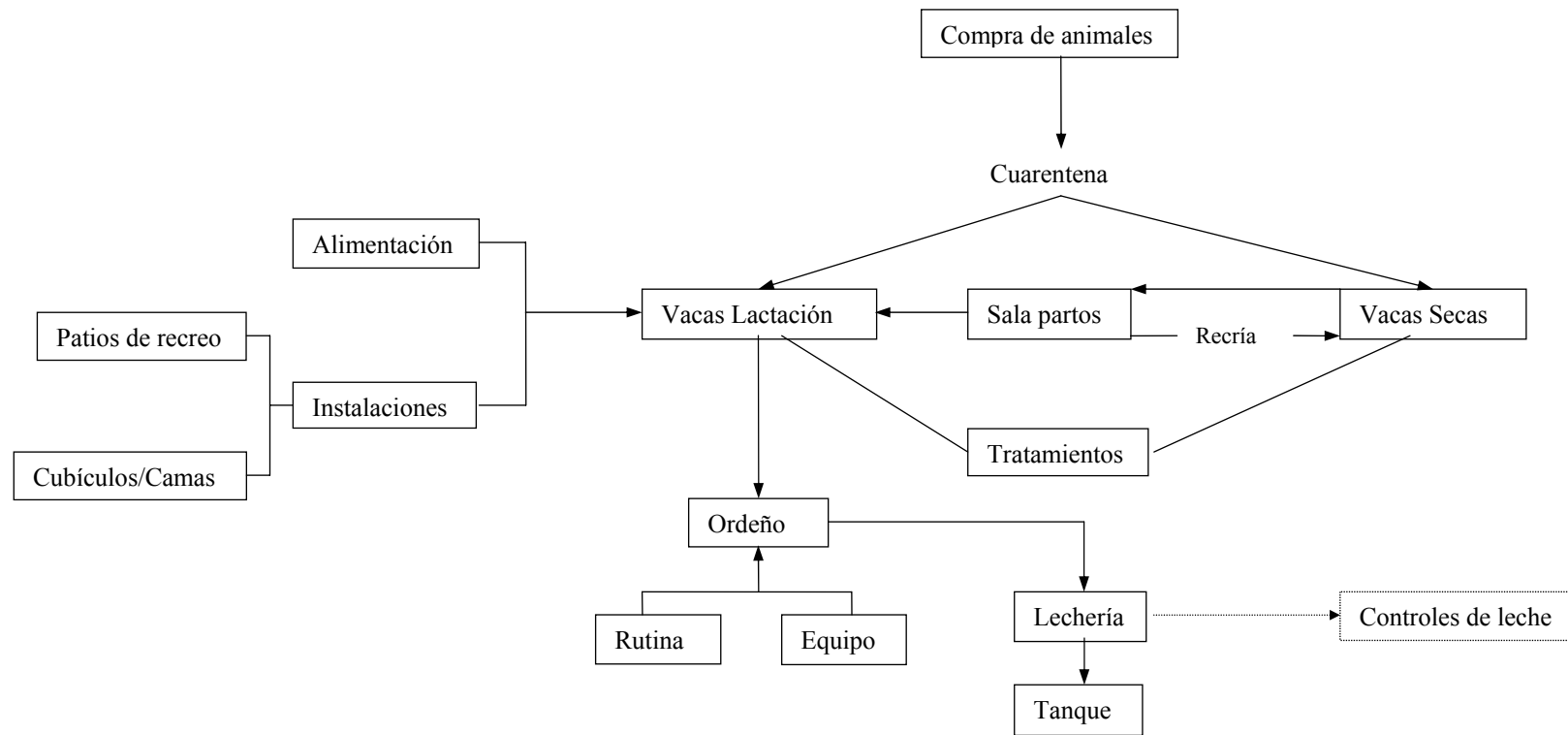


Figura 2.1: Diagrama de flujo con los movimientos del ganado y los procesos implicados en la producción de leche.

6. Principio 1: Analizar los peligros

Se deben listar todos los peligros potenciales en cada fase (evaluación de peligros), realizar un análisis de peligros y considerar las medidas de control para estos peligros identificados (gestión de peligros) e informar al equipo de trabajo (comunicación de peligros).

a) Evaluación de peligros

Con la ayuda del diagrama de flujo se identificaron todos los peligros potenciales asociados a la producción de la leche en todas las áreas de la granja. Los peligros se clasificaron en:

- biológicos: patógenos mamarios, saprofitos ó microorganismos zoonóticos como *Arcobacter* spp., *Campylobacter* spp. y *Listeria* spp.
- químicos: residuos de detergentes, desinfectantes, fitosanitarios o medicamentos.

En muchos casos no hay datos suficientes para realizar una evaluación cuantitativa de los peligros asociados a agentes patógenos, por lo que la única alternativa es la evaluación cualitativa.

b) Gestión de peligros

Una vez identificados los peligros y valorado su riesgo, se establecieron las medidas necesarias para prevenir, eliminar o reducir un peligro determinado dentro de la propia explotación ganadera, ya que se demuestra que, por lo general, la pasteurización de la leche en la industria láctea es una medida de control específica para obtener leche segura e inocua.

c) Comunicación de peligros

Periódicamente se informaba a todo el personal implicado en la producción de leche en cada granja de los peligros presentes en la misma, así como de las medidas preventivas a aplicar para su control.

En la tabla 2.2, se describen los diferentes aspectos que influyen en la producción de la leche en una explotación bovina, los peligros identificados en cada etapa y las medidas preventivas a aplicar para cada peligro.

7. Principio 2: Determinar los puntos de control crítico

Los PCC son puntos o etapas del proceso donde un peligro puede ser evitado, eliminado o reducido a un nivel aceptable y no existe una medida de control en una etapa posterior para eliminar o reducir ese peligro.

Para identificar los PCC en las granjas se utilizó un árbol de decisiones (figura 2.2) para cada peligro identificado en el principio 1 en cada una de las etapas de producción de la leche, siendo el equipo de trabajo quién decidió finalmente cuales fueron los PCCs.

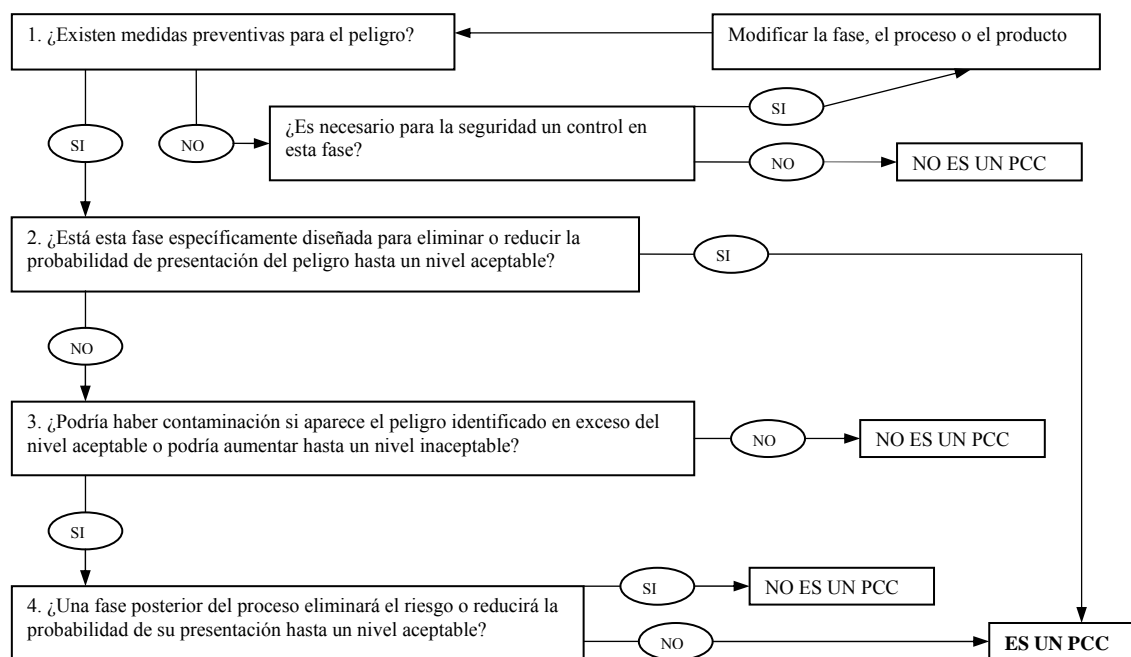


Figura 2.2: Árbol de decisiones para identificar los puntos de control crítico

Tabla 2.2: Etapas de producción de la leche, los peligros identificados, las medidas preventivas a aplicar y la determinación de los puntos de control crítico

COMPRA DE ANIMALES

ETAPA DEL PROCESO	PELIGRO	MEDIDAS PREVENTIVAS	PCC
Cuarentena	Presencia de residuos de medicamentos	Suponer que están bajo tratamiento, realizar prueba de detección de antibióticos en leche. Ordeño separado Si están secas, analizar la leche 5 días postparto	PCC-1
	Aumento del recuento de células somáticas (RCS), introducción de patógenos mamarios y zoonóticos	Comprobar historial RCS individual y del tanque de explotación de origen Análisis de leche de mezcla de cuarterones	PCC-2

ALIMENTACIÓN

ETAPA DEL PROCESO	PELIGRO	MEDIDAS PREVENTIVAS	PCC
Origen de alimentos	Introducción de patógenos zoonóticos en animales	Compra a industrias certificadas Elaboración correcta del ensilado y realización de análisis físico-químicos y microbiológicos del ensilado	PCC-3
	Presencia de fitosanitarios y abonos	Uso correcto de fitosanitarios y abonos, respetar periodos de supresión, análisis en ensilado	NO
Conservación y almacén de alimentos	Multiplicación de patógenos mamarios, zoonóticos y saprofitos Residuos de fitosanitarios	No compartir equipos para limpieza Almacén de alimentos de uso exclusivo y separado de fuentes de contaminación No utilizar ensilado de bordes, ni parte superior de silo Limpieza y desinfección del silo de concentrados, anotar fechas	PCC-4
Limpieza de bebederos y comederos	Introducción y multiplicación de patógenos zoonóticos	Situados alejados de fuentes contaminación Limpieza diaria para eliminar restos de comida	PCC-5
Agua (de bebida y/o limpieza)	Introducción y transmisión de patógenos mamarios, saprofitos y zoonóticos Aumento del recuento bacteriano (RB) en tanque	Realizar analíticas periódicas del agua. Potabilización Proteger pozos, situados alejados de fosa purines, etc.	PCC-6

Tabla 2.2: Etapas de producción de la leche, los peligros identificados, las medidas preventivas a aplicar y la determinación de los puntos de control crítico (continuación)

INSTALACIONES

ETAPA DEL PROCESO	PELIGRO	MEDIDAS PREVENTIVAS	PCC
Condiciones del Establo			
Ventilación / Iluminación	Multiplicación de patógenos mamarios, zoonóticos y saprofitos	Diseño adecuado de instalaciones Dotación suficiente de iluminación, fundamental en pasillo de alimentación	NO
Limpieza / Programa de desinfección, desinsectación y desratización	Multiplicación de patógenos mamarios, zoonóticos y saprofitos	Limpieza de pasillos diaria Colocación de mosquiteras, sellado de agujeros, grietas, etc. Desinfección mínima semestral del establo	NO
	Intoxicaciones por fitosanitarios	Respetar periodo de espera antes de entrada de animales tras desinfección	NO
Cubículos y camas			
Diseño y número	Multiplicación de patógenos mamarios, zoonóticos y saprofitos	Un cubículo por vaca en lactación Tamaño suficiente para evitar que defequen en interior Pendiente adecuada para favorecer drenaje	NO
Arreglo / Renovación	Multiplicación de patógenos mamarios, zoonóticos y saprofitos	Mantener cubículos secos, limpios y drenados Reposición periódica del material Retirada de heces y allanado de cama diario	PCC-7
Agentes secantes	Multiplicación de patógenos mamarios, zoonóticos y saprofitos	Aplicación mínima semanal	PCC-8
Patios			
Salida a pastos / patios recreo	Residuos de fitosanitarios Introducción de patógenos mamarios y zoonóticos	Períodos de supresión tras uso de fitosanitarios o aplicación de purines Evitar salida de animales a pastos en mal estado y acceso de animales silvestres Limpieza diaria de patios	PCC-9
Vacas secas			
Sala de partos	Multiplicación de patógenos mamarios, zoonóticos y saprofitos	Uso exclusivo Limpieza/reposición de cama tras cada uso, desinfección mínima semestral	NO
Alojamiento	Multiplicación de patógenos mamarios, zoonóticos y saprofitos	Separado de vacas lactación Alojamiento limpio y seco	NO

Tabla 2.2: Etapas de producción de la leche, los peligros identificados, las medidas preventivas a aplicar y la determinación de los puntos de control crítico (continuación)

TRATAMIENTOS

ETAPA DEL PROCESO	PELIGRO	MEDIDAS PREVENTIVAS	PCC
Tratamiento en lactación			
Aplicación	Introducción de patógenos mamarios y saprofitos en ubre	Usar guantes desechables Limpiar y desinfectar el pezón Introducción parcial de cánulas Aplicar baño de pezones	NO
Identificación de animales	Presencia de residuos de medicamentos	Identificar a los animales y/o tener información visible en sala, marcar puesto si se trata de estabulación fija	PCC-10
Período de supresión		Pauta correcta según receta/prospecto (dosis, vía, duración, etc.) Registro de tratamientos (fecha de tratamiento y periodo de espera), archivo de recetas	PCC-11
Retirada de la leche		Ordeño separado o en punto aparte, si no desinfectar unidad Eliminar la leche de los 4 cuarterones	PCC-12
Tratamientos de secado			
Aplicación	Introducción de patógenos mamarios y saprofitos a ubre	Secado brusco. Tratar todos los cuarterones a secar: una cánula por cuarterón Limpiar y desinfectar el pezón, introducción parcial de cánula, etc.	NO
Duración / Período de supresión	Introducción de patógenos mamarios a ubre	Vigilar si las vacas presentan signos de inflamación	NO
	Presencia de residuos de medicamentos	Registro de fecha de secado, parto y período de espera Duración del secado entre 6-8 semanas. Si es menor de 30 días, tirar leche 7 días	PCC-13
Otros tratamientos (antiparasitarios, etc.)	Presencia de residuos de medicamentos	Aplicación en etapa de secado de la vaca Respetar el período de espera si tratamiento es en lactación	NO
Otros			
Almacén y uso de medicamentos	Presencia de residuos de medicamentos	Almacenamiento correcto, separar tratamientos de lactación y de secado, proteger de contaminación Mantener correcto etiquetado, desechar caducados, etc. Disponer de servicio veterinario responsable del uso de medicamentos en granja	NO
Eliminación de animales	Introducción y multiplicación de patógenos mamarios	Eliminar vacas con mamitis crónicas (infecciones crónicas con elevados RCS varios meses seguidos, infecciones persistentes en lactaciones sucesivas, infección en 3 ó 4 cuarterones, vacas tratadas de mamitis 3 ó más veces)	PCC-14

Tabla 2.2: Etapas de producción de la leche, los peligros identificados, las medidas preventivas a aplicar y la determinación de los puntos de control crítico (continuación)

ORDEÑO

ETAPA DEL PROCESO		PELIGRO	MEDIDAS PREVENTIVAS	PCC
Condiciones del ordeñador		Transmisión de patógenos mamarios, saprofitos y zoonóticos. Presencia de inhibidores en tanque	Formación específica del personal que ordeña Seguir normas básicas de higiene: usar ropa limpia y de uso exclusivo para el ordeño, utilizar y limpiar guantes, no fumar ni comer durante el ordeño, etc.	NO
Rutina				
Orden de ordeño		Transmisión de patógenos mamarios y zoonóticos	Establecer orden de ordeño según Californian mastitis test (CMT) o control lechero	PCC-15
Manejo pre-ordeño	Despuntado e higienización	Introducción y transmisión de patógenos mamarios, saprofitos y zoonóticos Aumento del RB Presencia de inhibidores	Eliminar primeros chorros en recipiente o limpiar entre tandas Limpieza correcta de ubres y pezones con paños individuales, productos adecuados Secar bien pezones antes de colocar pezoneras. Evitar mojar ubre	PCC-16
	Colocación de pezoneras		Tiempo entre estimulación y colocación pezoneras 60-90 segundos Colocación de pezoneras evitando entrada de aire	NO
Fase de ordeño		Introducción de patógenos mamarios, saprofitos y zoonóticos a la ubre	Controlar el nivel de vacío durante ordeño y funcionamiento de pulsadores	NO
Manejo post-ordeño	Retirada de pezoneras	Introducción de patógenos mamarios, zoonóticos y saprofitos en ubre	Retirada inmediata de pezoneras tras finalizar ordeño, cortando el vacío No realizar apurado manual, apurado con máquina ≤ 5 segundos	PCC-17
	Baño pezones		Baño de pezones cubre mínimo 75% superficie	
	Control de vacas		Evitar que los animales se tumben	
Equipo de ordeño				
Local de ordeño		Multiplicación de patógenos mamarios, zoonóticos y saprofitos	Limpiar tras el ordeño, paredes y suelos lavables, drenaje correcto Iluminación y ventilación suficiente Diseño adecuado, fácil acceso y salida, no comunicación directa con fuentes de contaminación	NO
Limpieza del equipo de ordeño		Aumento del RB, patógenos mamarios y zoonóticos Presencia de residuos de detergentes	Limpieza y desinfección interior correcta tras ordeño con dosis de detergentes, temperatura del agua y aclarado adecuados	PCC-18
			Limpieza exterior del equipo de ordeño	NO
Funcionamiento	Revisiones y cambios	Introducción de patógenos mamarios, zoonóticos y saprofitos en ubre	Diseño adecuado según producción de leche Evitar fluctuaciones de vacío durante ordeño, comprobar reserva tras ordeño Revisión y mantenimiento periódicos del equipo (pulsadores, nivel vacío, conducciones, unidades, regulador, etc.) Cambio de elementos según recomendaciones del fabricante	PCC-19
	Pulsadores			
	Nivel de vacío			

Tabla 2.2: Etapas de producción de la leche, los peligros identificados, las medidas preventivas a aplicar y la determinación de los puntos de control crítico (continuación)

LECHERÍA

ETAPA DEL PROCESO	PELIGRO	MEDIDAS PREVENTIVAS	PCC
Instalaciones			
Lechería	Multiplicación de patógenos zoonóticos y saprofitos Presencia de inhibidores	Separada y aislada de fuentes de contaminación Iluminación y ventilación suficiente. Protección contra roedores e insectos Limpieza diaria, paredes y suelos lavables, drenaje correcto Local de uso exclusivo: no utilizar como botiquín, vestuario, oficina, etc.	NO
Tanque de almacenamiento			
Capacidad / Funcionamiento	Aumento del RB y patógenos zoonóticos	Revisiones y mantenimiento periódicos Capacidad adecuada al volumen producido y frecuencia de recogida de leche Dotación de termómetro	PCC-20
Limpieza	Aumento del RB y patógenos zoonóticos Presencia de detergentes	Limpieza y desinfección correcta tras vaciado, con dosis de detergentes, temperatura del agua y aclarado adecuados	PCC-21

Determinadas etapas no fueron consideradas PCCs, por tratarse de peligros para los cuales las medidas preventivas no pudieron ser implementadas porque conllevarían inversiones económicas que el ganadero no está dispuesto a realizar o porque la no aplicación de las medidas no conllevaba un peligro directo sobre la calidad de la leche.

Los PCC identificados en cada etapa de producción fueron (tabla 2.2):

1. Compra de animales

En la cuarentena se establecieron los PCC-1 y PCC-2. Los animales comprados son la causa de la introducción en el rebaño de patógenos mamarios contagiosos y microorganismos zoonóticos. Además, estos animales pueden estar bajo tratamiento y ser fuente de residuos de medicamentos para la leche.

2. Alimentación

En este bloque se identificó el PCC-3: origen de alimentos, el PCC-4: conservación y almacén de alimentos, el PCC-5: limpieza de los comederos y bebederos y el PCC-6: agua utilizada en la explotación. En estas áreas, si no se realizan de manera adecuada unas buenas prácticas, se favorecerá la introducción en el rebaño de microorganismos causantes de mamitis ambientales, patógenos zoonóticos y demás bacterias saprofitas. Incluso podrían ser fuente de residuos de fitosanitarios.

3. Instalaciones

3a. Cubículos y camas:

PCC-7 y PCC-8: el mantenimiento inadecuado de los cubículos y las camas es uno de los principales factores causantes de mamitis ambientales. En esta zona del establo el contacto entre las ubres de los animales y el ambiente es directo, favoreciendo el asentamiento de microorganismos patógenos zoonóticos y bacterias saprofitas en los animales.

3b. Patios y pastos:

PCC-9: si las vacas salen a pastos y/o patios que están en malas condiciones, la probabilidad de introducción de patógenos mamarios y zoonóticos aumentará. De igual manera, el riesgo de residuos fitosanitarios aumentará si salen tras la aplicación de estos productos.

4. Tratamientos

4a. Tratamientos en lactación:

PCC-10: una de las causas más probables de aparición de residuos de medicamentos en la leche del tanque se produce cuando no se realiza o se hace de manera incorrecta la identificación de las vacas tratadas.

PCC-11: si no se siguen las pautas de administración indicadas en el prospecto del medicamento, el período de supresión puede no conocerse con seguridad.

PCC-12: no ordeñar las vacas en puntos separados del equipo y no eliminar la leche de todos los cuarterones, independientemente de haberlos tratado todos o no, facilita la llegada de estos residuos medicamentosos a la leche.

4b. Tratamientos de secado:

PCC-13: en el tratamiento de secado de las vacas es fundamental cumplir el período de espera, sobre todo en caso de partos prematuros, abortos, etc. porque conducirá a la presencia de residuos de antibióticos en la leche del tanque.

4c. Otros:

PCC-14: los animales con mamitis crónica son una fuente continua de infección para los otros animales, por lo que deben ser eliminados.

5. Ordeño

5a. Rutina de ordeño:

PCC-15: seguir un orden de ordeño es importante para evitar el contagio de mamitis y la transmisión de patógenos zoonóticos entre animales mediante las pezoneras, las manos y el ambiente.

PCC-16: el despuntado es una manera precoz de detectar mamitis clínicas y mejorar la calidad bacteriana de la leche. La higienización correcta del pezón se realiza para evitar la transmisión de bacterias entre animales y el aumento del RB.

PCC-17: se debe evitar el sobreordeño porque dañará las defensas mecánicas del animal frente a nuevas infecciones y que las vacas se tumben tras finalizar el ordeño puesto que facilitará la entrada de nuevas infecciones en la ubre.

5b. Equipo de ordeño:

PCC-18: una inadecuada limpieza del equipo de ordeño provoca un aumento significativo del RB en tanque, e incluso la presencia de residuos de detergentes si el aclarado no es completo.

PCC-19: las rugosidades en las gomas de las pezoneras pueden actuar como reservorio de patógenos mamarios y zoonóticos. Las fluctuaciones de vacío en el extremo del pezón facilitan la entrada de bacterias y junto con el mal funcionamiento de los pulsadores alteran la barrera defensiva del pezón frente a las infecciones mamarias.

6. Tanque de refrigeración y almacenamiento

Se determinaron los PCC-20 y PCC-21: el tanque debe funcionar correctamente porque en caso contrario provocará aumentos en el RB y la presencia de patógenos zoonóticos. Debe ser higienizado correctamente tras su vaciado para evitar la presencia de inhibidores como residuos de detergentes.

8. Principio 3: Establecer los límites críticos

Los límites críticos se establecen en base a normas y textos legales y/o a la literatura científica de forma que sean medibles objetivamente, por lo que se suelen utilizar valores numéricos. Sin embargo, en el sector primario resulta complicado cuantificar la presencia o ausencia de un peligro biológico o químico en una etapa del proceso de producción. Así, en este trabajo, la mayoría de los límites críticos se han establecido como la realización o no de actividades consideradas BP o medidas preventivas.

En la tabla 2.3 se reflejan las actuaciones a realizar una vez identificados los PCCs como es el establecimiento de límites críticos.

9. Principio 4: Establecer un sistema de monitorización para controlar los PCCs

Cada uno de los miembros implicados en la producción de leche llevará a cabo las labores de vigilancia relacionadas con su ámbito de trabajo:

- Los ganaderos vigilan de manera periódica y continuada los PCCs establecidos para evaluar si están dentro de los límites críticos.

- Los veterinarios que trabajan en calidad de leche y control de mamitis revisan mensualmente las analíticas de la leche emitidas por el Laboratorio Interprofesional Galego de Análise do Leite (LIGAL).
- Los técnicos especialistas en el equipo de ordeño monitorizan el funcionamiento del equipo a través de las revisiones anuales.
- El equipo de la Universidad realiza visitas periódicas a las explotaciones en las que: i) monitoriza la entrada y la presencia de patógenos zoonóticos, *Listeria* spp., *Arcobacter* spp. y *Campylobacter* spp., en la granja mediante el análisis de los ensilados y de las heces de las vacas en lactación, ii) monitoriza la presencia o ausencia de patógenos mamarios y zoonóticos (*L. monocytogenes*) en la leche del tanque, iii) observa la rutina de ordeño de las granjas y iv) evalúa la limpieza del equipo de ordeño mediante la ATP bioluminiscencia.

En la tabla 2.3 se muestran las actuaciones llevadas a cabo a través de un sistema de monitorización tras la identificación de los PCCs.

10. Principio 5: Establecer las acciones correctoras

Las medidas correctoras se aplican cuando existe una desviación del límite crítico en un PCC con el objetivo de situarlo de nuevo bajo control. Estas acciones deben eliminar el potencial peligro creado por una desviación del sistema, garantizando la producción de una leche segura y de calidad.

En la tabla 2.3 se muestra la descripción de las medidas correctoras a aplicar cuando haya desviaciones en los límites críticos.

Tabla 2.3: Actuaciones a realizar una vez identificados los puntos de control crítico

PCC	LIMITE CRÍTICO	MONITORIZACIÓN	ACCIONES CORRECTORAS	REGISTRO
1	No comprobar si las vacas compradas en lactación están bajo tratamiento. Ordeño junto con el rebaño	Comprobar registro de tratamientos del ganado de origen	Seguir medidas preventivas	Libro de tratamientos rebaño de origen. Resultados pruebas de antibióticos
2	Desconocer el recuento de células somáticas (RCS) del rebaño de origen del animal comprado y no analizar la leche de mezcla de cuarterones de la vaca si está en lactación No tener un área separada para animales comprados	Revisar analíticas de la leche del rebaño de origen Comprobar la existencia de un lugar de cuarentena	Analizar la leche de la vaca comprada antes de su introducción en el rebaño y rechazar cuando existan alteraciones Establecer un área como lugar de cuarentena	Boletines del Laboratorio Interprofesional Galego de Análise do Leite (LIGAL)
3	No analizar los alimentos para su consumo, principalmente el ensilado, ni exigir garantías a la empresa suministradora	Revisión de las analíticas de los alimentos, etiquetas de las raciones, etc.	Seguir las medidas preventivas	Anotar analíticas de ensilados, etiquetas de alimentos comprados (piensos, materias primas, etc.)
4	Uso compartido de equipos e instalaciones con el de limpieza Mala conservación de los alimentos (plásticos de ensilado rotos, falta de limpieza/desinfección de los locales, etc.)	Comprobar uso de maquinaria Revisar estado de plásticos de los ensilados, limpieza de los silos y lugares de almacén	Aplicar las medidas preventivas	Registro de aplicaciones de desinfectantes en locales de almacén
5	Bebederos con agua estancada y sucia Acúmulo de restos de alimentos en los pasillos de alimentación	Comprobación visual diaria del estado de limpieza	Limpiar una vez/día los bebederos y los comederos antes de suministrar el alimento	Anotar las comprobaciones del estado de los bebederos y comederos
6	Vertido de purines cerca de las fuentes de agua, no potabilización en caso necesario	Revisión de las analíticas del agua	Instalación de clorador y potabilización del agua	Anotar las analíticas del agua y registro de fechas de cloración
7	Llenado deficiente o vacío, no arreglo diario, camas húmedas y sucias	Comprobación visual diaria del estado de las camas	Aumentar la frecuencia de arreglo y renovación del material	Anotar frecuencia de reposición de camas
8	No utilización de agentes secantes o utilizarlos con frecuencia inferior a la semanal	Comprobación visual diaria del estado de las camas	Aumentar la frecuencia de utilización de agentes secantes	Registro de aplicación de agentes secantes
9	Permitir salida a pastos sin cumplir período de espera tras aplicación de purines, etc. Pastos / patios en mal estado, embarrados, etc.	Comprobar el estado y situación de los pastos / patios	No salir a pastos / patios	Registro de aplicaciones de fitosanitarios Comprobación del estado del pasto /patio
10	Ordeñador no conoce a los animales en tratamiento Ausencia de registro de vacas en tratamiento	Asegurarse del marcado de todas las vacas en tratamiento o existencia de pizarra en sala de ordeño	Desechar la leche de las vacas sospechosas	Libro de registro de tratamientos, marcado de animales

Tabla 2.3: Actuaciones a realizar una vez identificados los puntos de control crítico (continuación)

PCC	LIMITE CRÍTICO	MONITORIZACIÓN	ACCIONES CORRECTORAS	REGISTRO
11	No reajustar el período de supresión tras prescripción excepcional (combinación productos, dosis o frecuencia distinta a la indicada en el prospecto, etc.)	Revisión de las instrucciones indicadas en la receta veterinaria	Desechar la leche de vacas sospechosas	Libro de registro de tratamientos y archivo de recetas
12	No ordeño de las vacas en tratamiento al final o en punto aparte Eliminar la leche sólo del cuarterón tratado	Comprobar ordeño de animales en tratamiento al final, desvío del equipo, o existencia de cántara	Desechar la leche de vacas sospechosas	Libro registro tratamientos, marcado de animales en tratamiento
13	Desconocer el período de supresión por prescripciones excepcionales, partos prematuros y en general, secados con duración menor 6-8 semanas	Revisar registros de fechas de secado, parto esperado y período de espera	Realizar analíticas periódicas de inhibidores Desechar la leche de vacas sospechosas	Libro registro de tratamientos, registro fecha secado, parto y período de espera Resultados pruebas de antibióticos
14	Mantener en rebaño vacas con mamitis crónica	Comprobar historial de RCS, de tratamientos y curaciones	Aplicar las medidas preventivas	Libro registro de tratamientos, boletines del LIGAL
15	Desconocer si las vacas sufren mamitis y no separarlas cuando están en la sala de espera	Comprobación en cada ordeño que el orden es correcto	Aplicar las medidas preventivas	Comprobación visual durante el ordeño
16	No realizar despuntado Compartir paños entre vacas o no limpiar las ubres No secar la ubre antes de colocar las pezoneras No enjuagar suficientemente las pezoneras si las desinfecta entre vacas durante el ordeño	Observación de la leche despuntada Comprobación de la limpieza del extremo del pezón con un algodón Observar si los pezones están secos	Aplicar las medidas preventivas	Comprobación visual durante el ordeño
17	Pezoneras permanecen puestas tras detenerse flujo de leche No utilización de baño de pezones postordeño Se tumban un gran número de vacas tras el ordeño	Vigilar en cada ordeño Medición leche residual	Seguir las medidas preventivas Ajustar retiradores automáticos	Observación durante y tras finalizar el ordeño Comprobar ajustes retiradores automáticos
18	No lavar el equipo tras el ordeño o hacerlo en condiciones deficientes: temperatura agua menor a 60-65°C, detergentes a dosis inadecuadas, aclarado con agua no potable, etc. No drenar completamente las conducciones del equipo antes del siguiente ordeño	Observación de la limpieza alcanzada (en gomas, juntas, etc.). Mediciones de ATP bioluminiscencia	Revisión del sistema de lavado y funcionamiento del calentador de agua	Boletines del LIGAL
19	Existencia de fallos en los pulsadores (“cojeo” > 5%, fase succión inferior al 30% y relajación inferior al 15%) y fluctuaciones de vacío > 10Kpa en tubo corto de leche	Observación durante ordeño del vacuómetro, frecuencia de pulsación y si las pezoneras caen	Reparar y/o cambiar los pulsadores Corregir el nivel de vacío	Testajes estático y dinámico del equipo de ordeño Observaciones durante el ordeño
20	El tanque no está a 3-4°C como máximo en la media hora posterior al final del ordeño	Comprobación diaria del tiempo y temperatura de enfriamiento	Reparar o sustituir el tanque	Testajes anuales Boletines del LIGAL
21	No se lava a diario con solución alcalina clorada y agua a 50-60°C y semanalmente con solución ácido desincrustante No se realiza aclarado tras el lavado o el drenaje es incorrecto	Observación diaria de la limpieza alcanzada	Revisión del sistema de lavado	Boletines del LIGAL

11. Principio 6: Establecer la documentación y los registros de los principios

El registro de los datos y la documentación constituyen una prueba escrita del desarrollo de todas las actividades implicadas en la producción de la leche que facilita el seguimiento retrospectivo y permite la verificación del sistema. Además supone la única referencia disponible que asegura la trazabilidad del producto.

En los registros se incluyen:

- el esquema de trabajo seguido: descripción del equipo, elaboración de los diagramas de flujo, establecimiento de los límites críticos, etc.
- los registros generados en su aplicación: datos de la monitorización, de las acciones correctoras, etc.

La tabla 2.3 contiene el sistema de registro de datos y documentación necesarios en cada PCC.

12. Principio 7: Establecer verificaciones para confirmar que el sistema funciona

Las verificaciones realizadas en las 187 granjas de vacuno lechero, incluidas en este programa fueron diferentes en función de la empresa que le recogiese la leche.

El personal del departamento de calidad de leche de Lactalis realiza auditorías periódicas a las granjas para comprobar el cumplimiento del sistema de APPCC y verificar los resultados de los controles analíticos de la leche, el agua, etc. En cada inspección emiten un informe por escrito con las inconformidades y las posibilidades de mejora que es enviado a la explotación ganadera auditada.

Una entidad certificadora, externa a la empresa, programa las auditorías a las explotaciones y a la industria, verifica la conformidad con los requisitos del APPCC y emite un informe de cada auditoría.

El personal de Puleva Food, S.L. también realiza auditorías de manera periódica en las granjas. La finalidad de estas auditorías es comprobar que la implementación del sistema de APPCC se realiza de manera correcta y hacer las recomendaciones necesarias para

mantener el buen funcionamiento del mismo, con el objetivo de garantizar la producción de leche higiénica.

DISCUSIÓN

En este trabajo se ha desarrollado un sistema APPCC, adaptándolo e implementándolo en explotaciones de ganado vacuno lechero de Galicia en todas las etapas de producción para la mejora de la calidad higio-sanitaria de la leche.

El sistema APPCC se está utilizando desde hace años en los procesos industriales de elaboración de alimentos, tanto en la industria cárnica (Mouwen y Prieto, 1998) como en la láctea (Morgan, 2004), con el objetivo de prevenir los peligros en salud pública, evitando las alteraciones de la calidad en los alimentos a través de la aplicación de prácticas adecuadas en los PCCs identificados. Por el momento a la producción primaria no se le exige la aplicación de los principios del APPCC, sin embargo, a medio plazo esta metodología aplicada a la producción de productos de origen animal en granjas o a la gestión de la sanidad animal podría ser desarrollada dentro de un sistema de control de la calidad (Noordhuizen y Welpelo, 1996).

Por otra parte, la utilización del APPCC en el sector primario se ha visto dificultada por la ausencia de parámetros de evaluación objetivos y medibles. En consecuencia, ciertos investigadores consideran que la aplicación del sistema APPCC en el sector primario no resulta viable, con lo que abogan por la implementación de guías de BP (Gonzalo y col., 2004). El fundamento de las BP es realizar cambios cualitativos en el proceso de producción para mejorar la calidad del producto, pero no es un método demostrable ni certificable como es el APPCC (Noordhuizen y Welpelo, 1996).

A pesar de esto, la aplicación de unas BP es necesaria para la correcta implementación del APPCC. Un ejemplo es el Programa de Aseguramiento de la Calidad de la Leche en Canadá, en el cual las BP se utilizan como medidas de control para prevenir los problemas de calidad y seguridad alimentaria en las granjas como fundamento de un sistema APPCC (Agriculture and Agri-Food Canadá, 2001), con unos planteamientos similares a los realizados en nuestro estudio. En dicho trabajo se identifican como PCCs esenciales la

administración de medicamentos en la granja, el enfriamiento y conservación de la leche, la limpieza del equipo de ordeño y el uso del agua para la limpieza de superficies de contacto con la leche, que corresponden en nuestro caso con los PCCs indicados en las etapas de tratamiento en lactación y en secado (PCC-10, PCC-11, PCC-12 y PCC-13), del tanque de almacenamiento (PCC-20 y PCC-21) y del agua de bebida y/o limpieza (PCC-6).

Desde hace años se están llevando a cabo actividades para certificar a grandes productores de ganado en la gestión de la calidad ambiental, en la gestión de la producción o en el cuidado de la sanidad animal en países europeos como Alemania, Dinamarca y Holanda. También en Australia están aplicando programas de gestión de la calidad en rebaños lecheros basados en el sistema APPCC (Noordhuizen y Frankena, 1999). En España la adaptación e implementación de la metodología del APPCC en granjas de vacuno lechero no se ha instaurado, por lo que con este trabajo se pretendió ayudar a los ganaderos en la obtención de una leche segura y de calidad, facilitando la certificación del proceso de producción.

Otros trabajos en los que se utilizó la metodología del APPCC en granjas de vacuno lechero, lo aplicaron para el control de determinados peligros o ciertas etapas de la producción de leche como fueron el control de mamitis, la gestión de la sanidad animal, la presencia de residuos de medicamentos en la leche del tanque y el ordeño (Cullor, 1995; Noordhuizen y Welpelo, 1996; Sisco y col., 1997; Zorraquino, 1998; Alves, 2003). En nuestro estudio el APPCC se amplió a todas las etapas en las que estaban implicados los animales productores de leche, desde la entrada de materias primas para su alimentación hasta la eliminación de aguas residuales después de la limpieza de las instalaciones, así como a los diferentes aspectos que pueden influir sobre la calidad de la leche.

El último trabajo mencionado se trató también de una Tesis (Alves, 2003) y el sistema APPCC se implementó únicamente en dos granjas lecheras de Brasil, centrándose sólo en las actividades relacionadas con la rutina de ordeño. De manera similar a nuestro estudio, se evaluó la eficacia del APPCC frente a la utilización de las BP como único método de control de la calidad de la leche, obteniéndose resultados similares a los del presente

trabajo en lo que respecta a la mejora del RCS y del RB, así como en reducir el número de cuarterones afectados y en la gravedad de las mamitis presentes.

Asimismo, pudimos comprobar, al igual que lo indicado por otros investigadores (Noordhuizen y Frankena, 1999; Alves, 2003) que el éxito de la aplicación del sistema de APPCC en las explotaciones de ganado vacuno lechero se centra en gran parte en el personal de la granja, específicamente en su participación activa y su compromiso, más que en la calidad higio-sanitaria de la leche o del nivel tecnológico de la explotación al inicio de la implementación del APPCC.

Como consecuencia del presente estudio, se comprobó que con únicamente unas pocas adaptaciones y modificaciones, el sistema APPCC puede ser desarrollado y puesto en práctica de manera individual en las granjas de ganado vacuno lechero para obtener un producto final de calidad. No obstante, nuevos estudios epidemiológicos de campo basados en análisis de peligros son necesarios para identificar los PCCs y diseñar procedimientos de APPCC para este tipo de explotaciones ganaderas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agriculture and Agri-Food Canada. 2001. Canadian Quality Milk-Quality Assurance Program. Reference Manual, Canada.

Alves, A. 2003. Aplicação do sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) em propriedades leiteiras. Tesis. Pirassununga, Brasil.

Cullor, J. S. 1995. Implementing the HACCP program on your clients' dairies. *Vet Med*, 90: 290-295.

Cullor, J. S. 1997. HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points): Is it coming to the dairy? *J Dairy Sci*, 80: 3449-3452.

Diéguez, J.; Soto, E.; Seijas, A. 2004. Guía de manejo para explotaciones de vacuno lechero: Análisis de peligros y puntos de control críticos (APPCC). Ed. Lactalis, Lugo.

Diario Oficial de la Unión Europea. 1992. Directiva 92/46/CEE del Consejo, de 16 de junio de 1992, por la que se establecen las normas sanitarias aplicables a la producción y comercialización de leche cruda, leche tratada térmicamente y productos lácteos. DOCE nº L268 de 14/09/1992.

Diario Oficial de la Unión Europea. 2004. Reglamento 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. DOCE nº L139/55 de 25/06/2004.

Escrache, I.; Doménech, E. 2004. El APPCC, elemento clave para garantizar la seguridad alimentaria. Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo. Universidad Politécnica de Valencia. Ed. UPV, Valencia.

FAO. 1998. Food quality and safety systems. A training manual on food hygiene and the hazard analysis and critical control point (HACCP) system. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Gonzalo, C.; Blanco, M. A.; Palacios, C.; Martínez, A.; Beneitez, E.; González, F.; Juárez, M. T.; Granado, J. C. 2004. Buenas prácticas ganaderas y modelo asistencial de evaluación de la seguridad de la leche en las explotaciones ovinas y caprinas. XXI Jornadas GTEMCAL, Asturias.

Morgan, T. G. 2004. Milk quality assurance and good farming practice on dairy farms. XXI Jornadas GTEMCAL, Asturias.

Mouwen, J.; Prieto, M. 1998. Aplicación del sistema ARICPC-HACCP a la industria cárnica. *Cienc Tecnol Aliment*, 2: 42-46.

Noordhuizen, J. P. T. M.; Welpelo, H. J. 1996. Sustainable improvement of animal health care by systematic quality risk management according to the HACCP concept. *Vet Q*, 18: 121-126.

Noordhuizen, J. P. T. M.; Frankena, K. 1999. Epidemiology and quality assurance: applications at farm level. *Prev Vet Med*, 39: 93-110.

Sischo, W. M.; Kiernan, N. E.; Burns, C. M.; Byler, L. I. 1997. Implementing a quality assurance program using a risk assessment tool on dairy operations. *J Dairy Sci*, 80: 777-787.

Zorraquino, M. A. 1998. Aplicación de un sistema de análisis de riesgos y puntos críticos para asegurar una leche libre de residuos de medicamentos veterinarios. Curso de medicina de la producción en vacuno lechero, Lugo.

6.- Agua:

- origen: pozo traída otros: _____
 - potable SI NO
 - tiene clorador SI NO
 - analíticas periódicas NO
- SI: parámetros: E. coli coliformes enterococos otros

Observaciones:

4. ESTADO SANITARIO DE LOS ANIMALES

- 1.- Explotación libre de enfermedades de Campaña de Saneamiento Ganadera: SI NO
- 2.- Está en Asociación Defensa Sanitaria Ganadera:
SI: cuál?: _____
NO: Está en otras agrupaciones de servicios veterinarios?
NO SI: alimentación serv. reproducción serv. podología
- 3.- Existe un lugar apartado para animales enfermos o en cuarentena SI NO
- 4.- Compra de animales:
- recría SI NO
- a quién: tratante otra explotación importa otros: _____
- chequea: estado explotación de origen (RCS) SI NO
CMT SI NO
analiza mezcla de los 4 cuarterones NO SI: que analiza?: _____

Observaciones:

5. GESTIÓN DE MEDICAMENTOS Y TRATAMIENTOS DE ANIMALES

- 1.- Existe botiquín:
- Está en un lugar adecuado SI NO
- Está ordenado SI NO
- 2.- Tratamientos mamitis:
- si es intramuscular e intracisternal, como es el período de supresión:
prospecto veterinario más días otros: _____
- identificación individual de vacas tratadas SI NO
- ordeño aparte con recipiente separado las vacas tratadas SI NO
- ordeña al final las vacas tratadas SI NO
- retirada de la leche: 4 cuarterones cuarterón tratado
- se avisan entre ordeñadores SI NO
- si sospecha el paso de leche a tanque: avisa empresa tira leche tanque otros: _____
- todos los tratamientos son con receta SI NO
- lleva libro tratamientos al día SI NO

Observaciones:

CAPÍTULO 3

APLICACIÓN DEL ATP BIOLUMINISCENCIA PARA DETERMINAR LA LIMPIEZA DEL EQUIPO DE ORDEÑO EN EXPLOTACIONES DE GANADO VACUNO

INTRODUCCIÓN

La limpieza de las superficies de la máquina de ordeño en contacto con la leche en las explotaciones bovinas es uno de los principales factores que influyen sobre el RB total de la leche del tanque de refrigeración. Por ello, es importante un buen sistema de control de la limpieza del equipo de ordeño (Nieuwenhof, 1996; Slaghuis y Wiegiersma, 1996).

La evaluación de la limpieza de las superficies en industrias alimentarias ha estado realizándose mediante métodos microbiológicos como el recuento en placa, que requieren de varios días de incubación. El método de ATP bioluminiscencia es una alternativa válida al proporcionar datos en tiempo real (Griffiths, 1993; Davidson y col., 1999; Samkutty y col., 2001; Aycicek y col., 2006). Esta característica hace que esta técnica sea de gran utilidad para la monitorización de la limpieza dentro de un sistema de APPCC (Seeger y Griffiths, 1994; Champiat y col., 2001).

La ATP bioluminiscencia ha sido utilizada en varios campos, en la industria farmacéutica y en la alimentaria, para la monitorización de la higiene de las superficies hospitalarias (Seeger y Griffiths, 1994) y de las industrias lácteas (Murphy y col., 1998), para determinar la carga microbiana en los productos alimenticios como en muestras de leche (Brovko y col., 1991), canales de porcino y vacuno (Siragusa y Cutter, 1995; Siragusa y col., 1995) y también en ubres de vacas en lactación (Finger y Sischo, 2001).

El contenido en ATP está relacionado con el RB, pero el ATP también puede proceder de restos biológicos no bacterianos (Champiat y col., 2001; Corbitt y col., 2000).

La principal ventaja de esta técnica es que se trata de una prueba de campo con obtención rápida de datos, fácil de usar y repetible (Finger y Sischo, 2001).

Hasta ahora no se ha publicado ningún estudio científico, a excepción de alguna comunicación en congresos (Slaghuis y Wiegiersma, 1996; De Celis, 2006) en los que se evalúe la higiene de la superficie del equipo de ordeño de las granjas bovinas. Así, los objetivos de este estudio fueron determinar el ATP presente en diferentes puntos del equipo de ordeño de explotaciones de ganado vacuno y su correlación con el RB de la

leche del tanque, así como indicar los valores de ATP que podrían ser referencia de adecuada limpieza en cada una de las superficies analizadas. A su vez, valorar la influencia de diversos aspectos relacionados con el sistema de ordeño y la frecuencia de limpieza del equipo de ordeño en el valor de ATP.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

El trabajo fue realizado durante el periodo 2004-2006, en 106 explotaciones de ganado vacuno de aptitud lechera, localizadas en Galicia e integradas en un programa de certificación basado en el sistema APPCC. El número medio de animales por explotación fue 65,5 (8-480) con 40,9 (6-260) vacas en lactación. El 55,7% de las granjas realizan el ordeño en sala, el 32,1% en plaza mediante circuito y el 12,3% restantes ordeñan en plaza con cántara.

En cada una de las granjas se cubrió un cuestionario mediante entrevista personal con el ganadero, recogiendo datos relacionados con la higiene del equipo de ordeño como fueron el origen del agua usada en el lavado del mismo y la frecuencia de utilización del detergente ácido. Así mismo, se registraron los valores de RB total de la leche de tanque de refrigeración, los cuales se clasificaron en tres clases: clase A ($<20 \times 10^3$ ufc/ml), clase B ($20-100 \times 10^3$ ufc/ml) y clase C ($>100 \times 10^3$ ufc/ml).

El cuestionario utilizado para la recogida de datos se presenta en el anexo 1 del capítulo 2.

Ensayo de la ATP bioluminiscencia

Se valoró la cantidad de ATP en diferentes superficies del equipo de ordeño, a través la reacción de la luciferina-luciferasa en solución tamponada, midiéndose la luz emitida en URL mediante un luminímetro portátil HY-LITE® (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las superficies del equipo de ordeño analizadas fueron: las gomas de las pezoneras, los colectores, las unidades finales y en caso de ser un ordeño en plaza mediante circuito también los puntos de conexión al circuito, realizándose mediciones en 265 superficies distintas.

Análisis estadístico

El análisis de todos los datos se realizó con el programa estadístico SPSS 13.0. Los resultados de URL y RB fueron transformados en logaritmo decimal de URL (LURL) y RB (LRB), y posteriormente se aplicó una regresión lineal múltiple para valorar la concordancia entre las URL como variables independientes cuantitativas y el RB como variable dependiente. Se utilizó el ANOVA para evaluar la significación estadística entre las diferentes variables relacionadas con el sistema de ordeño.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sólo el 31,1% de las granjas disponían de agua de origen público, mientras que en el 68,9% restante el agua tenía origen privado, siendo generalmente agua no potable. En cuanto al uso del detergente ácido, el 28,3% lo utilizan a diario, el 19,2% varias veces por semana, el 44,4% semanalmente y el 8,1% no lo utilizan nunca.

Las granjas se clasificaron en función del RB de la leche de tanque, resultando 59,4% de las granjas con leche clase A, el 29,2% clase B y el 11,5% clase C.

Medición de URL en las superficies del equipo de ordeño

En la tabla 3.1 se reflejan los valores obtenidos expresados en URL en las diversas superficies del equipo de ordeño. Los valores medios de URL más bajos se observaron en las pezoneras, mientras que los más elevados se determinaron en los puntos de conexión al circuito; resultados lógicos, si tenemos en cuenta que estas mediciones se realizaron en circuitos de ordeño situados en el establo, donde tanto la contaminación ambiental como la dificultad en llevar a cabo una limpieza adecuada del circuito son mayores.

Tabla 3.1: Valores de las unidades relativas de luz en las superficies analizadas

	N	Media	Mínimo	Máximo
Pezonera	106	363,6	8	Sobrecarga*
Colector	84	2197,1	0	Sobrecarga*
Unidad final	52	2929,7	0	Sobrecarga*
Puntos circuito	23	8536,7	2	77000

*Sobrecarga: valores $>10^5$ URL, no usados en el cálculo de las medias

En un total de 3 mediciones, una por cada superficie medida, los resultados del luminímetro reflejaron sobrecarga (valores superiores a 10^5 URL), lo que podría relacionarse con fallos importantes en el sistema de limpieza, utilización de agua fría, lavado sin detergente, etc. Estos valores no fueron utilizados para los cálculos estadísticos. La obtención de valores muy bajos (0) en colectores y unidad final indican ausencia de contaminación, es decir, el sistema de limpieza funciona correctamente. Slaghuis and Wieggersma (1996) tras medir las URL en diversas superficies de equipos de ordeño en 3 granjas, obtuvieron también valores muy diversos con un mínimo de 9 y un máximo de 38570.

Asociación entre las variables del sistema de ordeño y frecuencia de limpieza de ordeño y los valores de los logaritmos de las unidades relativas de luz

En la tabla 3.2 se presentan los resultados observados y la significación obtenida tras aplicar el ANOVA para las variables origen del agua, sistema de ordeño y frecuencia de uso del detergente ácido.

La calidad microbiológica del agua es importante por el posible aporte al RB total de la leche, por lo que es aconsejable contar con aguas potables (Marco, 1998). En este estudio, en la mayoría de las granjas (68,9%) el agua era de pozo sin ningún tipo de tratamiento potabilizador. Cuando el agua no era potable, los valores de las LURL fueron mayores para las pezoneras y la unidad final de manera significativa ($P = 0,04$ y $P = 0,02$), sin embargo, en el colector y los puntos de conexión al circuito, a pesar de que las LURL también fueron elevadas, no se estableció una relación significativa.

Las LURL encontradas en las pezoneras se ven influenciadas por el sistema de ordeño empleado aunque solo se puede explicar el 19,3% de la variabilidad encontrada. En las

pezoneras de las cántaras las LURL son mayores ($P = 0,00$), esta diferencia se puede explicar debido a que la limpieza aplicada en este tipo de equipos es manual y normalmente la temperatura del agua utilizada no suele ser la adecuada (Marco, 1998). Con respecto a los colectores, los circuitos presentan valores de LURL mayores que en las salas, ya que el recorrido de la solución de lavado hasta el tanque es menor en este último tipo de ordeño, y por lo tanto el riesgo de contaminación de la leche también disminuye (Marco, 1998). En las unidades finales, las LURL observadas en los circuitos son mayores que las observadas en las salas de ordeño ($P = 0,06$).

La frecuencia de utilización de detergente ácido para limpiar las superficies internas de las conducciones del equipo de ordeño por donde circula la leche no presenta diferencias significativas en la medición del ATP en ninguna de las distintas superficies evaluadas, excepto en la unidad final ($P = 0,04$); sin embargo, en las pezoneras y colectores, las LURL alcanzan valores máximos cuando no se utiliza nunca este tipo de detergente y menores cuando su uso es semanal. Sin embargo, en las unidades finales, el valor más alto coincide con el uso diario del detergente, al igual que para los puntos de conexión al circuito, y el mínimo con la no utilización o su uso varias veces por semana. Esta variabilidad observada en los resultados puede ser explicada por el efecto de arrastre hacia las unidades finales o los puntos de conexión al circuito cuando se realiza el lavado diario con detergente ácido. Otra posible explicación puede estar en las diferentes actividades de manejo realizadas por el ganadero, las cuales no pudieron ser determinadas.

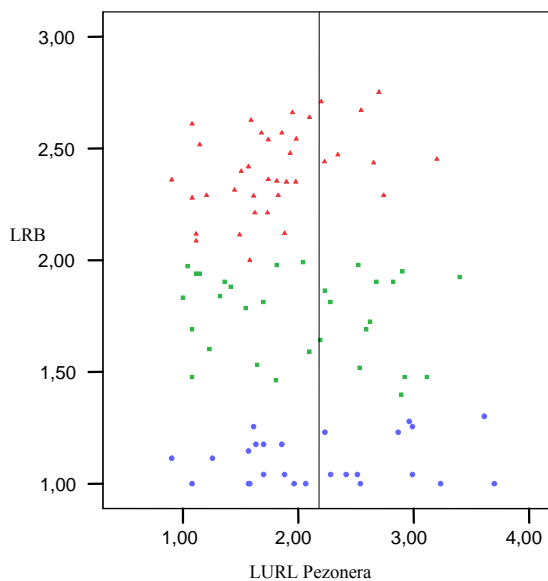
Tabla 3.2: Asociación entre las variables sistema de ordeño y frecuencia de limpieza frente a los LURL de cada superficie

		Agua potable		Sistema ordeño			Detergente ácido			
		Si	No	Sala	Circuito	Cántara	No	Semanal	Varios semana	Diario
Pezoneras	media	1,91	2,21	1,98	1,76	2,74	2,38	1,94	2,09	1,99
	(SD)	(0,66)	(0,65)	(0,61)	(0,58)	(0,64)	(0,47)	(0,68)	(0,69)	(0,66)
	Sig	0,04		0,00			0,35			
Colectores	media	2,19	2,23	2,22	2,26	2,02	2,43	2,18	2,23	2,32
	(SD)	(0,90)	(1,01)	(0,90)	(1,05)	(0,81)	(0,74)	(0,92)	(0,63)	(1,15)
	Sig	0,85		0,77			0,89			
Unidad final	media	1,86	2,66	1,76	2,33		0,78	1,82	2,55	2,67
	(SD)	(0,97)	(1,12)	(1,03)	(1,02)			(0,82)	(1,21)	(1,20)
	Sig	0,02		0,06			0,04			
Puntos circuito	media	2,75	3,07		2,89		2,39	2,81		3,15
	(SD)	(1,14)	(1,37)		(1,23)		(1,37)	(1,03)		(1,13)
	Sig	0,55		0,06			0,87			

Influencia de los logaritmos de las unidades relativas de luz en las distintas superficies del equipo de ordeño sobre el recuento bacteriano en el tanque

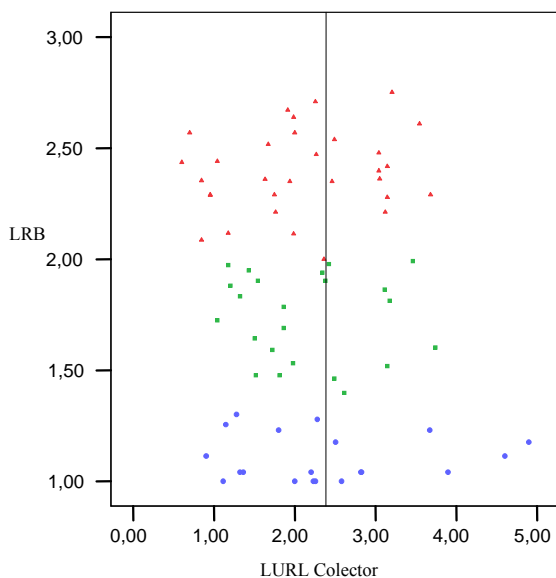
En las figuras 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4 se representan la asociación entre los LURL en las superficies analizadas y los LRB del tanque de leche según las tres categorías de granjas. Con objeto de poder considerar una limpieza adecuada, los valores de referencia de ATP para cada superficie del equipo de ordeño se establecieron en base a la media de los LURL obtenidos en cada superficie en las granjas pertenecientes a la clase A, obteniéndose 2,18, 2,38, 2,45 y 3,26 para las pezoneras, colectores, unidades finales y puntos de conexión al circuito, respectivamente, los cuales al transformarlos en URL correspondieron a 152, 242, 282 y 1821 en las superficies mencionadas. Estos valores suponen un límite alcanzable por todos los ganaderos cuyo objetivo sea la mejora de la higiene de los equipos de ordeño, así a partir de dichos valores podemos indicar que el 63,2%, 62,7%, 67,3% y el 60,9% de las superficies de pezoneras, colectores, unidades finales y puntos de conexión al circuito presentaban una limpieza adecuada.

Figura 3.1: Gráfico de dispersión del LRB total en tanque frente al LURL de la superficie de las pezoneras, con el punto de corte para la limpieza establecido en 2,18 LURL (152 URL)



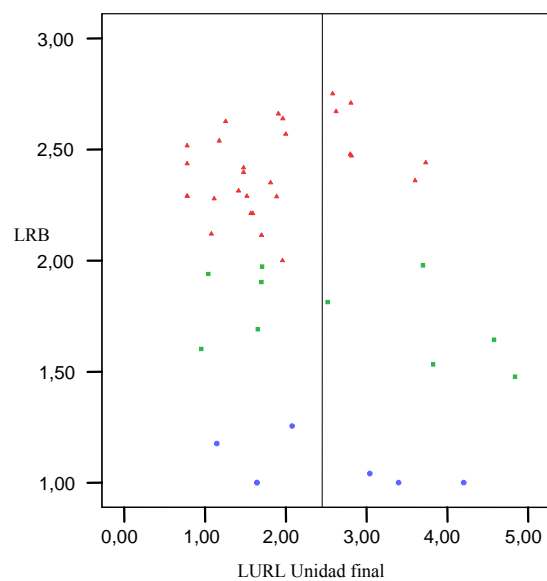
- Clase A (20×10^3 ufc/ml), ■ Clase B ($20-100 \times 10^3$ ufc/ml), ▲ Clase C ($<100 \times 10^3$ ufc/ml)

Figura 3.2: Gráfico de dispersión del LRB total en tanque frente al LURL de la superficie de los colectores, con el punto de corte para la limpieza fijado en 2,38 LURL (242 URL)



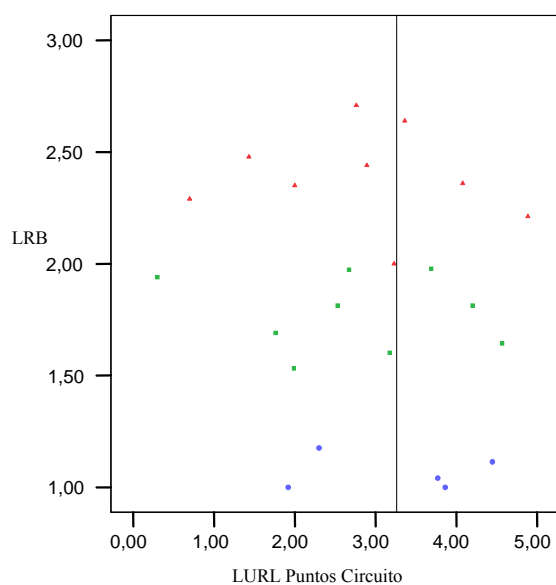
- Clase A (20×10^3 ufc/ml), ■ Clase B ($20-100 \times 10^3$ ufc/ml), ▲ Clase C ($<100 \times 10^3$ ufc/ml)

Figura 3.3: Gráfico de dispersión del LRB total en tanque frente al LURL de la superficie de las unidades finales, con el punto de corte para la limpieza establecido en 2,45 LURL (282 URL)



- Clase A (20×10^3 ufc/ml), ■ Clase B ($20-100 \times 10^3$ ufc/ml), ▲ Clase C ($<100 \times 10^3$ ufc/ml)

Figura 3.4: Gráfico de dispersión del LRB total en tanque frente al LURL de la superficie de los puntos de conexión al circuito, con el punto de corte para la limpieza fijado en 3,26 LURL (1821 URL)



- Clase A (20×10^3 ufc/ml), ■ Clase B ($20-100 \times 10^3$ ufc/ml), ▲ Clase C ($<100 \times 10^3$ ufc/ml)

En la tabla 3.3 se presentan los resultados obtenidos mediante el análisis de regresión lineal múltiple, estimados para el valor del RB con las variables independientes LURL de las pezoneras (LURLpz), de los colectores (LURLcol), de las unidades finales (LURLuf) y de los puntos de conexión al circuito (LURLpc):

Tabla 3.3: Análisis de regresión regresión lineal múltiple para el RB con los logaritmos de cada superficie
 Coeficientes^a

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		Sig.	IC para β al 95%	
	β	Error típico	β	t		Límite inferior	Límite superior
Constante	1,93	1,15		1,68	0,12	-0,57	4,43
LURLpz	0,30	0,33	0,26	0,91	0,38	-0,42	1,02
LURLcol	-0,09	0,21	-0,12	-0,40	0,69	-0,55	0,38
LURLuf	-0,08	0,16	-0,14	-0,48	0,64	-0,43	0,27
LURLpc	-0,05	0,14	-0,09	-0,34	0,74	-0,36	0,26

^a Variable dependiente: LRB

Con los resultados conseguidos mediante la regresión lineal múltiple se obtuvo la siguiente ecuación de regresión:

$$LRB = 1,93 + 0,30 \times LURLpz - 0,09 \times LURLcol - 0,08 \times LURLuf - 0,05 \times LURLpc$$

con un coeficiente de determinación $r^2 = 0,12$ ($P = 0,78$), es decir, la higiene del equipo de ordeño sólo explicaría el 12% del RB total de la leche, ya que al RB contribuyen otras fuentes de contaminación como son el estado sanitario de la vaca o las condiciones del tanque de refrigeración. Además la mayoría de las superficies evaluadas pertenecían a granjas con medias de RB inferiores a 20×10^3 ufc/ml.

A pesar de que otros estudios de bioluminiscencia sobre superficies obtienen valores superiores en coeficiente de determinación, no son comparables al establecido en este trabajo, puesto que no analizaron superficies de equipos de ordeño (Siragusa y col., 1995; Finger y Sisco, 2001; Samkutty y col., 2001).

Existen investigaciones que indican que, en condiciones normales, la higiene de la superficie interna en los conductos y recipientes por los que discurre la leche supone entre el 50-80% del RB final en la leche del tanque de refrigeración (Marco, 1998); sin embargo, con nuestros resultados no se puede establecer una relación aceptable entre los LURL en las superficies del equipo de ordeño y el LRB en leche del tanque de refrigeración. Pero no contradice la relación existente entre las ufc determinadas en cultivos puros y las URL producidas en un entorno estable de ATP, cuando ambos valores

son medidos en la misma superficie. A pesar de estos resultados, es fundamental una buena higienización tanto del equipo de ordeño como del tanque de refrigeración (Poulis y col., 1993).

La presencia de bacterias, principalmente psicótrofas Gram negativas y de otros restos orgánicos, en los sistemas de conducción o almacenamiento de la leche se debe generalmente a un inadecuado programa de limpieza y desinfección y/o mantenimiento del equipo (Marco, 1998; Murphy y col., 1998). Por lo tanto, se considera el RB como un indicador de la higiene con la que se manipula la leche, por lo que se ha utilizado tradicionalmente como un método indirecto y no muy sensible de la limpieza del equipo de ordeño, ya que intervienen más factores en la calidad higiénica de la leche como la preparación correcta de las ubres (limpieza del pezón y realización de despuntado), la calidad del agua utilizada y principalmente el funcionamiento del tanque de refrigeración que supone uno de los factores más importantes, así como el tiempo que permanece la leche en su interior (Nieuwenhof, 1996; Marco, 1998).

Por todo ello, la utilización de la ATP bioluminiscencia es útil para evaluar la higiene de las superficies de contacto con la leche y la repercusión sobre el RB en explotaciones ganaderas (Nieuwenhof, 1996), especialmente dentro de un programa de APPCC, al ser una técnica de fácil aplicación con obtención rápida de resultados que incluso podría utilizarse como un método objetivo para demostrar a los ganaderos la eficacia de la limpieza (Seeger y Griffiths, 1994; Aycicek y col., 2006).

Con excepción de alguna comunicación en congresos (Slaghuis y Wieggersma, 1996; De Celis, 2006), este es el primer trabajo científico que utiliza la ATP bioluminiscencia en superficies de equipo de ordeño, por lo que son necesarios nuevos estudios para evaluar la higiene del mismo mediante esta técnica y su relación con la calidad microbiológica de la leche del tanque de refrigeración.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aycicek, H.; Oguz, U.; Karci, K. 2006. Comparison of results of ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing methods for the determination of surface cleanliness at a hospital kitchen. *Int J Hyg Environ Health*, 209: 203-206.

Brovko, L. Y.; Froundjian, V. G.; Babunova, V. S.; Ugarova, N. N. 1991. Quantitative assessment of bacterial contamination of raw milk using bioluminescence. *J Dairy Res*, 66: 627-631.

Champiat, D.; Matas, N.; Monfort, B.; Frass, H. 2001. Applications of biochemiluminescence to HACCP. *Luminescence*, 16: 193-198.

Corbitt, A. J.; Bennion, N.; Forsythe, S. J. 2000. Adenylate kinase amplification of ATP bioluminescence for hygiene monitoring in the food and beverage industry. *Lett Appl Microbiol*, 30: 443-447.

Davidson, C. A.; Griffith, C. J.; Peters, A. C.; Fielding, L. M. 1999. Evaluation of two methods for monitoring surface cleanliness-ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing. *Luminescence*, 14: 33-38.

De Celis, P. 2006. Control de la limpieza de los equipos mediante bioluminiscencia. XI Congreso Anembe de Medicina Bovina, Zaragoza.

Finger, R.; Sisco, W. M. 2001. Bioluminescence as a technique to evaluate udder preparation. *J Dairy Sci*, 84: 818-823.

Griffiths, M. W. 1993. Applications of bioluminescence in the dairy industry. *J Dairy Sci*, 76: 3118-3125.

Marco, J. C. 1998. Mamitis bovina y calidad de la leche. *Bovis*, 85: 45-71.

Murphy, S. C.; Kozlowski, S. M.; Bandler, D. K.; Boor, K. J. 1998. Evaluation of adenosine triphosphate-bioluminescence hygiene monitoring for trouble shooting fluid milk shelf life problems. *J Dairy Sci*, 81: 817-820.

Nieuwenhof, F. 1996. Raw milk, hygiene management and ATP bioluminescence. En: proceedings, IDF Symposium on Bacteriological quality of raw milk. Austria. Pp: 113-118.

Poulis, J. A.; de Pijper M.; Mossel D. A. A.; Dekkers, P. P. A. 1993. Assessment of cleaning and disinfection in the food industry with the rapid ATP bioluminescence technique combined with the tissue fluid contamination test and a conventional microbiological method. *Int J Food Microbiol*, 20: 109-116.

Samkuty, P. J.; Gough, R. H.; Adkinson, R. W.; McGrew, P. 2001. Rapid assessment of the bacteriological quality of raw milk using ATP bioluminescence. *J Food Prot*, 64: 208-212.

Seeger, K.; Griffiths, M. W. 1994. Adenosine triphosphate bioluminescence for hygiene monitoring in health care institutions. *J Food Prot*, 57: 509-512.

Siragusa, G. R.; Cutter, C. N. 1995. Microbial ATP bioluminescence as a means to detect contamination on artificially contaminated beef carcass tissue. *J Food Prot*, 58: 764-769.

Siragusa, G. R.; Cutter, C. N.; Dorsa, W. J.; Koohmaraie, M. 1995. Use of a rapid microbial ATP bioluminescence assay to detect contamination on beef and pork carcasses. *J Food Prot*, 58: 770-775.

Slaghuis, B.; Wiegersma, W. 1996. Use of ATP-technique for the control of the cleaning of milking equipment. En: proceedings, IDF Symposium on Bacteriological quality of raw milk. Austria. Pp: 173-174.

CAPÍTULO 4

PREVALENCIA Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A *LISTERIA* SPP. EN GRANJAS DE VACUNO LECHERO EN GALICIA

INTRODUCCIÓN

Listeria spp. son bacilos Gram positivos, móviles, anaerobios facultativos y de localización intracelular (Cooper y Walker, 1998; McLauchlin y col., 2004; Winter y col., 2004). Dentro del género *Listeria* se encuentran las especies *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* subespecies *ivanovii* y *londoniensis* (Bastien y Brouillet, 2000; Vázquez-Boland y col., 2001).

L. monocytogenes está incluida en la lista de patógenos de origen alimentario de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2002), ya que es la especie de listeria más importante por su riesgo sobre la salud pública y la frecuencia de aparición en los alimentos (Fenlon y Wilson, 1989). También pueden estar implicadas en infecciones de personas *L. seeligeri* y *L. ivanovii* (Bell y Kyriakides, 2000; Wiedmann, 2003).

L. monocytogenes es una bacteria ubicua presente en agua, hierba, ensilado, material en descomposición, suelo, heces, etc. (Hassan y col., 2001), con un alto índice de supervivencia en condiciones adversas, ya que es capaz de crecer a temperaturas de refrigeración y a amplios valores de pH (Hahn, 1996; Low y Donachie, 1997; Bell y Kyriakides, 2000).

Tanto las personas como diversos animales silvestres y domésticos pueden ser portadores asintomáticos de *L. monocytogenes*, aislándose a partir de heces de vacas, cerdos, ovejas, pollos, pavos, patos, crustáceos, moscas, etc. Así mismo, las vacas pueden eliminar esta bacteria por leche durante largos períodos de tiempo sin mostrar síntomas de enfermedad (Hahn, 1996; Low y Donachie, 1997). *L. monocytogenes* es patógena para los animales y el desarrollo de listeriosis clínica está asociada a situaciones de estrés (Cooper y Walker, 1998). La principal fuente de infección para los rumiantes es el consumo de ensilado en mal estado (Low y Donachie, 1997; Vázquez-Boland y col., 2001; Wiedmann, 2003), aunque también pueden infectarse a través de aguas contaminadas y vectores como moscas o aves que pueden contaminar los alimentos (Cooper y Walker, 1998; Bastien y Brouillet, 2000).

L. monocytogenes puede alcanzar el tanque de refrigeración de la leche tras una contaminación exógena a través del equipo de ordeño o durante la rutina de ordeño por contaminación fecal; también, aunque menos frecuentemente, por vía intramamaria tras una infección generalizada, normalmente asintomática o como consecuencia de una mamitis causada por dicha bacteria (Cooper y Walker, 1998; Hassan y col., 2001; Van Kessel y col., 2004; Winter y col., 2004).

Los objetivos de este estudio fueron: i) determinar las prevalencias de las bacterias del género *Listeria* en leche de tanque de refrigeración en granja; ii) identificar las posibles prácticas de manejo relacionadas con la presencia de *Listeria* spp. en leche y la influencia de la listeria sobre los parámetros de calidad higiénica de la misma.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Para la realización de este estudio transversal durante el año 2005, se seleccionaron al azar 98 explotaciones de ganado vacuno de aptitud lechera de las provincias de Lugo y A Coruña en base a una prevalencia esperada del 10,4% de *Listeria* spp. y el 6,5% de *L. monocytogenes* (Van Kessel y col., 2004) con una confianza del 95%. Durante la realización de este trabajo, en las explotaciones ganaderas se estaba llevando a cabo un programa de certificación, mediante la aplicación de un sistema de APPCC.

El número medio de animales por explotación era de 61,3 (8-480) y de 35,0 vacas en lactación (4-260). El 41,2% de las explotaciones disponían de estabulación libre con ordeño en sala, mientras que el 58,8% restante eran estabulaciones fijas con ordeño mediante sistema de circuito (43,3%) o cántara (15,5%).

Recogida de datos: realización del cuestionario

En cada explotación se cubrió un cuestionario (disponible en el anexo 1 del capítulo 2) mediante una entrevista personal con el ganadero sobre distintos aspectos del manejo y

características de la granja, aunque en algunas de las explotaciones visitadas no se pudieron determinar ciertos aspectos de manejo.

- Alimentación: modo de almacenamiento del ensilado que puede ser en trinchera con base de hormigón, en bolsas individuales o en zanjas en suelo de tierra.
- Condiciones generales del establo: ventilación y limpieza, incluyendo la limpieza de pasillos, camas y animales.
- Tipo de sistema de ordeño: en sala, en plaza con conducción por circuito cerrado o en plaza con cántara.
- Manejo durante la rutina de ordeño: identificación de animales con mamitis, orden de ordeño, baño de pezones previo al ordeño, realización de despuntado y comprobación de si las vacas se tumbaban al terminar de ordeñarlas.

Se anotaron los valores de la calidad higiénica de la leche, medias geométricas del RCS y del RB en leche de tanque determinados por el Laboratorio Interprofesional Galego de Análise do Leite (LIGAL).

Recogida de muestras y determinación del pH

En cada granja se recogió de forma aséptica y en envases de plástico estériles las siguientes muestras:

- Leche de tanque de refrigeración, obtenida desde la apertura superior del tanque y tras varios minutos de agitación para garantizar una muestra homogénea.
- Mezcla de heces de 3 vacas en lactación escogidas al azar, tomadas directamente de la ampolla rectal de animales aparentemente sanos.
- Ensilado, tanto de hierba como de maíz, tomado de las partes media y profunda del silo.

En total fueron recogidas 98 muestras de leche, 97 de heces y 83 de ensilado y enviadas al laboratorio bajo refrigeración, el análisis se realizó en las 24 horas posteriores a la recogida de las muestras.

La medición de pH del ensilado tuvo lugar en tres puntos (parte superior, media e inferior), mediante un pH-metro equipado con un electrodo de penetración. Estableciéndose como límite crítico de pH del ensilado un valor de 4,5.

Aislamiento e identificación de *Listeria* spp.

Listeria spp. fue identificada como describe Menéndez y col. (1997). Veinticinco gramos de la muestra se transfirieron a un tubo con 225 ml de medio de enriquecimiento FDA para *Listeria* (Merck, Darmstadt, Germany) y se incubó durante 48 horas a 30°C. Después del enriquecimiento todas las muestras fueron pasadas a placas de agar Palcam (Merck) e incubadas durante 72 horas a 37°C. Las colonias morfológicamente típicas (positivas a telurito) con un halo negro (hidrólisis de esculina) se confirmaron como *Listeria* usando la reacción de la catalasa con 3% H₂O₂, movilidad a 25°C y hemólisis de sangre de cordero usando la técnica de la sobrecapa y el kit API *Listeria* (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France).

Análisis de datos

Los datos fueron analizados usando Microsoft Excel y el programa estadístico SPSS 12.0. Se realizaron las pruebas de χ^2 para las variables categóricas, considerándolas estadísticamente significativas para $P \leq 0,05$ y un grado de libertad y la prueba t de Student-Fischer para las variables cuantitativas, RCS y RB. Con estas pruebas se valoró la relación que puede existir entre las prácticas de manejo consideradas como hipotéticos factores de riesgo y la contaminación de la leche por *Listeria* spp.

Para la realización de la prueba t de Student-Fischer, se valoró el supuesto de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk con un grado de significación $P \geq 0,05$. Cuando no se cumplió este supuesto, se aplicó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Prevalencias

La Tabla 4.1 muestra la prevalencia de las distintas especies de *Listeria* en leche, heces y ensilados analizados. Se detectó *Listeria* spp. en el 16,3% de las muestras de leche recogidas en tanque, valor superior al 4,1% encontrado en Finlandia (Husu, 1990), 8,3% en Irlanda (Rea y col., 1992), 10,4% en EE.UU. (Van Kessel y col., 2004), incluso al 12,4% de Canadá (Farber y col., 1988).

Tabla 4.1: Aislamiento de las diferentes especies de *Listeria* en leche de tanque, heces y ensilado

<i>Listeria</i> spp.	Nº muestras leche positivas (%)	Nº muestras heces positivas (%)	Nº muestras ensilado positivas (%)
<i>L. monocytogenes</i>	6 (6,1%)	9 (9,3%)	5 (6,0%)
<i>L. innocua</i>	7 (7,1%)	22 (22,7%)	16 (19,3%)
<i>L. welshimeri</i>	1 (1,0%)	4 (4,1%)	4 (4,8%)
<i>L. grayi</i>	2 (2,0%)	4 (4,1%)	2 (2,4%)
<i>L. ivanovii</i>	-	1 (1,0%)	-
<i>L. seeligeri</i>	-	-	1 (1,2%)
Total	16 (16,3%)	40 (41,2%)	28 (33,7%)

L. innocua fue la especie con más prevalencia, un 7,1% de las explotaciones examinadas, al igual que en otros estudios que encontraron valores desde el 2,3% de Suecia (Waak y col., 2002) y 3,4% de Irlanda (Rea y col., 1992) hasta el 9,7% de Canadá (Farber y col., 1988). La siguiente especie en prevalencia fue *L. monocytogenes*, encontrándose en un 6,1% de los tanques, siendo éste un valor más elevado que el reflejado en otros países como el 1% de Suecia (Waak y col., 2002), 1,3% de Canadá (Farber y col., 1988), 2,2% de Finlandia (Husu, 1990), 4,9% de Irlanda (Rea y col., 1992), 4,1% en EE.UU. (Rohrbach y col., 1992), 4,6% de EE.UU. (Jarayao y Henning., 2001) y similar al 6,5% de EE.UU. (Van Kessel y col., 2004). Hassan y col. (2000) analizaron filtros de las conducciones de los equipos de ordeño y encontraron una prevalencia del 12,6%, porcentaje más alto que los anteriormente citados para muestras de leche recogidas directamente en los tanques. Esto se debe por una parte a la concentración de bacterias que tiene lugar en el filtro y por otra parte a la dilución que se produce en los tanques, pero también a la carencia de métodos totalmente satisfactorios para aislar *Listeria* spp. en leche cruda (Farber y col., 1988; Hassan y col., 2000).

En cuanto a otras especies, su prevalencia fue casi anecdótica, aislándose *L. grayi* y *L. welshimeri* en el 2,0% y 1,0% de los tanques, respectivamente; valores muy similares a los encontrados por Farber y col. (1988) que encontraron una prevalencia del 1,3% para *L. welshimeri*. La disparidad de datos relacionados con la prevalencia de esta bacteria puede deberse a variaciones según la región donde se realice el estudio, el tipo de muestras: leche, filtros u otros puntos, o la metodología analítica empleada (Van Kessel y col., 2004).

Con respecto a las muestras de origen ambiental, se detectó presencia de *Listeria* spp. en un 32,2% de las 180 muestras de ensilados y heces analizadas. Este porcentaje es bastante inferior al 77,8% encontrado por Sanaa y Ménard (1994), pero similar al 30,6% encontrado por Husu (1990). Estos valores tan altos confirman la importancia del origen ambiental como fuente de *Listeria* spp. en las explotaciones lecheras. En el 7,2% de las muestras de ensilado analizadas se encontró más de una especie del género *Listeria*, mientras que en las muestras de heces se aislaron de forma conjunta varias especies en el 3,1% de los casos.

Normalmente el porcentaje de aislamientos de *Listeria* spp. en heces de animales sanos varía ampliamente debido, aparentemente, a los diferentes métodos de muestreo y aislamiento (Husu, 1990). Así, de las 97 muestras de heces analizadas, se detectó *Listeria* spp. en el 41,2%, valor situado entre el 8% de Suecia (Unnerstad y col., 2000) y 9,6% de Finlandia (Husu, 1990), y el 81% de Francia (Sanaa y col., 1996). La eliminación de *Listeria* spp. en las heces de animales clínicamente sanos demuestra que las heces de estos animales pueden ser una fuente de contaminación de la leche (Unnerstad y col., 2000). *L. innocua* se identificó en el 22,7% de las muestras, prevalencia muy superior a los valores encontrados por otros autores, 2% (Unnerstad y col., 2000) y 4,6% (Husu, 1990); mientras que *L. monocytogenes* se encontró en el 9,3% de las heces estudiadas, porcentaje similar a los encontrados por Unnerstad y col. (2000) 6% y Husu (1990) 6,7%, pero bastante inferior al 39% encontrado por Sanaa y col. (1996). En cuanto a otras especies del género, el 4,1% de las muestras de heces presentaron *L. welshimeri*, valor superior al 0,2% encontrado por Husu (1990), que es el único de los autores citados que hace referencia a esta especie. Además en el 4,1% de las heces se detectó *L. grayi*, mientras que *L. ivanovii* solo se detectó en el 1,0%. Estas dos últimas especies no fueron mencionadas en ningún otro estudio realizado previamente. *L. seeligeri* no fue detectada en este estudio como tampoco por otros autores (Sanaa y col., 1996; Unnerstad y col., 2000), aunque sí por Husu (1990), pero únicamente en el 0,1% de las muestras analizadas.

En el 33,7% de los ensilados se aisló *Listeria* spp., valor comprendido entre el 22,7% encontrado en Finlandia (Husu, 1990) y el 62% en Francia (Sanaa y col., 1996). Si se comparan los resultados de nuestro trabajo con los que se llevaron a cabo en otros países, en general se observa un menor porcentaje de muestras positivas a *L. monocytogenes*

(6,0%), siendo esta prevalencia sólo superior al 3% encontrado por Rea y col. (1992) en Irlanda, pero muy inferior al 16% detectado en Finlandia (Husu, 1990) y el 39% en Francia (Sanaa y col., 1996). En un 19,3% de las muestras se aisló *L. innocua*, valor superior al 6% encontrado por Rea y col. (1992). Otras especies de listerias se encontraron en menos ocasiones, así el 4,8% de las muestras presentaban *L. welshimeri*, el 2,4% *L. grayi* y el 1,2% *L. seeligeri*.

Listeria spp. fue aislada en muestras de ensilado cuyos valores de pH oscilaban entre 4,47 y 6,97, intervalo diferente al observado en otros trabajos, 3,8 – 5,2 de Rea y col. (1992) ó el 5,78 – 5,89 de Ryser y col. (1997). Nuestro valor se ajustaría más al límite crítico de pH del 4,5 para la multiplicación de la listeria.

Tabla 4.2: Asociación entre factores de riesgo y presencia de *Listeria* spp. en el ensilado

Variabes	Nº granjas positivas (%)	P	OR	IC
pH ≥ 4.5				
No	1/16 (6,2%)	0,05	6,28	0,77 – 51,16
Si	18/61 (29,5%)			
Conservación				
Trinchera	9/35 (25,7%)	0,96	1,00	
Bolsas	3/12 (25,0%)		0,97	
Zanjas	8/28 (28,6%)		1,11	

Asociaciones analizadas para un nivel de probabilidad de 95% ($P \leq 0,05$)

En la Tabla 4.2 se puede observar que la presencia de *Listeria* spp. en el ensilado está relacionada con el pH del mismo ($P = 0,05$). Cuando el pH es igual o superior a 4,5 el riesgo de presentar bacterias de este género aumenta ($OR = 6,28$). Una insuficiente acidificación del ensilado puede favorecer el crecimiento de *Listeria* spp., sobre todo, cuando el pH es superior a 4,5 (Sanaa y col., 1993), aunque otros autores consideran un ensilado mal fermentado cuando el pH es superior a 4,0 (Sanaa y Ménard, 1994; Ryser y col., 1997). El modo de conservación del ensilado también influye en la presencia de este patógeno (Tabla 4.2). El riesgo de presencia de *Listeria* spp. en los ensilados según el modo de conservación fue similar, aunque cuando se conservaba en zanjas sobre tierra era ligeramente mayor y cuando estaba en bolsas era menor en comparación al almacenamiento en trincheras, probablemente debido a las diferencias higiénicas entre los tres procedimientos de ensilado.

Relación entre el aislamiento *Listeria* en ensilado y/o heces y leche

La Tabla 4.3 muestra las asociaciones entre los aislamientos de *Listeria* spp. en ensilados, heces y leche. En el 4,1% de las explotaciones visitadas se aisló *Listeria* spp. de manera simultánea en los tres tipos de muestras, en el 9,2% se detectó en heces y leche, en el 8,2% en ensilado y heces y en el 6,1% en ensilado y leche, mientras que en otros estudios el porcentaje de granjas positivas a las tres muestras se incrementa hasta el 50% (Rea y col., 1992). La presencia de *Listeria* spp. en ensilados y heces es un factor de riesgo para que también se encuentre en la leche del tanque de refrigeración. Según Sanaa y Ménard (1994) la presencia de *L. monocytogenes* en ensilados y/o en heces multiplica por 20 el riesgo de contaminación de la leche. Nuestro estudio confirma el aumento de ese riesgo, aunque los factores por los que se multiplica, son sensiblemente menores, y están comprendidos entre 2 y 3.

Tabla 4.3: Asociación entre los aislamientos de *Listeria* spp. en ensilado, heces y leche

	Nº <i>Listeria</i> spp. positivas leche (%)	P	OR	IC	
<i>Listeria</i> spp. ensilado	No	8/62 (12,9%)	0,10	2,70	0,81 – 8,99
	Si	6/21 (28,6%)			
<i>Listeria</i> spp. heces	Nº <i>Listeria</i> spp. positivas leche (%)				
	No	7/60 (11,7%)	0,10	2,43	0,82 – 7,23
Si	9/37 (24,3%)				
<i>Listeria</i> spp. ensilado	Nº <i>Listeria</i> spp. positivas heces (%)				
	No	24/61 (39,3%)	0,92	0,95	0,34 – 2,63
Si	8/21 (38,1%)				

Asociaciones analizadas para un nivel de probabilidad de 95% ($P \leq 0,05$)

En el 28,6% de las explotaciones que presentaron *Listeria* spp. en ensilado también se aisló en leche. Al igual que lo afirmado por Sanaa y col. (1993), el riesgo de contaminación de la leche aumentó en aquellas explotaciones con un ensilado de mala calidad y que además realizaban el ordeño de manera higiénicamente deficiente. El 24,3% de las granjas en las que se encontró *Listeria* spp. en heces también la presentaron en leche, porcentaje muy similar al 24,4% encontrado por Husu (1990). Otros trabajos también consideran el material fecal como una potencial fuente de contaminación exógena de la leche, principalmente durante el ordeño y debido a un mal manejo higiénico (Sanaa y col., 1996). El 38,1% de las explotaciones que presentaron *Listeria* spp. en ensilado también la presentaron en heces, valor inferior al 61,5% encontrado por Husu (1990). Sin

embargo, la presencia de *Listeria* spp. en heces cuando también está presente en el ensilado es similar a cuando no se aísla del ensilado. En este trabajo, lo mismo que en el de Husu (1990) no se encontraron diferencias ($P = 0,92$) entre la contaminación de heces de animales clínicamente sanos y el consumo de ensilado, aunque en otros estudios sí se encontraron (Ryser y col., 1997). La excreción por heces puede tener su origen en la contaminación del alimento ingerido (Husu, 1990; Sanaa y col., 1993), pero también en la contaminación ambiental de la granja (Van Kessel y col., 2004).

Factores de riesgo para la presencia de *Listeria* spp. en la leche

La interpretación del efecto de una práctica de manejo sobre la presencia de *Listeria* spp. debe hacerse en base a la biología de este microorganismo (Hassan y col., 2001), aunque no siempre exista una relación estadísticamente significativa. La Tabla 4.4 recoge la asociación estadística entre los factores de riesgo y la presencia de *Listeria* spp. en la leche.

Dentro de las condiciones generales del establo se estudió la influencia de la ventilación y la limpieza sobre la presencia del microorganismo en la leche. De acuerdo con otros autores (Hassan y col., 2001), en este estudio se comprobó que la ventilación está relacionada con la presencia de esta bacteria en la leche; observándose que cuando la ventilación del establo es la adecuada disminuye el riesgo de aparición de *Listeria* spp. (OR = 0,63). Esto se debe a que con una buena ventilación disminuye la concentración de gases, polvo y microorganismos patógenos, como *Listeria* spp. en el ambiente, con lo que el riesgo de exposición de los animales es menor. La probabilidad de encontrar leche contaminada por *Listeria* spp. fue menor cuando el establo se encontraba en buenas condiciones higiénicas (OR = 0,86). La higiene insuficiente en el establo, principalmente en las camas, aumenta la exposición a los microorganismos patógenos, entre ellos *Listeria* spp., lo que constituye un importante factor ambiental para la contaminación de la leche.

Tabla 4.4: Asociación entre los factores de riesgo, condiciones del establo y manejo del ordeño, y la presencia de *Listeria* spp. en leche de tanque

VARIABLES	Nº granjas positivas (%)	P	OR	IC
<u>Condiciones del establo</u>				
Ventilación				
Pobre	5/23 (21,7%)	0,44	0,63	0,19 – 2,05
Buena	11/74 (11,9%)			
Limpieza				
Pobre	6/36 (16,7%)	0,80	0,86	0,28 – 2,67
Buena	9/61 (14,7%)			
<u>Manejo durante el ordeño</u>				
Sist. Ordeño				
Sala	4/40 (10,0%)	0,01	1,00	
Circuito	12/42 (28,6%)		2,87	
Otros	0/15 (0,0%)		0	
¿Identifica mamitis?				
No	12/58 (20,7%)	0,17	0,44	0,13 – 1,47
Si	4/39 (10,3%)			
¿Orden ordeño?				
No	8/25 (32%)	0,01	0,26	0,08 – 0,81
Si	7/65 (10,7%)			
¿Despuntado?				
No	2/20 (10,0%)	0,37	2,03	0,42 – 9,79
Si	14/76 (18,4%)			
¿Vacas se tumban postordeño?				
No	8/64 (12,5%)	0,18	2,13	0,69 – 6,56
Si	7/30 (23,3%)			

Asociaciones a nivel de explotación analizadas para un nivel de probabilidad de 95% ($P \leq 0,05$)

Por otra parte, el manejo inadecuado durante la rutina de ordeño favorece la contaminación de la leche por bacterias patógenas como *Listeria* spp. que puede llegar a la leche a partir de la suciedad de las ubres y pezones de los animales o de las pezoneras del equipo de ordeño. Es importante, por lo tanto, realizar una correcta higienización de los pezones y, en general, de todo el proceso de ordeño para eliminar los microorganismos que se encuentran sobre las ubres antes de proceder al ordeño y disminuir de esta forma la incidencia de infecciones (Rohrbach y col., 1992; Sanaa y col., 1993; Hassan y col., 2001). Sin embargo, en el 96,8% de las explotaciones incluidas en este trabajo se llevaba a cabo una limpieza de pezones antes de la colocación de las pezoneras y, a pesar de ello, en el 16,5% se detectó *Listeria* spp. en la leche. Esto quizá fue debido a que esta práctica no se hacía de forma adecuada o a la influencia de alguno de los otros factores de riesgo mencionados en este trabajo.

En el ordeño en plaza proteger la leche de la contaminación ambiental es más difícil que cuando se hace en sala, por lo que el RB suele ser más elevado (Hassan y col., 2001) como se pudo comprobar en este estudio ($\chi^2 = 11,26$, $P = 0,02$); del mismo modo, la contaminación de la leche por *Listeria* spp. también es más probable. El 41,2% de las ganaderías disponían de sala de ordeño y el 43,3% ordeñaban en circuito, siendo en estos últimos la probabilidad de encontrar *Listeria* spp. en la leche casi 3 veces mayor (OR = 2,87) que en los que ordeñaban en sala. Al contrario que en otros trabajos (Rohrbach y col., 1992), en nuestro estudio pudimos observar una relación significativa entre el sistema de ordeño y la presencia de esta bacteria en leche ($P = 0,01$).

Únicamente el 40,2% de los ganaderos identificaban correctamente las vacas con mamitis y, en éstos, la probabilidad de contaminación de la leche con *Listeria* spp. fue menor (OR = 0,44). Aunque estos microorganismos se aíslan con baja prevalencia de las glándulas mamarias, es decir, su asociación con mamitis es infrecuente (Rea y col., 1992; Rohrbach y col., 1992; Sanaa y col., 1996) existe riesgo de contaminación de la leche, por lo que es imprescindible la detección de animales que sufran mamitis por *Listeria* spp. (Sanaa y col., 1996). Además, el seguir un apropiado orden de ordeño dificulta la transmisión de bacterias entre los animales y la contaminación del equipo de ordeño, con lo que se reduce la probabilidad de aparición de *Listeria* spp. en la leche del tanque. En este trabajo se comprobó que la contaminación de la leche por este patógeno era mayor cuando no se seguía un orden correcto ($P = 0,01$, OR = 0,26). Con menor frecuencia, *Listeria* spp. puede alcanzar la leche del tanque cuando está asociada a mamitis clínica o subclínica; en ese caso, al eliminar los primeros chorros se elimina la leche de baja calidad que presenta altas concentraciones de bacterias. Por eso es importante realizar el despuntado, práctica que realizaban en la mayoría las explotaciones (79,2%), aunque no se encontró relación ($P = 0,37$) con la presencia de *Listeria* spp. en leche.

Asociación con los resultados de calidad higiénica de la leche

La mayoría de las explotaciones presentaron RCS menores a 400×10^3 cel/ml (83,9%), siendo el 34,5% inferior a 200×10^3 cel/ml. En el 96,5% de las granjas el RB fue inferior a 100×10^3 ufc/ml, siendo el 42,4% inferior a 20×10^3 ufc/ml. Al evaluar la distribución de las variables RCS y RB se comprueba que no siguen una distribución normal ($P = 0,00$ para

los grupos que no presentan *Listeria* spp.). Al aplicar la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para el RCS y el RB, en ambos casos no hubo diferencias ($P = 0,64$ y $P = 0,89$, respectivamente), aunque se detectara *Listeria* spp. en la leche; sin embargo, ambos recuentos fueron ligeramente superiores, 252×10^3 cel/ml y 29×10^3 ufc/ml, frente a 250×10^3 cel/ml y 26×10^3 ufc/ml (rango promedio = 46,8 y 43,8, respectivamente) (Tabla 4.5).

Si el RCS se considera un indicador de la presencia de infecciones mamarias, podría utilizarse también relacionado con la prevalencia de patógenos zoonóticos. Considerando el RCS como una variable con tres categorías: $< 200 \times 10^3$ cel/ml, $200-400 \times 10^3$ cel/ml y $> 400 \times 10^3$ cel/ml, su relación con el aislamiento de *Listeria* spp. no manifestó diferencias entre las tres categorías ($P = 0,32$), al igual que en los trabajos de Hassan y col. (2000), Rorhbach y col. (1992) y Van Kessel y col. (2004). No obstante, la probabilidad de encontrar *Listeria* spp. es mayor cuando las muestras proceden de leche de las categorías con mayores recuentos ($OR = 2,33$ y $OR = 1,43$). Al evaluar el RB en la leche del tanque como variable con tres categorías $< 20 \times 10^3$ ufc/ml, $20-100 \times 10^3$ ufc/ml y $> 100 \times 10^3$ ufc/ml frente la presencia de *Listeria* spp., no se encontró una relación significativa. Sin embargo, el riesgo de aislar esta bacteria fue mayor cuando la leche procedía de la categoría intermedia ($OR = 1,56$), aunque debe tenerse en cuenta que cuando este valor está incrementado puede disminuir la probabilidad de aislar bacterias del género *Listeria*, ya que podría estar enmascarada su presencia por el crecimiento de otras bacterias, dando falsos negativos (Fernández-Garayzabal y col., 1987).

Tabla 4.5: Medias geométricas del RCS ($\times 10^3$ cel/ml) y el RB ($\times 10^3$ ufc/ml) en muestras de leche con y sin *Listeria* spp.

	Media RCS	P	Media RB	P
Sin <i>Listeria</i>	250	0,64	26	0,89
Con <i>Listeria</i>	252		29	

Asociaciones analizadas para un nivel de probabilidad de 95% ($P \leq 0,05$)

Unas prácticas de manejo correctas, tanto en la elaboración del ensilado, como en el mantenimiento de las condiciones higiénicas del establo y por supuesto en la rutina del ordeño son básicas para evitar la introducción de la bacteria en el rebaño, su dispersión en el mismo y su llegada a la leche durante el ordeño como consecuencia de una contaminación ambiental. El riesgo de contaminación de la leche por *Listeria* spp. aumenta cuando se alimenta a los animales con un ensilado de mala calidad,

principalmente cuando su pH es igual o superior a 4,5. La prevalencia de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*, en particular, en leche de tanque fue similar a la de otros estudios realizados previamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bastien, J.; Brouillet, P. 2000. Mieux gérer au quotidien les pathologies dans les élevages en tenant compte du risque sanitaire pour le lait: un impératif pour les vétérinaires de demain. SNGTV. Commission Qualité du Lait. Paris.

Bell, C.; Kyriakides, A. 2000. *Listeria*: una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos. Ed. Acribia, Zaragoza, España.

Cooper, J.; Walker, R. D. 1998. Listeriosis. Microbial foodborne pathogens. *Vet Clin N Am-Food Anim Pract*, 14: 113-125.

Farber, J. M.; Sanders, G. W.; Malcolm, S. A. 1988. The presence of *Listeria* spp in raw milk in Ontario. *Can J Microbiol*, 34: 95-100.

Fenlon, D. R.; Wilson, J. 1989. The incidence of *L. monocytogenes* in raw milk from farm bulk tanks in North-East Scotland. *J Appl Bacteriol*, 66:191-196.

Fernández-Garayzabal, J. F.; Domínguez, L.; Vazquez, J. A.; Gómez-Lucia, E.; Rodríguez-Ferri, E. R.; Suárez, G. 1987. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in raw milk. *Vet Rec*, 120: 258-259.

Hahn, G. 1996. Pathogenic bacteria in raw milk-situation and significance. Proceedings, IDF Symposium on Bacteriological quality of raw milk. IDF, Austria. Pp: 67-83.

Hassan, L.; Mohammed, H. O.; McDonough, P. L.; González, R. N. 2000. A cross-sectional study on the prevalence of *L. monocytogenes* and *Salmonella* in New York dairy herds. *J Dairy Sci*, 83: 2441-2447.

Hassan, L.; Mohammed, H. O.; McDonough, P. L. 2001. Farm-management and milking practices associated with the presence of *L. monocytogenes* in New York state dairy herds. *Prev Vet Med*, 51: 63-73.

Husu, J. R. 1990. Epidemiological studies on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in the feces of dairy cattle. *J Vet Med B*, 37: 276-282.

Jarayao, B. M.; Henning, D. R. 2001. Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. *J Dairy Sci*, 84: 2157-2162.

Low, J. C.; Donachie, W. 1997. A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. *Vet J*, 153: 9-29.

McLauchlin, J.; Mitchell, R. T.; Smerdon, W. J.; Jewell, K. 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *Int J Food Microbiol*, 92: 15-33.

Menéndez, S.; Godínez, M. R.; Rodríguez-Otero, J. L.; Centeno, J. A. 1997. Removal of *Listeria* spp. in a cheese factory. *J Food Safety*, 17: 133-139.

Organización Mundial de la Salud, OMS. Food safety and foodborne illness. Citado: diciembre 2002. Disponible en: <http://www-who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>.

Rea, M. C.; Cogan, T. M.; Tobin, S. 1992. Incidence of pathogenic bacteria in raw milk in Ireland. *J Appl Bacteriol*, 73: 331-336.

Rohrbach, B.; Draughon, F. A.; Davidson, P. M.; Oliver, S. P. 1992. Prevalence of *L. monocytogenes*, *C. jejuni*, *Y. enterocolitica*, and Salmonella in bulk tank milk: Risk factors and risk of human exposure. *J Food Prot*, 55: 93-97.

Ryser, E.; Arimi, S. M.; Donnelly, C. W. 1997. Effects of pH on distribution of *Listeria* ribotypes in corn, hay and grass silage. *Appl Environ Microbiol*, 63: 3695-3697.

Sanaa, M.; Poutrel, B.; Ménard, J. L.; Serieys, F. 1993. Risk factors associated with contamination of raw milk by *L. monocytogenes* in dairy farms. *J Dairy Sci*, 76: 2891-2898.

Sanaa, M.; Ménard, J. L. 1994. Contamination du lait cru par *L. monocytogenes*: origines, facteurs de risque, prévention. *Rec Méd Vet*, 170: 437-442.

Sanaa, M.; Audurier, A.; Poutrel, B.; Ménard, J. L.; Serieys, F. 1996. Origin of bovine raw milk contamination by *Listeria monocytogenes*. Proceedings IDF, Symposium on Bacteriological quality of raw milk. IDF, Austria. Pp: 84-88.

Unnerstad, H.; Romell, A.; Ericsson, H.; Danielsson-Tham, M. L.; Tham, W. 2000. *Listeria monocytogenes* in faeces from clinically healthy dairy cows in Sweden. *Acta Vet Scand*, 41: 167-171.

Van Kessel, J. S.; Karns, J. S.; Gorski, L.; McCluskey, B. J.; Perdue, M. L. 2004. Prevalence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and fecal coliforms in bulk tank milk on US dairies. *J Dairy Sci*, 87: 2822-2830.

Vázquez-Boland, J. A.; Kuhn, M.; Berche, P.; Chakraborty, T.; Domínguez-Bernal, G.; Goebel, W.; González-Zorn, B.; Wehland, J.; Kreft, J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev*, 14: 584-640.

Waak, E.; Tham, W.; Danielsson-Tham, M. L. 2002. Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. *Appl Environ Microbiol*, 68: 3366-3370.

Wiedmann, M. 2003. ADSA Foundation Scholar Award- An integrated science based approach to dairy food safety: *Listeria monocytogenes* as a model system. *J Dairy Sci*, 86: 1865-1875.

Winter, P.; Schilcher, F.; Bagò, Z.; Schoder, D.; Egerbacher, M.; Baumgartner, W.; Wagner, W. 2004. Clinical and histopathological aspects of naturally occurring mastitis caused by *Listeria monocytogenes* in cattle and ewes. *J Vet Med*, 51: 176-179.

CAPÍTULO 5

**DISTRIBUCIÓN DE *ARCOBACTER* SPP. EN HECES DE
GANADO VACUNO LECHERO CLÍNICAMENTE SANO
EN GALICIA**

INTRODUCCIÓN

El género *Arcobacter* fue propuesto a principios de la década de los noventa, después de que los primeros aislamientos de este microorganismo a partir de fetos bovinos y porcinos, se clasificaran como “*Campylobacter aerotolerantes*”. Son bacilos Gram negativos y se diferencian básicamente de las bacterias pertenecientes al género *Campylobacter* en que crecen en aerobiosis y tienen temperaturas de crecimiento idóneas menores (15-30°C) (Nachamkin, 1995; Scullion y col., 2004).

Actualmente dentro del género *Arcobacter* se diferencian 6 especies: *A. cryaerophilus*, *A. butzleri*, *A. skirrowii*, *A. nitrofigilis*, *A. cibarius* y *A. halophilus* (Donachie y col., 2005; Houf y col., 2005), siendo las tres primeras patógenas tanto para personas (Hsueh y col., 1997; Vandenberg y col., 2004) como animales (Scullion y col., 2004; Van Driessche y col., 2004).

Arcobacter spp. ha sido aislado a partir de numerosas muestras de origen animal: fetos abortados de vacuno y cerdos, lavados prepuciales de toros, leche de vacas con mamitis, heces diarreicas de terneros y corderos y secreciones genitales de cerdos con problemas reproductivos. También de fuentes ambientales como aguas fluviales, marinas, subterráneas, residuales y superficie de las conducciones, todas ellas no cloradas y de alimentos de origen animal como leche cruda de vaca, canales de cerdo, pollo y pavo y, en general, de productos avícolas (Houf y col., 2002; Van Driessche y col., 2004). En estudios recientes, *Arcobacter* spp. ha sido aislado en heces de ganado vacuno clínicamente sano, donde las prevalencias oscilaron entre 3,6% y 14,3% (Wesley y col., 2000; Kabeya y col., 2003).

En cuanto al aspecto zoonótico, *A. butzleri* y *A. cryaerophilus* están asociados a enteritis y septicemias en personas y menos frecuentemente *A. skirrowii* ha sido relacionado con diarreas crónicas (Vandamme y col., 1992; Wybo y col., 2004). El consumo de alimentos de origen animal y de aguas contaminadas es considerada la principal fuente de transmisión a personas (Van Driessche y col., 2003; Moreno y col., 2004).

Por otro lado, debido a los requerimientos de crecimiento tan específicos y a que son bioquímicamente inertes, las bacterias pertenecientes al género *Arcobacter* no presentan un procedimiento estándar para su aislamiento e identificación, por lo que se utilizan generalmente las técnicas descritas para *Campylobacter* spp. (Nachamkin, 1995; Scullion y col., 2004). Todo ello hace que la verdadera prevalencia de estas bacterias en las diferentes muestras analizadas pueda estar subestimada. Por este motivo, en los últimos años se hace necesaria la aplicación de métodos más específicos y rápidos como los basados en técnicas moleculares para la correcta identificación de estas bacterias (Harmon y Wesley, 1997; Houf y col., 2000; On y col., 2003).

A pesar de todos estos datos, no se han realizado estudios epidemiológicos de *Arcobacter* spp. en explotaciones bovinas de España. Los objetivos de este estudio fueron determinar la prevalencia de *Arcobacter* spp. en explotaciones de ganado vacuno de aptitud lechera e identificar determinadas prácticas de manejo como posibles factores de riesgo para la presencia de este microorganismo en las explotaciones ganaderas lecheras.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio, recogida de datos y muestras

El trabajo fue desarrollado en explotaciones de vacuno lechero de A Coruña y Lugo entre junio de 2005 y abril de 2006. Fueron estudiadas 89 granjas seleccionadas al azar entre 15933 explotaciones censadas, en base a una prevalencia esperada del 71% (Wesley y col., 2000) con un nivel de confianza del 95%. El número medio de vacas por explotación fue 61,9 (17-239), con 40,4 (13-179) vacas en lactación. El 65,2% de estas explotaciones presentaban un sistema de producción en estabulación libre.

En cada una de las explotaciones visitadas, fueron recogidas muestras de heces de forma aséptica directamente de la ampolla rectal de las vacas que estaban en lactación, utilizando guantes humedecidos en solución salina estéril. Se recogieron un total de 254 muestras fecales, aproximadamente 75 gramos por animal, en botes estériles que eran mantenidos en refrigeración hasta su recepción en el laboratorio de análisis, 24 horas posteriores a su recogida. El número de animales analizados fue el 7,1% del total de las vacas en lactación

(3598), lo que representó un 8,8% de animales por explotación. Ninguno de estos animales presentaba una sintomatología compatible con infecciones por *Arcobacter* spp. en el período de recolección de las muestras.

Además, se rellenó un cuestionario (anexo 1 del capítulo 2) para evaluar distintas prácticas de manejo como posibles factores de riesgo para la presencia de *Arcobacter* spp. Así, fueron valorados:

- la compra de animales, independientemente de que realizasen o no recría
- la utilización de agua de bebida clorada, se consideró clorada cuando era de origen municipal, mientras que si era de origen propio (manantial, pozo, etc.) fue no clorada
- el uso de bebederos de manera individual, considerándose así cuando las explotaciones con estabulación fija disponían de bebederos como máximo para dos animales
- el análisis del ensilado antes de su consumo
- la salida a pastos de los animales a diario o estacional
- la limpieza diaria de pasillos, como medida general de la limpieza del establo

Sin embargo, en algunas granjas no pudieron ser determinados ciertos aspectos y características de manejo.

Aislamiento e identificación de *Arcobacter*

Las heces se sembraron a dilución 1:10 en caldo de enriquecimiento JM y en caldo de enriquecimiento CAT que consiste en caldo *Arcobacter* (Oxoid, Hampshire, United Kingdom) con suplemento CAT (Oxoid) (Atabay y Corry, 1998). Ambos caldos se incubaron en aerobiosis a 30°C durante 48 horas.

Posteriormente, se tomó un alícuota de 100 µl de caldo JM y se sembró en una placa de agar selectivo para *Arcobacter*, que consiste en caldo *Arcobacter* (Oxoid), con agar técnico no. 3 al 1,2% (Oxoid) y suplemento SS1 (Houf y col., 2001). Las placas se incubaron a 28°C en condiciones de microaerobiosis durante 72 horas.

A partir del caldo *Arcobacter* se sembraron los siguientes medios:

- Agar selectivo para *Arcobacter*. Se siguió el mismo protocolo que el descrito anteriormente para el caldo JM.

- Agar base para anaerobios (Oxoid) con 5% de sangre de caballo lacada (Oxoid). Se tomaron 200 µl de caldo *Arcobacter* y se depositan en forma de gotas sobre la superficie de un filtro de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0,65 µm que se ha colocado sobre la superficie de la placa de agar, teniendo cuidado de que el inóculo no sobrepase el borde del filtro. Las placas se dejan 30 minutos a temperatura ambiente antes de retirar el filtro. Una vez retirado, las placas se incuban en las mismas condiciones que las descritas anteriormente para las placas de agar selectivo para *Arcobacter*.

Una colonia de cada uno de los diferentes tipos de colonias sospechosas sobre los distintos tipos de medio fue seleccionada y se examinó en microscopio de campo oscuro. Las colonias con morfología y movimiento compatibles con *Arcobacter* spp. se purificaron por siembra en placas de agar base para anaerobios con 5% de sangre de caballo lacada. La identificación se realizó utilizando una técnica de PCR múltiple previamente descrita (Houf y col., 2000).

Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron analizados usando los programas Microsoft Excel y el estadístico SPSS 13.0. Las explotaciones que tenían como mínimo un animal positivo para *Arcobacter* spp. fueron consideradas positivas para la correspondiente especie bacteriana. Para evaluar la asociación entre las variables consideradas como potenciales factores de riesgo y el aislamiento de las bacterias en heces, se realizó la prueba de χ^2 para variables categóricas, considerándose una significación del 95% de probabilidad con una significación estadística $P \leq 0,05$ y 1 grado de libertad.

RESULTADOS

Los porcentajes de positividad de las diferentes especies de *Arcobacter* en heces procedentes de explotaciones de ganado vacuno lechero se reflejan en la Tabla 5.1. Del total de las 89 granjas visitadas durante el estudio, 61 (68,5%) fueron positivas a *Arcobacter* spp.

Tabla 5.1: Distribución de *Arcobacter* spp. aislados de heces de vacas lecheras

Heces	Nº muestras	M. Positivos ¹ (%)	Distribución <i>Arcobacter</i> spp. (%)			
			Ac ²	As ²	Ab ²	Ni ³
	254	106 (41,7%)	71 (27,9%)	51 (20,1%)	19 (7,5%)	7 (2,8%)

¹M. positivos= animales positivos a *Arcobacter* spp.

²Ac= *Arcobacter cryaerophilus*, As= *Arcobacter skirrowii*, Ab= *Arcobacter butzleri*

³Ni= aislamientos no identificados

En relación a los animales individuales, 106 (41,7%) de las 254 muestras de heces analizadas fueron positivas a *Arcobacter* spp. Mediante la aplicación de una PCR múltiple, se comprobó que la prevalencia de las especies pertenecientes al género *Arcobacter* fue la siguiente: *A. cryaerophilus* 27,9% (71/254), *A. skirrowii* 20,1% (51/254) y *A. butzleri* 7,5% (19/254). Las infecciones mixtas no fueron frecuentes y únicamente un 15,3% de las vacas presentaron heces contaminadas por varias especies de *Arcobacter* simultáneamente en 30 explotaciones analizadas. La distribución de las especies identificadas fue del 48,0%, 34,5% y 12,8% para *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* y *A. butzleri*, respectivamente, obteniéndose 7 aislados que no pudieron ser identificados.

Tabla 5.2: Prácticas de manejo y su relación con al aislamiento de *Arcobacter* spp. en heces de ganado vacuno lechero

Variables	Nº granjas positivas (%)	<i>Arcobacter</i> spp.		
		P	OR	IC del OR
Compra animales				
No	27/42 (64,3%)	0,14	2,14	0,75-6,08
Si	27/34 (79,4%)			
Agua de bebida clorada				
No	44/65 (67,7%)	0,78	1,16	0,42-3,22
Si	17/24 (70,8%)			
Bebedores de uso individual				
No	43/58 (74,1%)	0,12	0,48	0,19-1,22
Si	18/31 (58,1%)			
Limpieza diaria bebederos				
No	47/65 (72,3%)	0,44	0,67	0,24-1,87
Si	14/22 (63,6%)			
Análisis ensilado				
No	11/15 (73,3%)	0,63	0,74	0,21-2,58
Si	49/73 (67,1%)			
Salida a pastos				
No	37/51 (72,6%)	0,30	0,62	0,25-1,54
Si	23/37 (62,2%)			
Limpieza pasillos				
No	18/23 (78,3%)	0,22	0,51	0,17-1,54
Si	42/65 (64,6%)			

Los diversos aspectos relacionados con el manejo en las explotaciones estudiadas y los resultados obtenidos al aplicar los tratamientos estadísticos mencionados anteriormente están reflejados en la Tabla 5.2. No se establecieron relaciones significativas entre el aislamiento de *Arcobacter* spp. en heces de vacas y los factores evaluados.

DISCUSIÓN

De las 89 explotaciones visitadas, el 68,5% presentaron como mínimo un animal positivo a *Arcobacter* spp. Este valor se encuentra por debajo del descrito por Wesley y col. (2000) que en 31 granjas de vacuno lechero localizadas en diferentes regiones de EE.UU., observaron que el 71% de las mismas eran positivas. Por tanto, el porcentaje de explotaciones con infecciones por *Arcobacter* spp. puede reflejar grandes variaciones según el país o área geográfica estudiada, y de manera más significativa la metodología analítica empleada (Van Driessche y col., 2003).

El porcentaje de *Arcobacter* spp. en las muestras fecales de los animales analizados en nuestro estudio fue del 41,7%, valor claramente superior a los indicados en los estudios realizados en vacas lecheras clínicamente sanas hasta la actualidad: 12% en 31 explotaciones de EE.UU. (Wesley y col., 2000), 11% en tres rebaños belgas (Van Driessche y col., 2005), 10% y 9,5% en muestras fecales recogidas en mataderos en Bélgica y Turquía, respectivamente (Van Driessche y col., 2003; Öngor y col., 2004) y 3,6% en 18 granjas japonesas (Kabeya y col., 2003). La comparación de estos datos debe realizarse con cautela, ya que existen diferencias evidentes en cuanto al diseño del estudio, el tamaño de muestra y los métodos de aislamiento e identificación utilizados (Wesley y col., 2000; Kabeya y col., 2003; On y col., 2003; Van Driessche y col., 2005). Así, la prevalencia detectada en heces de ganado vacuno en matadero se incrementó del 10%, aplicando el aislamiento directo, al 39% después de un método de enriquecimiento (Van Driessche y col., 2003). Por otra parte, podría influir que la transmisión de las especies de *Arcobacter* se produce más frecuentemente en climas cálidos (Golla y col., 2002; Van Driessche y col., 2005) como el de España, o también variaciones de prevalencia debido a las diversas prácticas de limpieza utilizadas, ya que el uso de agua a presión para eliminar el estiércol, la utilización de bebederos individuales y el tipo de alimentación

proporcionada a los animales pueden incrementar la presencia de *Arcobacter* spp. (Golla y col., 2002; Öngor y col., 2004; Van Driessche y col., 2005).

En cuanto al porcentaje de las diferentes especies de *Arcobacter*, indicar que *A. cryaerophilus* fue la especie predominante con un 27,9%, seguida por *A. skirrowii* con 20,1%, al contrario de lo observado en otros trabajos, en los cuales la especie más frecuentemente aislada fue *A. butzleri* con 3%, 7% y 25,5%, respectivamente (Kabeya y col., 2003; Öngor y col., 2004; Van Driessche y col., 2003). En general, las diferencias en cuanto a las prevalencias encontradas para las distintas especies de *Arcobacter* pueden deberse a que en los diferentes trabajos se estudiaron distintos animales (terneros, animales adultos, toros, vacas de aptitud láctea y cárnica), fueron analizadas diversas muestras (heces, canales en matadero, hisopos vaginales y rectales, etc.) y los estudios se desarrollaron en diferentes localizaciones geográficas y en distintas estaciones del año (Wesley y col., 2000; Kabeya y col., 2003; Van Driessche y col., 2003; Öngor y col., 2004; Van Driessche y col., 2005). *A. cryaerophilus* fue la especie más frecuentemente identificada, representando el 48,0% de todos los aislados obtenidos, valor muy superior a los observados en otros estudios (Kabeya y col., 2003; Van Driessche y col., 2003; Öngor y col., 2004). *A. skirrowii* y *A. butzleri* representaron el 34,5% y 12,8%, respectivamente, valores que difieren a los encontrados por otros autores que detectaron *A. skirrowii* en un 46% (Van Driessche y col., 2005) y *A. butzleri* en un 51,5% (Wesley y col., 2000). En la valoración de estos resultados deberá tenerse en cuenta la influencia que ejerce el método de aislamiento utilizado sobre las especies de *Arcobacter* detectadas, ya que la mayoría de las técnicas utilizadas no son óptimas para *Arcobacter* spp. (Kabeya y col., 2003; Van Driessche y col., 2005). En nuestro estudio, las infecciones simultáneas por más de una especie de *Arcobacter* se observaron en 30 granjas y en el 36,8% de las granjas positivas, valor similar al obtenido por Van Driessche y col. (2005) y muy superior al 10% comprobado en un estudio realizado en matadero (Van Driessche y col., 2003). Se necesitan realizar más estudios epidemiológicos para determinar el origen de cada especie de *Arcobacter* y el significado de las infecciones mixtas.

Otro de los objetivos del estudio fue intentar identificar si algunas prácticas de manejo del ganado podían estar relacionadas con la presencia de *Arcobacter* spp. en el tracto intestinal de las vacas. Ninguno de los potenciales factores de riesgo estudiados presentó una

relación significativa con la aparición de estos microorganismos en heces de las vacas en lactación.

Al igual que lo descrito por Wesley y col. (2000), la utilización de agua de bebida clorada no fue un factor de protección frente a la presencia de *Arcobacter* spp.; sin embargo, la aplicación de unas buenas prácticas de cloración del agua de bebida son necesarias para inactivar estos microorganismos (Rice y col., 1999; Moreno y col., 2004; Öngör y col., 2004), ya que tanto el agua de bebida y de limpieza como el material utilizado en la granja puede ser un vector para la dispersión de estas bacterias y también una fuente de contagio importante para los animales (Van Driessche y col., 2005). El uso o no de bebederos individuales tampoco presentó una relación significativa ($P = 0,12$) con la presencia de *Arcobacter* spp., comprobándose que la proporción de aislamientos de *Arcobacter* spp. fue mayor cuando los bebederos eran de uso colectivo ($OR = 0,48$). Resultados similares fueron observados por Wesley y col. (2000), en cuyo estudio los bebederos individuales fueron un factor de protección frente a la presencia de *Arcobacter* spp.

En aquellas ganaderías que compraban animales de reposición, la presencia de *Arcobacter* spp. era mayor ($OR = 2,14$). Este resultado es similar al encontrado por Wesley y col. (2000), aunque nosotros lo valoramos con un grado de significación más estricto. La compra de animales sin chequeos sanitarios es un factor de riesgo importante para la introducción de diversos microorganismos en las explotaciones ganaderas.

En algunos estudios se han evaluado otros parámetros como posibles variables de influencia en la aparición de las especies de *Arcobacter* en explotaciones bovinas como son el modo de retirada del estiércol y su uso como abono, el tipo de alimentación de los animales y la presencia o no de roedores y/o aves con acceso al alimento, obteniéndose resultados muy diferentes (Wesley y col., 2000; Van Driessche y col., 2005). Todo esto indica que son necesarios más estudios sobre factores de riesgo para evaluar que condiciones de manejo o características ambientales de las explotaciones actúan como factores predisponentes o protectores para este tipo de infecciones.

Este trabajo es el primer reportaje sobre la prevalencia de diversas especies de *Arcobacter* entre explotaciones de bovino lechero en España y sugiere determinados factores de riesgo

en explotaciones para futuras investigaciones. Las prevalencias de *Arcobacter* spp. en heces a partir de ganado vacuno lechero obtenidas con este protocolo fueron más elevadas que las reflejadas en otros estudios.

La eliminación de *Arcobacter* spp. en las heces de los animales es importante por el papel que desempeña en la entrada de la cadena alimentaria. Por lo tanto, es necesario realizar nuevos estudios para una mejor comprensión de la epidemiología de las especies de *Arcobacter* en el ganado vacuno lechero, prestándoles mayor atención como patógenos zoonóticos de origen alimentario.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Atabay, H. I.; Corry, J. E. L. 1998. Evaluation of a new arcobacter enrichment medium and comparison with two media developed for enrichment of *Campylobacter* spp. *Int J Food Microbiol*, 41: 53-58.

Donachie S. P.; Bowman, J. P.; On, S. L. W.; Alam, M. 2005. *Arcobacter halophilus* sp. nov., the first obligate halophile in the genus *Arcobacter*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55: 1271-1277.

Golla, S.C.; Murano, E. A.; Johnson, L. G.; Tipton, N. C.; Cureington, E. A.; Savell J. W. 2002. Determination of the occurrence of *Arcobacter butzleri* in beef and dairy cattle from Texas by various isolation methods. *J Food Prot*, 65: 1849-1853.

Harmon, K. M.; Wesley I. V. 1997. Multiplex PCR for the identification of *Arcobacter* and differentiation of *Arcobacter butzleri* from others arcobacters. *Vet Microbiol*, 59: 215-227.

Houf, K.; Tutenel, A.; De Zutter, L.; Van Hoof, J.; Vandamme, P. 2000. Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and identification of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii*. *FEMS Microbiol Lett*, 193: 89-94.

Houf, K.; Devriese, L. A.; De Zutter, L.; Van Hoof, J.; Vandamme, P. 2001. Development of a new protocol for the isolation and quantification of *Arcobacter* species from poultry products. *Int J Food Microbiol*, 71: 189-196.

Houf, K.; de Zutter, L.; Van Hoof, J.; Vandamme, P. 2002. Assessment of the genetic diversity among *Arcobacters* isolated from poultry products by using two PCR based typing methods. *Appl Environ Microbiol*, 68: 2172-2178.

Houf, K.; On, S. L. W.; Coenye, T.; Mast, J.; Van Hoof, J.; Vandamme, P. 2005. *Arcobacter cibarius* sp. nov., isolated from broiler carcasses. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55: 713-717.

Hsueh, R. R.; Teng, L. J.; Yang, P. C.; Wang, S. K.; Chang, S. C.; Ho, S. W.; Hsieh, W. C.; Luh, K. T. 1997. Bacteriemia caused by *Arcobacter cryaerophilus* 1B. *J Clin Microbiol*, 36: 489-491.

Kabeya, H.; Maruyama, S.; Morita, Y.; Kubo, M.; Yamamoto, K.; Ara, S.; Izumi, T.; Kobayashi, Y.; Katsube, Y.; Mikami, T. 2003. Distribution of *Arcobacter* species among livestock in Japan. *Vet Microbiol*, 93: 153-158.

Moreno, Y.; Alonso, J. L.; Botella, S.; Ferrús, M. A.; Hernández, J. 2004. Survival and injury of *Arcobacter* after artificial inoculation into drinking water. *Res Microbiol*, 155: 726-730.

Nachamkin, I. 1995. *Campylobacter* and *Arcobacter*. En: *Manual of Clinical Microbiology*. P. R. Murray y col. D. C. ASM Press. Washington. Pp: 483-491.

On, S. L.W.; Harrington, C. S.; Atabay, H. I. 2003. Differentiation of *Arcobacter* species by numerical analysis of AFLP profiles and description of a novel *Arcobacter* from pig abortion and turkey faeces. *J Appl Microbiol*, 95: 1096-1105.

Öngör, H.; Çetinkaya, B.; Açıık, M. N.; Atabay, H. I. 2004. Investigation of *Arcobacters* in meat and faecal samples of clinically healthy cattle in Turkey. *Lett Appl Microbiol*, 38: 339-344.

Rice, E.W.; Rodgers, M. R.; Wesley, I. W.; Johnson, C. H.; Tanner, S. A. 1999. Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water. *Lett Appl Microbiol*, 28: 31-35.

Scullion, R.; Harrington, C. S.; Madden, R. H. 2004. A comparison of three methods for the isolation of *Arcobacter* spp. from retail raw poultry in Northern Ireland. *J Food Prot*, 67: 799-804.

Vandamme, P.; Pugina, P.; Benzi, G.; Van Etterijck, R.; Vlaes, L.; Kersters, K.; Butzler, J. P.; Lior, H.; Lauwers, S. 1992. Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian school. *J Clin Microbiol*, 30: 2335-2337.

Vandenberg, O.; Dediste, A.; Houf, K.; Ibekwem, S.; Souayah, H.; Cadranel, S.; Douat, N.; Zissis, G.; Butzler, J. P.; Vandamme, P. 2004. *Arcobacter* species in humans. *Emerg Infect Dis*, 10: 1863-1867.

Van Driessche, E.; Houf, K.; Van Hoof, J.; De Zutter, L.; Vandamme, P. 2003. Isolation of *Arcobacter* species from animal feces. *FEMS Microbiol Lett*, 229: 243-248.

Van Driessche, E.; Houf, K.; Vangroenweghe, F.; Nollet, N.; De Zutter, L.; Vandamme, P.; Van Hoof, J. 2004. Occurrence and strain diversity of *Arcobacter* species isolated from healthy Belgian pigs. *Res Microbiol*, 155: 662-666.

Van Driessche, E.; Houf, K.; Vangroenweghe, F.; De Zutter, L.; Van Hoof, J. 2005. Prevalence, enumeration and strain variation of *Arcobacter* species in the faeces of healthy cattle in Belgium. *Vet Microbiol*, 105: 149-154.

Wesley I. V.; Wells, S. J.; Harmon, K. M.; Green, A.; Schroeder-Tucker, L.; Glover, M.; Siddique, I. 2000. Fecal shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in dairy cattle. *Appl Environ Microbiol*, 66: 1994-2000.

Wybo, I.; Breynaert, J.; Lauwers, S.; Lindenburg, F.; Houf, K. 2004. Isolation of *Arcobacter skirrowii* from a patient with chronic diarrhoea. *J Clin Microbiol*, 42: 1851-1852.

CAPÍTULO 6

PREVALENCIA DE *CAMPYLOBACTER* SPP. EN EXPLOTACIONES DE GANADO VACUNO LECHERO EN GALICIA

INTRODUCCIÓN

Campylobacter spp. son bacilos Gram negativos, microerófilos. Su distribución es mundial y se localizan en el tracto intestinal y genital como comensales de numerosos animales en los que pueden provocar infecciones intestinales y reproductivas (Quinn y col., 2004; Glenn y Post, 2005).

Las especies termófilas de *Campylobacter* se caracterizan por crecer a temperaturas altas y no hacerlo a temperaturas inferiores a 30°C (Altekruse y col., 1998). Los hospedadores naturales principales son las aves, aunque también las personas, vacas, ovejas, cerdos y mamíferos silvestres pueden actuar como portadores asintomáticos (Nielsen, 2002).

C. jejuni y *C. coli* son especies termófilas comensales de pollos y cerdos, respectivamente, aunque también se aíslan del tracto intestinal de otras especies animales (Harvey y col., 2004). Así, se ha aislado *C. jejuni* en heces diarreicas de perros, gatos y terneros, y en casos de mamitis bovinas (Atabay y Corry, 1998; Harvey y col., 2004) y *C. coli* en cerdos con diarrea (Quinn y col., 2004).

Las prevalencias de las especies de *Campylobacter* termófilas en vacuno lechero oscilan desde un 5% hasta un 89% dependiendo del tipo de muestra analizada, de la edad del animal estudiado, del método de laboratorio usado, etc. (Nielsen, 2002; Harvey y col., 2004). La aparición de *Campylobacter* spp. en heces bovinas se puede relacionar con la presencia de la bacteria en la leche tras una contaminación fecal durante el ordeño o a partir de una mamitis asintomática (Wesley y col., 2000; Glenn y Post, 2005).

C. jejuni, y en general, las especies de *Campylobacter* termófilas, son una de las principales causas de enteritis humana de origen alimentario en los países desarrollados (Busato y col., 1999). Los casos esporádicos están asociados, en su mayoría, al consumo de productos avícolas (Nielsen, 2002), sin embargo, también se han relacionado con el consumo de leche no pasteurizada o cruda y de agua contaminada (Sato y col., 2004).

En España no se han realizado estudios epidemiológicos de *Campylobacter* spp. en explotaciones de vacuno lechero hasta la actualidad, por lo que los objetivos de este

estudio fueron determinar la prevalencia de *Campylobacter* spp. en explotaciones bovinas de aptitud lechera e identificar determinadas prácticas de manejo como potenciales factores de riesgo para la presencia de este microorganismo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio, recogida de datos y muestras

El estudio fue desarrollado en explotaciones de vacuno lechero localizadas en las provincias de Lugo y A Coruña entre junio de 2005 y abril de 2006. Se seleccionaron 89 granjas al azar entre 15933 explotaciones censadas, en base a una prevalencia esperada del 83,3% (Busato y col., 1999) con un nivel de confianza del 95%. Todas las granjas estaban incluidas en un programa de implementación del APPCC. El número medio de vacas por explotación era de 61,9 (17-39) y con 40,4 (13-179) vacas en lactación. El 65,2% de estas explotaciones presentaban un sistema de producción en estabulación libre.

En cada una de las explotaciones visitadas fueron recogidas muestras de heces de forma aséptica directamente de la ampolla rectal de las vacas que estaban en lactación, utilizando guantes humedecidos en solución salina estéril. Se recogieron un total de 254 muestras fecales de aproximadamente 75 gramos por animal en botes estériles que eran mantenidos en refrigeración hasta su recepción en el laboratorio de análisis, 24 horas posteriores a su recogida. El número de animales analizados fue el 7,1% del total de las vacas en lactación (3598), lo que representó un 8,8% de animales por explotación. Ninguno de estos animales presentaba una sintomatología compatible con infecciones por *Campylobacter* spp. en el período de recolección de las muestras.

A su vez, se cubrió un cuestionario para evaluar distintas prácticas de manejo como posibles factores de riesgo para la presencia de *Campylobacter* spp. Así, fueron valorados la compra de animales (independientemente de que realizasen o no cría), la utilización de agua de bebida clorada (considerada clorada cuando era de origen municipal, mientras que si era de origen propio –manantial, pozo, etc.- fue no clorada), el uso de bebederos de manera individual (explotaciones con estabulación fija que disponían de bebederos como máximo para dos animales, considerados como de uso individual), si analizaban el

ensilado antes de su consumo, la salida a pastos de los animales (tanto de manera diaria o estacional) y la limpieza diaria de pasillos (como medida general de la limpieza del establo).

El cuestionario utilizado para la valorar las prácticas de manejo se presenta en el anexo 1 del capítulo 2, aunque algunos aspectos y características de las granjas no pudieron ser determinados.

Aislamiento e identificación de *Campylobacter* spp.

Las heces se sembraron a dilución 1:10 en dos medios líquidos selectivos, en caldo Bolton a 42°C y en caldo CAT a 37°C ambos en microaerofilia durante 48 horas, a partir de estos caldos se sembraron:

- 100 µl en agar Karmali y 100 µl en agar Abeyta-Hunt-Bark en microaerofilia, ambos a 42°C durante 96 horas, para aislar las especies de *Campylobacter* termófilas.
- 100 µl en agar Karmali a 30°C y 100 µl en agar Abeyta-Hunt-Bark a 37°C, ambos en microaerofilia durante 96 horas, para aislar las especies de *Campylobacter* no termófilas.
- 200 µl en agar ANA: sobre la superficie de una placa de agar base para anaerobios suplementado con 5% de sangre hemolizada de caballo, se colocó un filtro de 47 mm de diámetro y filtro de 0,65 µm de poro. Se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, se retiró el filtro y se sembró para aislar, incubándose en microaerofilia a 37°C durante 96 horas.

Para la identificación se utilizaron varias pruebas como fueron la observación del aspecto macroscópico de las colonias, la observación microscópica mediante tinción con cristal violeta al 50% y mediante microscopio de campo oscuro, las pruebas de la oxidasa y de la catalasa, la identificación serológica mediante el *Campylobacter* Rapid Culture Confirmation Test (Microgen Bioproducts, Surrey, England) y la prueba de la hidrólisis del hipurato.

Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron analizados usando los programas Microsoft Excel y el estadístico SPSS 13.0. Las explotaciones que tenían como mínimo un animal positivo para *Campylobacter* spp. fueron consideradas positivas. Para evaluar la asociación entre las variables consideradas como potenciales factores de riesgo y el aislamiento de las bacterias en heces, se realizó la prueba de χ^2 para variables categóricas, considerándose una significación del 95% de probabilidad con una significación estadística $P \leq 0,05$ y 1 grado de libertad.

RESULTADOS

Del total de las 89 granjas visitadas durante el estudio, 32 (36,0%) fueron positivas a *Campylobacter* spp. En relación a los animales individuales, 52 (20,5%) muestras de heces analizadas fueron positivas a *Campylobacter* spp.

Tabla 6.1: Prácticas de manejo y su relación con al aislamiento de *Campylobacter* spp. en heces de ganado vacuno lechero

Variables	Nº granjas positivas (%)	<i>Campylobacter</i> spp.		
		P	OR	IC del OR
Compra animales				
No	14/42 (33,3%)	0,35	0,61	0,22-1,71
Si	8/34 (23,5%)			
Agua de bebida clorada				
No	21/65 (32,3%)	0,24	1,77	0,68-4,61
Si	11/24 (45,8%)			
Bebederos de uso individual				
No	23/58 (39,6%)	0,32	0,62	0,24-1,59
Si	9/31 (29,0%)			
Limpieza diaria bebederos				
No	23/65 (35,4%)	0,76	0,85	0,30-2,39
Si	7/22 (31,8%)			
Análisis ensilado				
No	5/15 (33,3%)	0,87	1,11	0,34-3,58
Si	26/73 (35,6%)			
Salida a pastos				
No	19/51 (37,2%)	0,84	0,91	0,38-2,20
Si	13/37 (35,1%)			
Limpieza pasillos				
No	5/23 (21,7%)	0,09	2,56	0,85-7,74
Si	27/65 (41,5%)			

Los diversos aspectos relacionados con el manejo en las explotaciones estudiadas y los resultados obtenidos al aplicar los tratamientos estadísticos mencionados anteriormente están reflejados en la Tabla 6.1. Ninguna de las prácticas analizadas presentaba una relación significativa con el aislamiento de *Campylobacter* spp. en heces.

DISCUSIÓN

De las 89 explotaciones visitadas en nuestro estudio, el 36,0% presentaron como mínimo un animal positivo a *Campylobacter* spp. Este valor se encuentra por debajo de los descritos en Dinamarca por Nielsen en 2002, quien comprobó que en 24 granjas de vacuno lechero el 83,3% eran positivas, en Suiza por Busato y col. en 1999, donde el 97% de las granjas de cría de terneros presentaban *Campylobacter* spp. y en el Reino Unido donde Atabay y Corry en 1998 detectaron esta bacteria en tres granjas; sin embargo, en un estudio realizado en Noruega, sólo el 5,6% de 36 granjas de vacuno analizadas eran positivas a *Campylobacter* spp. (Rosef y col., 1983).

El porcentaje de *Campylobacter* spp. en las muestras fecales de los animales analizados en nuestro estudio fue del 20,5% (52/254), valor similar al 23,2% en 1191 muestras de heces de vacas lecheras clínicamente sanas de EE.UU. indicado por Sato y col. (2004), y superior a los encontrados también en EE.UU., donde entre 0 y 10% de 720 heces en granjas eran positivas (Harvey y col., 2004) y al 9,2% de 120 vacas analizadas en Dinamarca (Nielsen, 2002).

La diversidad en los valores de las prevalencias obtenidos en los distintos estudios puede deberse a los métodos de laboratorio utilizados para su aislamiento e identificación (Sato y col., 2004), a las variaciones geográficas y estacionales, siendo mayor en primavera (Busato y col., 1999; Sato y col., 2004), a la edad de los animales muestreados (Stanley y col., 1998) o, incluso, a la excreción intermitente o en cantidades menores al límite de detección por las técnicas de laboratorio (Nielsen, 2002).

El otro objetivo planteado en este trabajo fue tratar de determinar si alguna de las prácticas de manejo de los animales estuvieron relacionadas con la aparición de *Campylobacter* spp. en las heces de las vacas.

Humphrey y Beckett (1987) registraron que la excreción fecal de *C. jejuni* ocurría únicamente en vacas con acceso a aguas sin clorar, sin embargo, en nuestro estudio la utilización de agua clorada no estuvo relacionada de manera significativa ($P = 0,24$) con la aparición de *Campylobacter* spp. en las heces, al igual que lo observado por Wesley y col., 2000. Algo similar comprobamos con el uso de bebederos individuales, que parece ser un factor de protección ($OR = 0,62$), mientras que, en cuanto a la limpieza de los mismos, la proporción de aislamientos de *Campylobacter* spp. fue menor cuando se limpiaban los bebederos a diario ($OR = 0,85$), lo que parece lógico puesto que el agua de bebida es una posible fuente de infección para el ganado bovino (Humphrey y Beckett, 1987).

A pesar de que los resultados observados en este estudio no fueron significativos ($P = 0,09$), mantener en buenas condiciones de limpieza el establo se considera un factor de protección, así esta práctica resultó ser significativa en un estudio realizado por Wesley y col. (2000), aunque utilizando un nivel de significación menor. La falta de limpieza del establo junto con que los animales no salgan a pastos favorece la re-infección de los animales, al aumentar la frecuencia de exposición cuando las vacas permanecen en el establo, ya que están constantemente expuestas a la infección y la posible re-contaminación tanto del agua como del alimento (Rosef y col., 1983; Stanley y col., 1998).

En otros trabajos se han estudiado otros aspectos con posible influencia en la aparición de *Campylobacter* spp. en granjas de vacuno lechero, observándose una relación significativa principalmente en la composición de la alimentación o la presencia de roedores con acceso al alimento (Wesley y col., 2000). Todo ello indica que es necesario realizar más estudios para identificar determinadas prácticas de manejo como posibles factores de riesgo para la introducción, diseminación y excreción de estos microorganismos en el ganado vacuno lechero.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altekruse, F.; Swerdlow, D. L.; Stern, N. J. 1998. *Campylobacter jejuni*. Microbial food borne pathogens. *Vet Clin N Am-Food Anim Pract*, 14: 31-40.

Atabay, H. I.; Corry J. E. L. 1998. The isolation and prevalence of Campylobacters from dairy cattle using a variety of methods. *J Appl Microbiol*, 84: 733-740.

Busato, A.; Hofer, D.; Lentze, T.; Gaillard, C.; Burnens, A. 1999. Prevalence and infection risks of zoonotic enteropathogenic bacteria in Swiss cow calf farms. *Vet Microbiol*, 69: 251-263.

Glenn Songer, J.; K. W. Post. 2005. The genera *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Arcobacter*. En: Veterinary Microbiology, Bacterial and fungal agents of animal diseases. Elsevier Saunders. Missouri. Pp: 223-231.

Harvey R. B.; Droleskey, R. E.; Sheffield, C. L.; Edrington, T. E.; Callaway, T. R.; Anderson, R. C.; Drinnon, D. L. J.; Ziprin, R. L.; Scott, H. M.; Nisbet, D. J. 2004. *Campylobacter* prevalence in lactating dairy cows in the United States. *J Food Prot*, 67: 1476-1479.

Humphrey T. J.; Beckett, P. 1987. *Campylobacter jejuni* in dairy cows and raw milk. *Epidemiol Infect*, 98: 263-269.

Nielsen, E. M. 2002. Occurrence and strain diversity of thermophilic campylobacters in cattle of different age groups in dairy herds. *Lett Appl Microbiol*, 35: 85-89.

Quinn P. J.; Markey, B. K.; Carter, M. E.; Donnelly, W. J.; Leonard, F. C. 2004. Especies de *Campylobacter*. En: Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. Ed. Acribia, S. A. Zaragoza. Pp: 205-210.

Rosef, O.; Gondrosen, B.; Kapperud, G.; Underdal, B. 1983. Isolation and characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from domestic and wild mammals in Norway. *Appl Environ Microbiol*, 46: 855-859.

Sato, K.; Bartlett, P. C.; Kaneene, J. B.; Downes, F. P. 2004. Comparison of prevalence and antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter* spp. isolates from organic and conventional dairy herds in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol*, 70: 1442-1447.

Stanley, K. N.; Wallace, J. S.; Currie, J. E.; Diggle, P. J.; Jones, K. 1998. The seasonal variation of thermophilic campylobacters in beef cattle, dairy cattle and calves. *J Appl Microbiol*, 85: 472-480.

Wesley I. V.; Wells, S. J.; Harmon, K. M.; Green, A.; Schroeder-Tucker, L.; Glover, M.; Siddique, I. 2000. Fecal shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in dairy cattle. *Appl Environ Microbiol*, 66: 1994-2000.

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN GENERAL

El principal objetivo de esta Tesis Doctoral fue la adaptación e implementación de un sistema APPCC en explotaciones de ganado vacuno lechero, con objeto de mejorar la calidad microbiológica e higiénica de la leche producida en las granjas incluidas en el estudio. Así, en cada una de las granjas se desarrollaron las 12 etapas y se aplicaron los 7 principios que integran el APPCC.

En los últimos años el sistema APPCC ha sido utilizado en industrias alimentarias (Mouwen y Prieto, 1998; Morgan, 2004) e incluso en granjas de vacuno lechero, pero en este último caso siempre enfocado a prevenir un peligro concreto, como la presencia de medicamentos en leche (Zorraquino, 1998) o la gestión de mamitis (Alves, 2003; Cullor, 1995). Sin embargo, hasta la fecha no se había planteado su aplicación de manera integral y en combinación con la utilización de las BP en las granjas de vacuno lechero en España, como se ha realizado anteriormente en otros países (Agriculture and Agri-Food Canada, 2001).

Actualmente existen pocos trabajos de campo en los que se aplicara este protocolo en explotaciones bovinas de aptitud láctea. De forma similar al presente estudio, en esos trabajos algunos de los PCCs identificados, en los que se aplicaron medidas correctoras, fueron el uso de medicamentos, el almacenamiento de la leche, la limpieza de los equipos de ordeño y la rutina de ordeño (Sischo y col., 1997; Agriculture and Agri-Food Canada, 2001; Alves, 2003)

Con la implementación de esta metodología se posibilita el control de los factores de riesgo asociados al proceso de producción de la leche, desde la entrada de materias primas hasta la recogida de la leche por la industria láctea, abarcando todas las actividades que tienen lugar en las explotaciones ganaderas. Comprobamos que su aplicación resulta sencilla para los ganaderos, los cuales, en su mayoría, participaron activamente en el desarrollo del APPCC, además de ser un mecanismo que facilita la certificación tanto de la granja como de la leche. Por todo ello, entendemos que el sistema APPCC podría en un futuro cercano implementarse en las explotaciones ganaderas como un sistema integral de gestión de la calidad (Noordhuizen y Welpelo, 1996).

Uno de los parámetros monitorizados del APPCC fue la evaluación de la higiene de superficies del equipo de ordeño mediante la ATP-bioluminiscencia. Las mediciones obtenidas fueron muy diversas, desde un mínimo (0) hasta valores superiores a 10^5 URL, similar a lo observado por otros autores (Slaghuis y Wieggersman, 1996). Se obtuvieron los valores medios de URL más bajos en las gomas de las pezoneras y los más elevados en los puntos de conexión al circuito situados en el establo, donde la contaminación ambiental y la dificultad para realizar una limpieza adecuada del circuito son mayores.

Se comprobó que la utilización de agua no potable, conllevaba un aumento de URL en las superficies evaluadas, por lo que es importante disponer de agua de calidad microbiológica, pues en caso contrario el ATP de las superficies y el RB total del tanque se verán incrementados. También el ordeño en cántara conlleva URL más elevadas, ya que la limpieza de estos sistemas es manual y por lo tanto la temperatura del agua no suele ser la adecuada (Marco, 1998).

No pudimos relacionar los LURL medidos en las superficies del equipo y el LRB de tanque, probablemente debido a los bajos recuentos encontrados en las granjas estudiadas y a la influencia de otros factores; sin embargo, es fundamental realizar una buena limpieza del equipo de ordeño, ya que algunos autores consideran que entre el 50 y 80% del RB total de tanque depende de la higiene de las superficies (Marco, 1998).

A excepción de alguna comunicación en congresos (Slaghuis y Wieggersma, 1996; De Celis, 2006) no se había utilizado esta técnica para monitorizar la higiene de equipos de ordeño, por lo tanto no existen valores de URL de referencia para considerar una superficie limpia. En este trabajo se proponen los valores 152, 242, 282 y 1821 de URL en pezoneras, colectores, unidades finales y puntos de conexión al circuito, respectivamente, como un límite fácilmente alcanzable por los ganaderos cuyo objetivo sea la mejora de la higiene del equipo de ordeño.

La ATP-bioluminiscencia puede usarse como un método práctico para valorar de forma objetiva por el ganadero la limpieza de las diferentes superficies de contacto con la leche en su explotación.

Dentro del sistema APPCC se identificó como peligro biológico la presencia de patógenos zoonóticos, específicamente *Listeria* spp., *Campylobacter* spp. y *Arcobacter* spp., en leche de tanque de refrigeración.

Así, *Listeria* spp. fue aislada en el 16,3% de las muestras de leche analizadas, valor superior al encontrado en otros trabajos (Farber y col., 1988; Husu, 1990; Rea y col., 1992; Van Kessel y col., 2004). *L. innocua* fue la especie más identificada (7,1%), seguida de *L. monocytogenes* (6,1%) y con menores prevalencias *L. grayi* y *L. welshimeri* (2,0% y 1,0%, respectivamente). Las diferencias encontradas en las prevalencias entre los diferentes trabajos pueden deberse a diversas razones, sin excluir las distintas regiones geográficas estudiadas, el tipo de muestra analizada o a la metodología analítica empleada (Van Kessel y col., 2004). La presencia de listeria en ensilados y heces aumenta el riesgo de que aparezca en leche; de este modo, en nuestro estudio se observó que ese riesgo se multiplica por 2 ó 3, mientras que Sanaa y Ménard (1994) comprobaron que ese riesgo se multiplica por 20, probablemente debido a unas mejores condiciones higiénicas generales en las explotaciones de nuestro estudio.

El crecimiento de listerias en ensilados es favorecido por una acidificación insuficiente; así, la relación entre el valor de pH del ensilado y el aislamiento de esta bacteria fue significativa, lo que ratifica que la excreción por heces puede tener su origen en el consumo de ensilado contaminado (Sanaa y col., 1993) o en la contaminación ambiental (Van Kessel y col., 2004).

A su vez, disponer de una buena ventilación y adecuadas condiciones higiénicas en el establo disminuye la probabilidad de contaminación de la leche por *Listeria* spp., ya que la suciedad y la concentración de gases y microorganismos será menor. Es, así mismo, importante seguir una correcta rutina de ordeño para reducir la incidencia de infecciones (Rohrbach y col., 1992; Sanaa y col., 1993; Hassan y col., 2001) y aplicar un orden de ordeño adecuado para reducir la probabilidad de contaminación de la leche. En el ordeño en plaza, proteger la leche de la contaminación ambiental es más complicado y el RB es más elevado (Hassan y col., 2001); sin embargo, en las muestras con RB más altos no se aisló *Listeria* spp. con mayor frecuencia que cuando los RB eran menores. Esto puede ser debido a que su crecimiento esté enmascarado por el de otras bacterias (Fernández-

Garayzabal y col. 1987). No obstante, cuando se aisló *Listeria* spp., tanto el RCS como el RB de la leche del tanque de refrigeración se vieron ligeramente incrementados.

Otros microorganismos potencialmente zoonóticos estudiados fueron *Campylobacter* spp. y *Arcobacter* spp. *Campylobacter* spp. se aisló en el 36,0% de las explotaciones visitadas, prevalencia muy superior al 5,6% encontrado por Rosef y col. (1983) e inferior a la descrita en otros estudios realizados con un número menor de explotaciones (Atabay y Corry, 1998; Wesley y col., 2000; Nielsen, 2002). El porcentaje de muestras de heces positivas fue del 20,5%, similar a los indicados en otros trabajos, en los que analizaron menor número de muestras (Nielsen, 2002; Harvey y col., 2004; Sato y col., 2004).

Con respecto a *Arcobacter* spp., el 68,5% de las granjas visitadas presentaron como mínimo un animal positivo, valor próximo al observado por Wesley y col. (2000) en un estudio en el que sólo se analizaron muestras fecales de 31 explotaciones. A nivel individual, aislamos *Arcobacter* spp. en 41,7% de los animales muestreados, porcentaje claramente superior al indicado en otros estudios (Kabeya y col., 2003; Öngör y col., 2004; Van Driessche y col., 2005). La especie más prevalente fue *A. cryaerophilus* (27,9%) seguida de *A. skirrowii* (20,1%), al contrario que lo descrito en otros trabajos (Kabeya y col., 2003; Van Driessche y col., 2003; Öngör y col., 2004).

Para ambos géneros bacterianos las diferencias en las prevalencias pueden ser debidas a la localización geográfica y las variaciones estacionales de cada estudio, al tamaño y tipo de muestra recogida (heces o hisopos rectales, etc.), a los animales analizados (terneros, adultos, vacas lecheras o de aptitud cárnica) y, de manera más significativa, a los métodos de laboratorio utilizados para su aislamiento e identificación (Kabeya y col., 2003; Sato y col., 2004; Van Driessche y col., 2005).

Por último, las características y aspectos de manejo en las granjas que pueden tener influencia sobre la aparición de estos microorganismos en las heces, no presentaron una relación estadísticamente significativa, resultados similares a los observados por Wesley y col. (2000). Sin embargo, para interpretar los efectos de estos potenciales factores de riesgo se debe tener en cuenta la epidemiología de las bacterias; así, el uso de agua potable, el chequeo sanitario de animales incorporados y la limpieza de las instalaciones

son aspectos a tener en cuenta en cualquier explotación ganadera (Harvey y col., 2004; Moreno y col., 2004; Van Driessche y col., 2005)

Es necesario realizar nuevos estudios para determinar las prevalencias reales de los diversos agentes patógenos zoonóticos incluidos en esta Tesis, así mismo se necesitan llevar a cabo más trabajos para evaluar qué condiciones de manejo o características del entorno de los animales actúan como factores de riesgo para estos microorganismos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agriculture and Agri-Food Canada. 2001. Canadian Quality Milk-Quality Assurance Program. Reference Manual, Canada.

Alves, A. 2003. Aplicação do sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) em propriedades leiteiras. Tesis Doctoral. Pirassununga, Brasil

Atabay, H. I.; Corry J. E. L. 1998. The isolation and prevalence of *Campylobacters* from dairy cattle using a variety of methods. *J Appl Microbiol*, 84: 733-740.

Cullor, J. S. 1995. Implementing the HACCP program on your clients' dairies. *Vet Med*, 90: 290-295.

De Celis, P. 2006. Control de la limpieza de los equipos mediante bioluminiscencia. XI Congreso Anembe de Medicina Bovina, Zaragoza.

Farber, J. M.; Sanders, G. W.; Malcolm, S. A. 1988. The presence of *Listeria* spp in raw milk in Ontario. *Can J Microbiol*, 34: 95-100.

Fernández-Garayzabal, J. F.; Domínguez, L.; Vazquez, J. A.; Gómez-Lucia, E.; Rodríguez-Ferri, E. R.; Suárez, G. 1987. Ocurrence of *Listeria monocytogenes* in raw milk. *Vet Rec*, 120: 258-259.

Harvey R. B.; Droleskey, R. E.; Sheffield, C. L.; Edrington, T. E.; Callaway, T. R.; Anderson, R. C.; Drinnon, D. L. J.; Ziprin, R. L.; Scott, H. M.; Nisbet, D. J. 2004. *Campylobacter* prevalence in lactating dairy cows in the United States. *J Food Prot*, 67: 1476-1479.

Hassan, L.; Mohammed, H. O.; McDonough, P. L. 2001. Farm-management and milking practices associated with the presence of *L. monocytogenes* in New York state dairy herds. *Prev Vet Med*, 51: 63-73.

Husu, J. R. 1990. Epidemiological studies on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in the feces of dairy cattle. *J Vet Med B*, 37: 276-282.

Kabeya, H.; Maruyama, S.; Morita, Y.; Kubo, M.; Yamamoto, K.; Ara, S.; Izumi, T.; Kobayashi, Y.; Katsube, Y.; Mikami, T. 2003. Distribution of *Arcobacter* species among livestock in Japan. *Vet Microbiol*, 93: 153-158.

Marco, J. C. 1998. Mamitis bovina y calidad de la leche. *Bovis*, 85: 45-71.

Moreno, Y.; Alonso, J. L.; Botella, S.; Ferrús, M. A.; Hernández, J. 2004. Survival and injury of *Arcobacter* after artificial inoculation into drinking water. *Res Microbiol*, 155: 726-730.

Morgan, T. G. 2004. Milk quality assurance and good farming practice on dairy farms. XXI Jornadas GTEMCAL, Asturias

Mouwen, J.; Prieto, M. 1998. Aplicación del sistema ARICPC-HACCP a la industria cárnica. *Cienc Tecnol Aliment*, 2: 42-46.

Nielsen, E. M. 2002. Occurrence and strain diversity of thermophilic campylobacters in cattle of different age groups in dairy herds. *Lett Appl Microbiol*, 35: 85-89.

Noordhuizen, J. P. T. M.; Welpelo, H. J. 1996. Sustainable improvement of animal health care by systematic quality risk management according to the HACCP concept. *Vet Q*, 18: 121-126.

Öngör, H.; Çetinkaya, B.; Açık, M. N.; Atabay, H. I. 2004. Investigation of Arcobacters in meat and faecal samples of clinically healthy cattle in Turkey. *Lett Appl Microbiol*, 38: 339-344.

Rea, M. C.; Cogan, T. M.; Tobin, S. 1992. Incidence of pathogenic bacteria in raw milk in Ireland. *J Appl Bacteriol*, 73: 331-336.

Rohrbach, B.; Draughon, F. A.; Davidson, P. M.; Oliver, S. P. 1992. Prevalence of *L. monocytogenes*, *C. jejuni*, *Y. enterocolitica*, and Salmonella in bulk tank milk: Risk factors and risk of human exposure. *J Food Prot*, 55: 93-97.

Rosef, O.; Gondrosen, B.; Kapperud, G.; Underdal, B. 1983. Isolation and characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from domestic and wild mammals in Norway. *Appl Environ Microbiol*, 46: 855-859.

Sanaa, M.; Poutrel, B.; Menard, J. L.; Serieys, F. 1993. Risk factors associated with contamination of raw milk by *L. monocytogenes* in dairy farms. *J Dairy Sci*, 76: 2891-2898.

Sanaa, M.; Ménard, J. L. 1994. Contamination du lait cru par *L. monocytogenes*: origines, facteurs de risque, prévention. *Rec Méd Vet*, 170: 437-442.

Sato, K.; Bartlett, P. C.; Kaneene, J. B.; Downes, F. P. 2004. Comparison of prevalence and antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter* spp. isolates from organic and conventional dairy herds in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol*, 70: 1442-1447.

Sischo, W. M.; Kiernan, N. E.; Burns, C. M.; Byler, L. I. 1997. Implementing a quality assurance program using a risk assessment tool on dairy operations. *J Dairy Sci*, 80: 777-787.

Slaghuis, B.; Wiegersma, W. 1996. Use of ATP-technique for the control of the cleaning of milking equipment. En: proceedings, IDF Symposium on Bacteriological quality of raw milk. Austria. Pp: 173-174.

Van Driessche, E.; Houf, K.; Van Hoof, J.; De Zutter, L.; Vandamme, P. 2003. Isolation of *Arcobacter* species from animal feces. *FEMS Microbiol Lett*, 229: 243-248.

Van Driessche, E.; Houf, K.; Vangroenweghe, F.; De Zutter, L.; Van Hoof, J. 2005. Prevalence, enumeration and strain variation of *Arcobacter* species in the faeces of healthy cattle in Belgium. *Vet Microbiol*, 105: 149-154.

Van Kessel, J. S.; Karns, J. S.; Gorski, L.; McCluskey, B. J.; Perdue, M. L. 2004. Prevalence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and fecal coliforms in bulk tank milk on US dairies. *J Dairy Sci*, 87: 2822-2830.

Wesley I. V.; Wells, S. J.; Harmon, K. M.; Green, A.; Schroeder-Tucker, L.; Glover, M.; Siddique, I. 2000. Fecal shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in dairy cattle. *Appl Environ Microbiol*, 66: 1994-2000.

Zorraquino, M. A. 1998. Aplicación de un sistema de análisis de riesgos y puntos críticos para asegurar una leche libre de residuos de medicamentos veterinarios. Curso de medicina de la producción en vacuno lechero, Lugo.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

1. La implementación del sistema de análisis de peligros y puntos de control crítico en explotaciones de vacuno lechero posibilita la producción de leche de calidad higiénica y microbiológica, al implicar la participación activa del ganadero y ser fácilmente aplicable en todas las fases del proceso productivo.
2. El análisis de peligros y puntos de control crítico permite actuar sobre aquellas situaciones en las que existe probabilidad de aparición de los peligros biológicos o químicos “presencia de microorganismos zoonóticos, saprofitos o patógenos mamarios, de residuos de medicamentos y de inhibidores en la leche de tanque”, disminuyendo el riesgo de presentación de los mismos mediante la aplicación de unas buenas prácticas.
3. Mediante la ATP-bioluminiscencia se puede monitorizar la higiene de las superficies de los equipos de ordeño, obteniendo resultados en unidades relativas de luz en tiempo real. Con esta técnica se establecieron los valores de referencia 152, 242, 282 y 1821 unidades relativas de luz en pezoneras, colectores, unidades finales y puntos de conexión al circuito, respectivamente, válidos para determinar un adecuado nivel de limpieza de manera objetiva.
4. La cantidad de ATP presente en las distintas superficies del equipo de ordeño no es el factor que más influye sobre el recuento bacteriano total en leche de tanque de refrigeración, valor que depende de otros factores entre los que se encuentra la calidad del agua utilizada en la limpieza del equipo de ordeño y del tanque de refrigeración.
5. La acidificación insuficiente y las condiciones deficientes de conservación del ensilado favorecen la aparición y multiplicación de *Listeria* spp. y su consumo predispone a la excreción en heces de esta bacteria. La presencia de *Listeria* spp. en ensilado y heces aumenta entre 2 y 3 veces el riesgo de contaminación de la leche de tanque de refrigeración por dicho microorganismo.
6. *Listeria* spp. fue aislada en el 16,3% de las muestras de leche de tanque de la granjas, siendo *Listeria monocytogenes* de las especies más frecuentes. Por otra parte, el mantenimiento de unas buenas condiciones higiénicas del establo junto con una rutina de

ordeño correcta son factores fundamentales para evitar la contaminación de la leche por *Listeria* spp.

7. *Arcobacter* spp. estuvo presente en las granjas y heces de las vacas en lactación analizadas en una mayor proporción que *Campylobacter* spp., destacando la especie *Arcobacter cryaerophilus* con un 27,9%. No pudo ser identificada ninguna práctica de manejo, ni características concretas de las explotaciones como factores de riesgo para la presencia de estas bacterias.

CAPÍTULO 9

RESUMEN

En esta Tesis Doctoral se llevaron a cabo una serie de estudios, presentados en diferentes capítulos, con el objetivo general de implementar un sistema de análisis de peligros y puntos de control crítico (APPCC) en explotaciones de ganado vacuno de aptitud lechera de Galicia con objeto de mejorar las condiciones de producción de la leche.

Así, en el primer capítulo describimos la adaptación e implementación de un sistema de APPCC en 187 granjas, como un método preventivo de alteraciones de la calidad de la leche para la obtención de medias geométricas mensuales del recuento de células somáticas (RCS) menores a 200×10^3 cel/ml, del recuento bacteriano (RB) menores de 20×10^3 ufc/ml y ausencia de patógenos zoonóticos e inhibidores en la leche del tanque de refrigeración de las granjas.

Durante el desarrollo del APPCC, se analizaron diversos peligros como fueron la presencia de patógenos zoonóticos, mamarios y saprofitos que podrían aparecer en cada una de las etapas de producción de la leche, definiendo las medidas preventivas a aplicar para evitar su aparición. Posteriormente, establecimos los puntos de control crítico en cada una de las fases de la producción de leche y determinamos los límites críticos que en la mayoría de los casos fue la realización o no de una actividad preventiva concreta. Al mismo tiempo establecimos un sistema de monitorización y registro que garantizase que el planteamiento aplicado era realizado de acuerdo con los principios del APPCC y que permitiese la certificación de la leche en la explotación.

Dentro del programa de APPCC y para evaluar de una manera rápida la higiene de las superficies de los equipos de ordeño, fue aplicada la ATP-bioluminiscencia en gomas de pezoneras, colectores, unidades finales y puntos de conexión al circuito. Se cuantificó el ATP presente en estas superficies, comprobando que las pezoneras eran las partes más limpias. Entre los factores de manejo de la explotación que podrían tener influencia sobre la cantidad de ATP presente en las superficies estudiadas se identificaron el uso de agua no clorada y el ordeño realizado en plaza mediante cántara o circuito con respecto a sala de ordeño, conllevando en ambos casos mediciones de ATP mayores. Finalmente, analizamos la relación existente entre la higiene de estas superficies y el RB total en leche de tanque de refrigeración, comprobándose que la higiene de éstas no explicaba totalmente

el RB total (únicamente el 12%), lo que demuestra el papel fundamental que juega el funcionamiento del tanque de refrigeración en conservar los RB en valores bajos.

En la implementación del APPCC, consideramos, entre otros peligros, la presencia de diversos patógenos potencialmente zoonóticos como son *Listeria* spp., *Campylobacter* spp. y *Arcobacter* spp. En los capítulos 4, 5 y 6 se reflejan los trabajos que evalúan las prevalencias de estas bacterias y los diversos aspectos de manejo y características de las granjas que influyen en la presencia de estos microorganismos, respectivamente.

En el capítulo 4 fueron determinadas las prevalencias de *Listeria* spp. en leche del tanque de refrigeración y su influencia sobre la calidad higiénica de la leche. Además, fueron identificadas las prácticas de manejo asociadas a su posible presencia mediante el desarrollo de un estudio transversal en explotaciones de vacuno lechero. En 98 granjas se recogieron muestras de leche de tanque, en 97 muestras de heces de vacas en lactación y en 83 del ensilado usado como alimento, detectándose *L. monocytogenes* en el 6,1%, 9,3%, 6,0%, respectivamente. Se pudo confirmar la relación existente entre la calidad de conservación del ensilado y la presencia de *Listeria* spp. en el mismo, así como con su posterior aislamiento de heces y de la leche. Como potenciales factores de riesgo en la contaminación de la leche del tanque de refrigeración resultaron significativos el orden de ordeño y el sistema de ordeño utilizado. Al mismo tiempo, comprobamos que la presencia de *Listeria* spp. influye sobre la calidad higiénica de la leche cruda, aumentando ligeramente el RCS y el RB, aunque no de manera significativa.

Con respecto a *Campylobacter* spp. y *Arcobacter* spp., se recogieron muestras fecales a partir de animales en lactación hasta un total de 254 heces, procedentes de 89 explotaciones de ganado vacuno lechero. En estas muestras *Campylobacter* spp. estuvo presente con una prevalencia total en granjas del 36,0% y en animales individuales del 20,5%. En cuanto a *Arcobacter*, la prevalencia total a nivel de granjas fue del 68,5% y en animales individuales del 41,7%. Mediante la aplicación de una reacción en cadena de la polimerasa múltiple fueron identificados los 148 aislamientos de *Arcobacter* spp. obtenidos, siendo la especie predominante *A. cryaerophilus* seguida por *A. skirrowii*. Así mismo, fue desarrollado un cuestionario para valorar distintas prácticas de manejo de las granjas como potenciales factores de riesgo para la presencia de estos microorganismos.

La relación entre los factores de riesgo evaluados y la presencia de estos patógenos en las heces de las vacas en lactación analizadas no fue significativa. Sin embargo, para interpretar el efecto estadístico que una práctica ejerce sobre la presencia de estos patógenos debe tenerse en cuenta la biología del microorganismo. Así, unas buenas prácticas de cloración del agua disminuirá la excreción de las especies de *Arcobacter* y *Campylobacter* en las heces.

CAPÍTULO 10

SUMMARY

Several studies, which were carried out in this Thesis, are presented in different chapters and they have the general objective of implementing the hazard analysis and critical control point (HACCP) system in dairy cattle farms in Galicia (NW Spain) to improve the conditions of milk production.

In the first chapter implementation of HACCP in 187 dairy cattle farms was described as a preventive method to avoid the declining of milk quality. The purpose was to produce farm milk with geometrical mean of somatic cell count (SCC) and bacterial count (BC) smaller than 200×10^3 cell/ml and 20×10^3 cfu/ml respectively, and the absence of zoonotic pathogens and chemical inhibitors. At the same time that the HACCP was being developed, several hazards were analyzed like the possible existence of zoonotic, mammary or saprophyte pathogens in every stage of milk production, and preventive procedures were defined to avoid these hazards. Subsequently, critical control points were established in every step of the process and the majority of the critical limits were determined as execution or not execution of a preventive procedure. Also, a monitoring and recording system was established to ensure that the implemented HACCP system was performed according to the principles of the HACCP plan, and therefore the certification of milk is achieved.

ATP bioluminescence was used in the HACCP approach for a rapid monitoring of the hygienic conditions of milking equipment surfaces: teat cup rubbers, teat dip containers, final units and points of pipeline tie-stall milking. The cleanest areas were teat cup rubbers. The use of non-chlorinated water and bucket or pipeline tie-stall milking systems were some of the management practices that can lead to high ATP measures as a result of poor hygienic conditions. Finally, the relationship between the hygienic condition of these surfaces and the BC in bulk tank milk does not explain completely the BC (12%), so the correct functioning of the cooling system is essential to maintain a low BC.

During the HACCP implementation, the presence of some zoonotic pathogens like *Listeria* spp., *Campylobacter* spp. and *Arcobacter* spp. as biological hazards was considered. Chapters 4, 5 and 6 describe the influence of management and farm characteristics in the prevalence of these microorganisms.

In chapter 4, a cross sectional study determined prevalences of *Listeria* spp. in bulk tank milk on dairy farms, and identified management practices associated with the presence of this bacteria, and possible effects on milk hygienic quality. Bulk tank milk samples were obtained from all 98 farms, silage samples from 83 farms, and faeces samples of lactating cows from 97 farms. *L. monocytogenes* was detected in 6.1, 9.3 and 6.0% of these samples respectively. Statistical analyses confirmed the relationship between poor silage quality and the presence of *Listeria* spp. in silage, further presence in faeces and milk. Of management practices potentially increasing the risk of *Listeria* spp. contamination of bulk tank milk, only the milking system and inadequately controlled milking order had statistically significant effects. Finally, the results indicate that the presence of *Listeria* spp. may influence the hygienic quality of bulk tank milk, slightly increasing SSC and BC (although these effects were not statistically significant).

With regard to *Campylobacter* spp. and *Arcobacter* spp., 254 faecal samples of lactating cows were obtained from 89 dairy farms. *Campylobacter* spp. herd prevalence was 36.0% and in 20.5% of dairy cattle faecal samples. *Arcobacter* spp. were isolated in 68.5% of farms and in 41.7% of faecal samples. Using multiplex-polymerase chain reaction, the 148 *Arcobacter* spp. were identified, *A. cryaerophilus* was the species with the highest prevalence and the next was *A. skirrowii*. Several characteristics and aspects of management were studied using a questionnaire, as potential risk factors for the presence of these bacteria, and the relationship was not significant. However, the interpretation of the effect of a given variable on the presence of *Campylobacter* spp. and *Arcobacter* spp. should be based not only on the presence or absence of a statistically significant association, but also on an understanding of this microorganism biology, for instance good chlorinated practices of water would decrease the spreading of these organisms with faeces.