

Desarrollo y evaluación de la performance de un método de medición de adenosín trifosfato (ATP) por bioluminiscencia

Tesis de Maestría en Calidad Industrial

Lic. Laura Carolina Florez

Año 2020

Directora: Mg. Bioq-Farm Judith Paola Molinari

Co-director: Dr. Diego Gabriel Nosedá

Resumen

Los procedimientos de limpieza se consideran fundamentales y son de cumplimiento obligatorio para la industria alimenticia y farmacéutica con el fin de garantizar la seguridad y calidad de los productos. La evaluación de la efectividad de los mismos se realiza por métodos de monitoreo microbiológico de superficie, considerados de referencia, y se basan en el recuento en placa. Estos son confiables, pero demoran días en brindar resultados, por este motivo, se han desarrollado métodos alternativos, como el análisis basado en la determinación de adenosín trifosfato (ATP) por bioluminiscencia. Este método proporciona una respuesta rápida y permite una acción correctiva inmediata durante un proceso industrial. La bioluminiscencia es un fenómeno que consiste en la emisión de luz en el curso de una reacción química, catalizada por la enzima luciferasa, con D-luciferín como sustrato y en presencia de ATP, un intermediario metabólico presente en todos los organismos vivos, indicador de los niveles de higiene en las superficies. En el presente trabajo de tesis, se planteó el desarrollo de un método de cuantificación de ATP por bioluminiscencia con el propósito de diseñar un reactivo con componentes nacionales y de menor costo a los disponibles en el mercado. Se optimizaron la composición del reactivo y los parámetros del proceso de medición y se evaluó la performance del método utilizando una solución comercial de ATP, determinando linealidad, límite de detección, repetitividad e incertidumbre y utilizando dos proveedores de D-luciferín y luciferasa. Además, se determinó el tensioactivo adecuado para la extracción del ATP intracelular y se evaluó el efecto del agregado del mismo sobre la actividad de la enzima luciferasa. Por último, se estableció la correlación del método de bioluminiscencia con el método de recuento en placa para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Cándida albicans*. El método desarrollado resultó tener buena linealidad, repetitividad y límite de detección de 15 fmol de ATP y fue comparable con reactivos comercializados disponibles en el mercado. La utilización de los tensioactivos dodeciltrimetilamonio (DTAB) y ácido tricloroacético (TCA) fue efectiva para la extracción del ATP intracelular, no interfiriendo en la reacción. Finalmente, se determinó que existe una correlación lineal entre el método de recuento en placa y el método de bioluminiscencia, entre las 10^4 UFC/ml y las 10^8 UFC/ml.

Índice

1.	Introducción.....	1
1.1	Limpieza y desinfección en la industria.....	1
1.2	Herramientas para el monitoreo de higiene.....	4
1.3	Bioluminiscencia para el control de la higiene.....	6
1.4	Validación de métodos analíticos.....	12
2.	Hipótesis y Objetivos.....	17
3.	Metodología.....	18
3.1	Reactivos, equipamiento y cepas.....	18
3.2	Desarrollo del método de bioluminiscencia.....	19
3.3	Evaluación de performance.....	21
3.3.1	Linealidad	21
3.3.2	Límite de detección	21
3.3.3	Repetibilidad	22
3.3.4	Incertidumbre.....	22
3.4	Mantenimiento de cepas y cultivos microbianos.....	23
3.5	Método de recuento en placa.....	24
3.6	Elección del tensioactivo.....	25
3.7	Ensayo inhibición de la enzima.....	26
3.8	Relación UFC/ RLU.....	27
4.	Resultados.....	28
4.1	Desarrollo del método.....	28
4.2	Performance con reactivos Sigma.....	28
4.3	Performance con reactivos AAT Bioquest.....	30
4.4	Elección del tensioactivo.....	32
4.5	Ensayo inhibición de la enzima.....	35
4.6	Relación UFC/RLU.....	37
5.	Discusión.....	42
6.	Conclusiones.....	50
7.	Bibliografía.....	51

1. Introducción

1.1 Limpieza y desinfección en la industria

Uno de los factores más importantes que influye directamente en la calidad y seguridad de los alimentos es el entorno en el que son producidos, lo mismo sucede con aquellos productos derivados de la industria farmacéutica o biosanitaria. Es esencial no solo garantizar la inocuidad, sino además cumplir con las exigencias de calidad para satisfacer al cliente y no afectar la vida útil de los productos. Con ese propósito, las industrias establecen procedimientos operativos estandarizados de saneamiento (POES), los cuales son irremplazables dentro de un proceso productivo (Wildbrett G.; 2000). Los POES consisten en un paso de limpieza y otro de desinfección. La limpieza, a menudo conocida también como “limpieza física”, es el procedimiento que se realiza con el fin de eliminar la suciedad que se adhiere a las superficies que pueden deparar protección a los microorganismos y puede servir como fuente de nutrientes. La limpieza puede ser húmeda o seca según las características de los procesos o equipamiento. La desinfección, también llamada “limpieza microbiológica”, es el procedimiento que se realiza con el fin de reducir a niveles admisibles la cantidad de microorganismos que se adhieren y sobreviven a la limpieza física (Sansebastiano G.; 2006). De acuerdo con esta definición puede decirse que básicamente, desinfectar significa reducir el número de microorganismos dañinos utilizando principalmente métodos químicos, como soluciones desinfectantes por ejemplo lavandina, o físicos, como el vapor de agua.

Existen microorganismos que deterioran la calidad de los productos pero no son patógenos, alterando las características organolépticas pero no afectando la salud humana. Otros son patógenos y ocasionan las llamadas enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs). Las ETAs son una prioridad de salud pública ya que cada año una gran cantidad de personas se enferma debido al consumo de alimentos inseguros (Newell y col., 2010; Petruzzelli y col., 2010). Un alto nivel de higiene en el ambiente de trabajo (superficies, equipos y utensilios) es un requisito fundamental para la prevención de contaminaciones microbianas y, por lo tanto, para obtener alimentos inocuos (Osimani y col., 2014). Varios patógenos, como *Staphylococcus aureus*, *Listeria*

monocytogenes, *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* y cepas enteropatógenas de *Escherichia coli* pueden sobrevivir en diferentes superficies durante períodos que van desde varias horas hasta días (Martinon y col., 2012; Siomoes y col., 2010). Muchos microorganismos presentan la capacidad de formar biofilms, los cuales consisten en comunidades microbianas asociadas a superficies atrapadas en una matriz exopolimérica (Davey y col., 2000), donde pueden persistir y sobrevivir a los procedimientos de desinfección. Cada empresa debe optimizar sus procesos teniendo en cuenta que todo proceso de limpieza no controlado aumenta el precio de fabricación y disminuye su calidad y seguridad (Rezquellah W. 2015).

Los POES deben asegurar resultados efectivos y reproducibles, por lo cual, deben estar escritos, documentados y debidamente validados. Los POES se aplican antes, durante y después de las operaciones de elaboración y deben incluir procedimientos de verificación, monitoreo, y especificaciones de límites de alerta y acción. Cada establecimiento debe tener un plan escrito que describa los procedimientos diarios que se llevarán a cabo durante y entre las operaciones, así como las medidas correctivas y la frecuencia con la que se realizarán para prevenir la contaminación directa o adulteración de los productos. La evaluación de la eficiencia de estos métodos es necesaria para la verificación de tales procesos. De hecho, estas prácticas se requieren en todas las normas de seguridad alimentaria (BRC 2014; ISO 2009; TSE 2006) (Öz y Özgen Arun, 2019).

La limpieza es un paso fundamental y obligatorio de cualquier proceso farmacéutico o alimentario que garantiza la calidad de los productos fabricados. El proceso de limpieza reduce los residuos, lo cual no significa que los elimine totalmente, así pues, lo que se busca es disminuir los residuos hasta un límite preestablecido y aceptable. En la industria alimenticia, las mismas compañías deben establecer las especificaciones técnicas para limitar los riesgos y utilizan procesos basados en Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (HACCP), en el cual la efectividad se basa en poder identificar confiablemente los peligros, así como en establecer las medidas de control y el sistema de monitoreo adecuado (Rached y col. 2013). En la industria farmacéutica, las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) de la FDA (Food and Drug Administration), EMEA (Agencia Europea de Medicamentos por sus siglas en inglés) y en nuestro país la ANMAT (Administración Nacional de

Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica) proveen límites específicos para la contaminación microbiana. En este tipo de industrias, las normas vigentes dan recomendaciones sobre límites de control microbiológico ambiental (control de aire y superficies) para áreas de elaboración de productos estériles (Disp. ANMAT 2819/2004). Por lo tanto, determinar los valores de alerta y de acción a partir del comportamiento histórico es útil tanto para áreas donde se elaboran productos no estériles, donde las normas no establecen límites de referencia, como para aquellas utilizadas en la elaboración de productos estériles, en las cuales los límites establecidos pueden resultar menores a los recomendados por las disposiciones vigentes, permitiendo un mayor control microbiológico del ambiente. Los límites de alerta y acción se establecen generalmente como el promedio + 2 o 3 desvíos standard respectivamente.

En el Codex Alimentarius, en el documento denominado *Los Principios Generales de Higiene de los Alimentos (CXC 1-1969-2003)* se indica que los métodos y materiales necesarios para la limpieza depende el tipo de empresa alimentaria. En el mismo apartado se indican las operaciones que debe incluir un procedimiento de limpieza, la necesidad de confeccionar programas de actividades que puedan vigilarse, documentarse y probar su eficacia. También se indica allí la necesidad de realizar la verificación periódica de los sistemas de vigilancia para adaptarlos a posibles cambios de condiciones. La legislación argentina contempla la incorporación de procedimientos específicos para la limpieza y desinfección que garanticen inocuidad en los alimentos. El Código Alimentario Argentino (CAA) indica en varios artículos correspondientes al Capítulo II sobre las necesidades de higiene de los establecimientos, depósitos y comercios como así también de las exigencias que respecto al tema deben ser implementadas por parte de la autoridad sanitaria. Además, incluye dentro de los requisitos para el diseño de instalaciones, la facilidad de la limpieza y desinfección de las superficies en general. La Unión Europea (UE) presenta numerosas directivas que tratan de la higiene de los alimentos o explotaciones relacionadas a la producción de las materias primas alimenticias. Los principios básicos de la política de seguridad alimentaria de la UE están definidos en la legislación alimentaria general, adoptada en 2002 (Reglamento (CE) n° 178/2002 del Parlamento Europeo y del consejo), cuyos

objetivos esenciales son facilitar el libre comercio de alimentos entre los países de la UE y garantizar el mismo alto nivel de protección del consumidor en todos ellos.

En la legislación de FDA del departamento de salud y servicios humanos de EEUU se encuentra el Código para Alimentos y Drogas que rige para todos los alimentos destinados al consumo humano. En la sección I.B.110.B sobre Buenas Prácticas de Manufactura en la elaboración, envasado y manipulación de alimentos con destino a consumo humano menciona que la limpieza y desinfección debe ser conducida de tal manera que proteja de la contaminación a los alimentos, superficies en contacto y los envases. Además, especifica en procesos húmedos la necesidad de limpiar y desinfectar superficies en contacto con alimentos si éstas se hallan contaminadas y plantea la posibilidad de utilizar máquinas de limpieza y desinfección en caso que proporcionen un procedimiento seguro, adecuado y rutinario de las operaciones.

Los organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) o la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) desarrollan programas o publicaciones donde se capacita y trabaja para asegurar la inocuidad de los alimentos. Por ejemplo, la publicación conjunta entre ambos organismos sobre Garantía de Inocuidad y Calidad de Alimentos ofrece a las autoridades de los países la posibilidad de mejorar sus Sistemas de Control de Alimentos. (OMS/FAO, 2003). La FAO en su Código Internacional Recomendado de Prácticas – Principios Generales de Higiene de los Alimentos especifica sobre la necesidad de una limpieza para eliminar los residuos de alimentos y suciedad que impliquen una contaminación, como así también la indicación para que cada industria utilice los materiales y productos químicos adecuados a su actividad.

1.2 Herramientas para el monitoreo de higiene

La evaluación de la efectividad de los POES se realiza en las industrias por métodos tradicionales de monitoreo microbiológico de superficie por recuento en placa. Aunque estos métodos son fiables y son tomados como “gold standard” los tiempos de análisis los hacen imprácticos para una verificación de rutina (Jasson y col., 2010). Es por este motivo, que se han desarrollado métodos alternativos más rápidos

como inmunocromatografía, epifluorescencia (DEFT), turbidimetría, enzimoimmunoensayos (ELISA), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y determinación de adenosín trifosfato (ATP) por bioluminiscencia.

El monitoreo de superficies ha sido tradicionalmente realizado mediante pruebas de microbiología en las que se utilizan comúnmente hisopos, esponjas o placas de contacto para la toma de muestras. Con los recuentos de microorganismos se determina la población microbiana viable y capaz de multiplicarse en medio sólido formando colonias. La generación de las mismas se fundamenta en que un microorganismo aislado forma una colonia, pero se debe tener en cuenta que no siempre se encuentran aislados durante el crecimiento, por ello, una colonia puede provenir de uno o más microorganismos. En base a este criterio, los recuentos en medios sólidos se expresan como Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml).

Estas pruebas únicamente proveen información respecto a la carga de microorganismos presentes en una superficie, teniendo como mayor limitante los tiempos de respuesta, ya que se requieren períodos de incubación que varían de 24 a 72 horas, para obtener resultados sobre la higiene de las superficies. Esto resulta poco conveniente al momento de tener que adoptar acciones correctivas. Otra desventaja de los métodos microbiológicos tradicionales es que no proveen información respecto a la presencia de residuos de alimentos en las superficies, que pudieran servir de nutrientes y permitir a los microorganismos dañados o estresados recuperarse y formar biofilms. Además, estas pruebas requieren llevarse a cabo dentro del laboratorio por personal entrenado, lo que también representa una desventaja.

Los sistemas de calidad requieren herramientas para monitorear la higiene de las superficies con resultados rápidos que permitan tomar acciones correctivas en tiempo real. La tecnología de bioluminiscencia ha tenido grandes avances en la última década y ha sido cada vez más adoptada como herramienta para la verificación de higiene, así como para la eficacia de los procedimientos de limpieza, puesto que puede utilizarse durante el procesamiento de alimentos. Otro de los beneficios de esta alternativa es poder optimizar los programas de limpieza, disminuyendo así los costos, al hacer eficiente el uso de detergentes y sanitizantes, así como de la mano de obra. El uso de tales kits puede estar directamente relacionado con la adopción dentro de la

industria alimentaria del concepto de HACCP, el cual sirve para implementar sistemáticamente medidas para garantizar la producción de alimentos en los que todas las formas de contaminantes potenciales se hayan reducido a niveles aceptables. El atractivo de HACCP radica en su énfasis en la prevención de la contaminación de los alimentos, y se centra en el hecho que cualquier operación del procesamiento de alimentos estará asociada a uno o más pasos en los que se pueda ejercer el control, es decir, puntos en los que se puede aplicar una intervención, prevenir o eliminar un peligro para la seguridad alimentaria o reducirlo a un nivel aceptable. Dichos pasos se conocen como puntos críticos de control (PCC).

En términos generales, la tecnología de la bioluminiscencia permite medir la efectividad de las acciones correctivas, además de permitir al área de calidad llevar a cabo un estricto control de los estándares de limpieza, que incluyen: identificar áreas problemáticas en donde continuamente los niveles de limpieza se encuentran fuera de los límites permitidos, llevando a cabo una verificación de la efectividad del sistema; verificar si existen mejoras en los procesos de limpieza/sanitización implementados; reducir los costos de limpieza (material y mano de obra) sin comprometer la efectividad; analizar los datos de acuerdo a necesidades específicas.

Sin embargo, las pruebas de bioluminiscencia no han sido desarrolladas para reemplazar las pruebas de microbiología tradicional, sino que son una herramienta complementaria que permite hacer eficientes los procesos de limpieza y sanitización, garantizando un monitoreo efectivo cuando se han implementado sistemas de calidad. Estas herramientas han sido adoptadas por la mayoría de las empresas líderes, por lo que es importante contar con información adecuada sobre los parámetros más importantes que deben tomarse en cuenta durante la selección de equipos que serán utilizados para monitorear uno de los aspectos clave en el control de la calidad.

1.3 Bioluminiscencia para el control de la higiene

El ATP es un intermediario del metabolismo de todo organismo vivo (Figura 1). Independientemente de la fuente que provenga, ya sea de oxidación química o por la captura de luz, la energía es transformada por las células vivas en ATP. Es en esta forma que las células consumen la energía para todos los procesos que la requieren,

incluyendo biosíntesis, movilidad y funciones de mantenimiento; además de ser precursor directo en la síntesis de ácido ribonucleico (ARN). El ATP es rápidamente regenerado principalmente por la vía glucolítica y por la fosforilación oxidativa y su presencia en las células hace que su detección sea asociada a la presencia de organismos vivos (Shama y Malik, 2013). El ATP puede detectarse por diversos métodos como por ejemplo cromatografía líquida de alta performance (HPLC). Sin embargo, en este trabajo nos centraremos únicamente en un método de detección de ATP en particular: bioluminiscencia basada en la reacción de la enzima luciferasa con su sustrato D-luciferín.

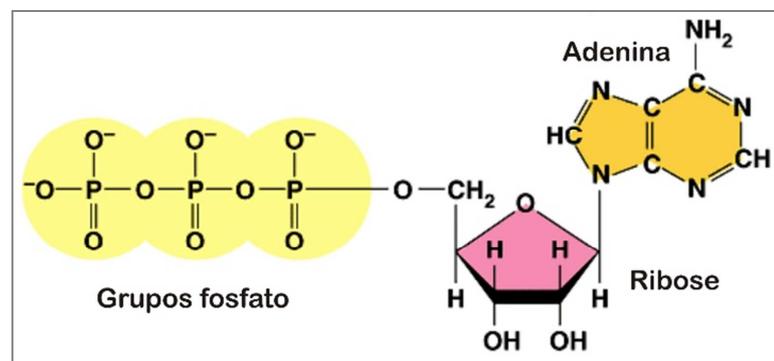


Figura 1. Estructura del adenosín trifosfato (ATP). El ATP está conformado por una base nitrogenada (adenina) unida al carbono 1 de un azúcar de tipo pentosa (ribosa), que en su carbono 5 tiene enlazados tres grupos fosfato.

Luciferasa es un término comúnmente utilizado para describir enzimas capaces de catalizar la emisión de luz. Se han aislado enzimas generadoras de luz a partir de determinadas bacterias, protozoarios, celentéreos, moluscos, peces, miriápodos, moscas, hongos, gusanos y crustáceos. En particular, las enzimas aisladas a partir de las luciérnagas del género *Photinus*, *Photuris* y *Luciola* son las que se han aplicado en gran cantidad de procesos. La luciferasa utilizada en los métodos de determinación de ATP es generalmente extraída de la luciérnaga *Photinus pyralis*.

La luciferasa es una proteína de 62 kDa con aproximadamente 550 aminoácidos (Promega, 2009). Los estudios estructurales han demostrado que está formada por 2 dominios: un gran dominio N-terminal y un pequeño dominio C-terminal unido por un péptido flexible (Conti y col., 1996). En la Figura 2 se observa su estructura, la enzima existe en una "forma abierta" (a) y en una "forma cerrada" (b) (Nakatsu y col., 2006). Cuando el sustrato (D-luciferín) de la enzima se une al bolsillo hidrofóbico del dominio

N-terminal, el dominio C-terminal se acerca conformando el sitio activo de la enzima responsable de la emisión de luz (Branchini y col., 2000; Thompson y col., 1997; Zako y col., 2003).

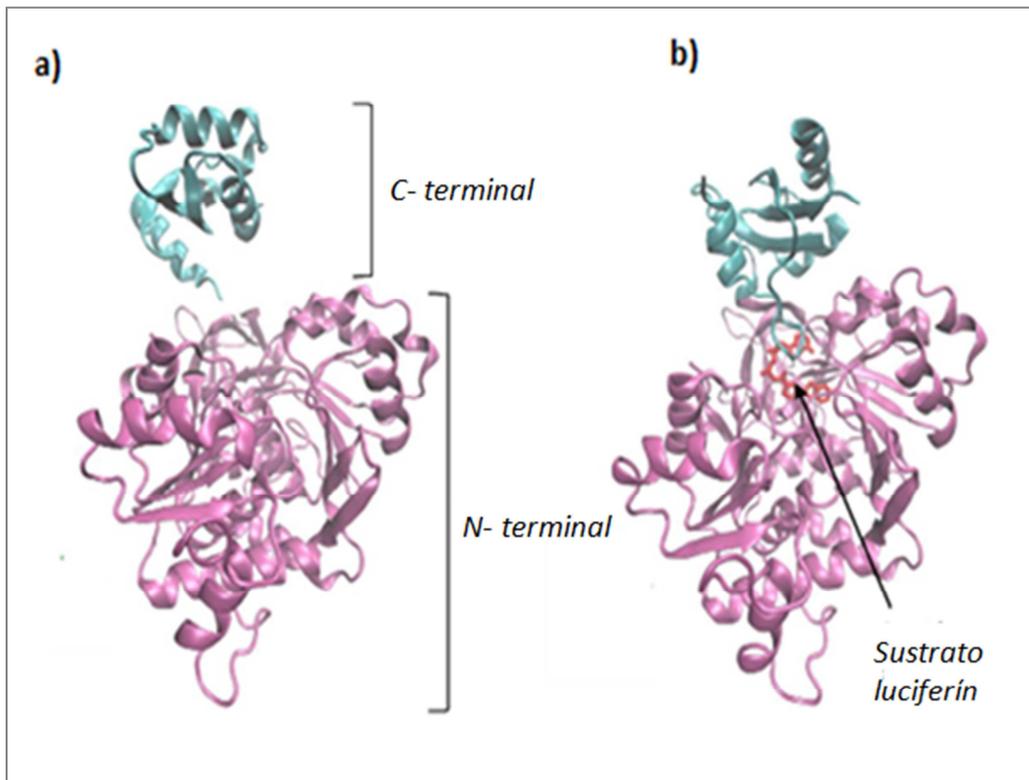


Figura 2. Estructura de la molécula de luciferasa. a) La enzima está compuesta por un gran dominio N-terminal y un pequeño C-terminal. b) El sitio activo se genera luego del cambio conformacional en el lugar donde se une el sustrato (D-luciferina).

La enzima luciferasa cataliza reacciones de óxido- reducción en presencia de ATP y magnesio en las que el cambio de energía libre excita una molécula de sustrato hasta un estado de alta energía. Cuando la molécula excitada vuelve al estado basal, se emite luz visible, es decir “bioluminiscencia” o “luminiscencia”. La bioluminiscencia es un fenómeno que consiste en la emisión de luz por parte de organismos vivientes como las bacterias o los insectos (luciérnagas), es una forma de quimioluminiscencia, o emisión de luz en el curso de una reacción química. Dos tipos de emisiones de luz se describen para la reacción de D-luciferina/luciferasa. La típica emisión de luz amarilla-verde de alta energía con pico en 562 nm a pH 7,5 y la emisión de luz roja con pico en 620 nm cuando el pH baja a 5 (Seliger y col., 1964; Seliger y McElroy, 1964). Este

sorprendente fenómeno en el cual la luciferasa es capaz de emitir luz de diferentes colores no está claramente definido (Branchini y col., 2005).

La aplicación del sistema se fundamenta en la alta especificidad de la luciferasa de las luciérnagas por el ATP y la D-luciferín. En un informe sobre el desarrollo de la investigación sobre bioluminiscencia, Fraga (2008) señala que, si bien el tema había sido objeto de investigaciones científicas desde 1885, fue McElroy en 1947 quien describe la reacción de bioluminiscencia del sistema luciferín/luciferasa y demuestra el rol del ATP como factor determinante en la emisión de luz (Mc Elroy, 1947), el mismo demuestra que la luz emitida durante la reacción es directamente proporcional a la cantidad de ATP agregada. En presencia de oxígeno e iones magnesio, la D-luciferín es convertida en D-oxiluciferín y el ATP es convertido en adenosín monofosfato (AMP), liberando un fosfato y emitiendo luz como consecuencia de una rápida pérdida de energía de la molécula de un estado excitado a uno estable (Figura 3). El rendimiento de la reacción, entendido como fotones emitidos en función del número de moléculas de ATP transformadas, es de aproximadamente 100 % (Ilyiná y col., 1998).

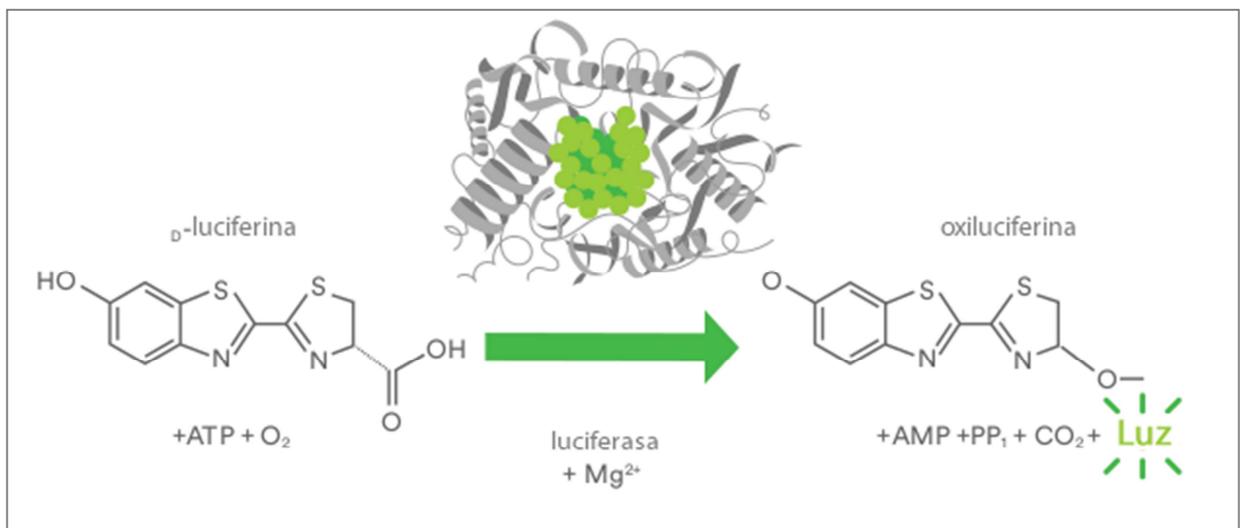


Figura 3. Reacción de bioluminiscencia del ATP. En presencia de oxígeno e iones magnesio, la enzima luciferasa convierte la D-luciferín en D-oxiluciferín y el ATP en adenosín monofosfato (AMP), liberando un fosfato y emitiendo luz.

Para mediados de la década de 1960, esta reacción se estaba explotando para detectar niveles bajos de ATP inicialmente con contadores de centelleo (Addanki y col., 1966) y luego utilizando tubos fotomultiplicadores (Van Dykey col., 1969). Desde

entonces, todos los reactivos están disponibles comercialmente en forma de kit listos para usar junto con luminómetros portátiles para la determinación rápida de ATP en superficies sólidas. En prácticamente todos los kits comerciales, la determinación de ATP se realiza por hisopado de las superficies a evaluar.

Este método alternativo ha ganado un campo de aplicación significativo para el monitoreo de superficies en las industrias alimentaria, farmacéutica, hospitales, cocinas de comedores, etcétera, y se ha demostrado que los niveles de ATP detectados se correlacionan bien con los niveles de higiene (Larson y col., 2003) (Figura 4). Un área determinada es muestreada con hisopos humedecidos con agentes tensioactivos que interactúan con las membranas de los microorganismos, permeabilizándolas y liberando el ATP de su interior. El hisopo, luego, es sumergido en un tubo con una solución conteniendo los sustratos para la reacción donde se libera el ATP. Este tubo se coloca en un dispositivo llamado luminómetro, que puede ser pequeño y portátil, y la lectura se expresa en Unidades Relativas de Luz (RLU). Esta unidad no está estandarizada, por lo que depende del equipo de bioluminiscencia que se utilice. Con este método es posible controlar el nivel de contaminación microbiana de superficies en minutos y, por lo tanto, ofrece la posibilidad de iniciar rápidamente las acciones correctivas si se detecta una no conformidad (Öz y Özgen Arun, 2019).

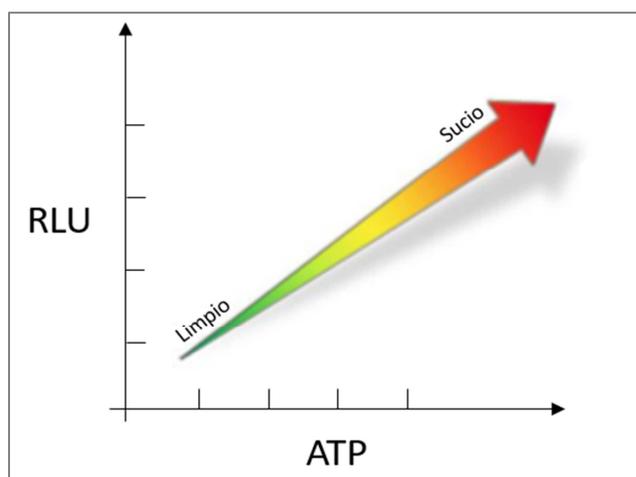


Figura 4. Relación entre la señal de RLU y niveles de ATP. Las señales de RLU reflejan los niveles de ATP relacionados con la higiene de las superficies controladas.

Algunas consideraciones que deben tomarse en cuenta durante la realización de estas pruebas son las condiciones óptimas de desempeño, que incluyen:

temperatura 18-22°C y pH 7-7,5. Una inhibición en la reacción o señales de luz más bajas pueden producirse a diferentes concentraciones de detergentes ácidos o alcalinos, colorantes y cloro, por lo tanto, resulta fundamental cumplir con las condiciones de desempeño adecuadas para evitar afectar los resultados de las pruebas. Las pruebas son objetivas, fáciles de usar y proveen resultados claros de aceptación o rechazo, sin requerir de personal especializado o de un laboratorio.

El análisis basado en la bioluminiscencia de ATP se ha adoptado ampliamente durante las últimas décadas para la evaluación de riesgos y el monitoreo de la limpieza de la superficie. Sin embargo, este método no sólo detecta las moléculas de ATP provenientes del metabolismo de los microorganismos sino también las generadas a partir de residuos orgánicos como los restos de alimentos o suciedad. Esto explica la disparidad de los resultados reportados cuando se comparan con el recuento de microorganismos viables en diferentes superficies con distintas cantidades de residuos. Algunos estudios muestran una correlación positiva entre el método de bioluminiscencia y los métodos microbiológicos (Leon y Ambrecht, 2007), mientras que otros demuestran diferencias significativas (Raia y col., 2018). Por este motivo, es necesario determinar la correlación de los métodos para cada caso particular en función de las superficies, líneas de producción, procedimientos de limpieza aplicados, entre otros.

Los sistemas de bioluminiscencia pueden variar considerablemente entre los diferentes proveedores de los kit de determinación de ATP, por lo que deben tomarse en cuenta parámetros como el límite de detección, el cual debe poder garantizar resultados con niveles de contaminación bajos, y la repetibilidad del método, evitando dispersión de resultados cuando la prueba es realizada por diferentes técnicos u operarios. Algunas características están relacionadas con el equipo, otras con la química de los reactivos o el material de los hisopos, por lo que es importante tener en consideración dichos parámetros en la selección de los proveedores. Todos los alimentos, ya sean de origen animal o vegetal, contienen ATP, y el ATP microbiano en general representa solamente una fracción relativamente menor del total de ATP que estará presente en una superficie particular en un ambiente de procesamiento de alimentos (Lundin, 2000). Por lo tanto, las mediciones de ATP en las superficies muestreadas después de aplicar los POES proporcionan una evaluación de los niveles

generales de contaminación orgánica de la superficie. Dichas mediciones proporcionan una indicación de la calidad de la limpieza, pero no deben interpretarse como un indicador directo de contaminación microbiana de la superficie.

Los kits disponibles para la industria en la actualidad son importados y de un elevado costo, comercializados por distribuidores en el país. Por lo tanto, la presente tesis propone desarrollar un método de determinación de ATP por bioluminiscencia, evaluar su performance y su correlación con el método de referencia de recuento en placa con distintos microorganismos, con el fin de obtener un sistema de análisis nacional con un menor costo que los existentes importados.

1.4 Validación de métodos analíticos

Según la norma ISO 9000:2015 la validación consiste en la confirmación por medio de exámenes y provisión de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto. Según la USP capítulo general 1225, “la validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas”. En la norma ISO/IEC 17025, se indica que el laboratorio debe validar métodos no normalizados; métodos diseñados o desarrollados por el laboratorio; métodos normalizados usados fuera de su ámbito de aplicación o ampliaciones o modificaciones de métodos normalizados. La validación debe ser tan amplia como sea necesaria para cumplir con los requisitos en relación con el uso dado o la aplicación (INAB Guide, 2012). La extensión o alcance de la validación dependerá de la aplicación, la naturaleza de los cambios realizados y de las circunstancias en que el método se va a utilizar. También debe validarse cuando es necesario demostrar la equivalencia de los resultados obtenidos por dos métodos, por ejemplo, un método recientemente desarrollado y un método normalizados existente.

La validación de un método de ensayo consiste en un estudio sistemático que permite conocer si las características técnicas del mismo cumplen las especificaciones relativas al uso previsto. Examina las características de desempeño del método para identificar y establecer cualquier limitación que pueda esperarse cuando se aplique. Las características de desempeño evaluadas habitualmente durante la validación de un

método son linealidad, selectividad, límite de detección, límite de cuantificación, sensibilidad analítica, veracidad (sesgo, recuperación), precisión (repetibilidad y reproducibilidad) e incertidumbre de medida. En sentido estricto, la incertidumbre de medida no es una característica del desempeño de un procedimiento de medida particular, pero sí de los resultados obtenidos al usar dicho procedimiento. La validación demuestra que los cálculos y condiciones de medición incluyen todos los factores que pueden afectar significativamente los resultados. La validación de un método será poco exhaustiva, limitándola a la comprobación del cumplimiento de las características especificadas en aquellos métodos que se consideran de referencia, y mucho más completa y exhaustiva en las nuevas metodologías analíticas, en cuyo caso, si es posible la validación debe basarse en normas reconocidas.

Existen algunas normas ISO para la validación de métodos microbiológicos, como es el caso de la ISO 16140:2016 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Protocolo de validación de métodos alternativos”, sin embargo, no hay normas disponibles para la validación de ensayos fisicoquímicos alternativos, aunque sí guías ampliamente reconocidas con protocolos para la validación de métodos de ensayo, y que sirven de referencia a las entidades que acreditan el cumplimiento de la ISO/IEC 17025:2017 como son por ejemplo la guía Eurachem (“The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics”), o el documento del CODEX “Guidelines on Establishing methods criteria for the identification of relevant analytical methods”. Existen diversos componentes a tener en cuenta en el análisis de la calidad de los datos analíticos, estos son la calibración, utilizando materiales de referencia, la calificación de los instrumentos analíticos, las pruebas de aptitud del sistema y la validación de los métodos analíticos.

Entre las características analíticas típicas existentes en una validación, es importante decidir cuáles son las características de desempeño que deben ser investigadas para validar el método y, en algunos casos, el grado de detalle para una característica particular. El protocolo de la IUPAC (IUPAC Technical Report, 2002) enumera una serie de situaciones, que tienen en cuenta, entre otras cosas, el estado del método y la competencia técnica del laboratorio.

Linealidad

Es la proporcionalidad, ya sea directa o por medio de una transformación matemática bien definida, entre la concentración del analito y su respuesta. Es la capacidad del método analítico para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración o cantidad del analito en un intervalo definido. Se determina mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos en el análisis del analito a diferentes cantidades o concentraciones. La selección del rango y del número de puntos experimentales está estrictamente relacionada con la aplicación del método.

Límite de detección (LD)

Es la mínima cantidad de analito que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones experimentales establecidas. Indica la concentración más baja que un sensor puede discernir y se deriva de las relaciones de señal/ruido. El ruido puede surgir de sustancias interferentes, deriva del sensor o interferencia de la matriz de la muestra. Mejorar los límites de detección requiere amplificar la señal específica, derivada del analito de interés o suprimir o disminuir la señal inespecífica, ruido.

Límite de cuantificación (LQ)

Es la cantidad o concentración mínima de analito que se puede detectar cuantitativamente en una muestra para análisis con un nivel aceptable de precisión y exactitud, el nivel más bajo en el cual el desempeño es aceptable para una aplicación típica. Es la concentración más baja del analito que puede ser detectada por el método a un nivel de confianza especificado.

Rango

Es el intervalo entre la concentración más alta y más baja de analito que se pueden detectar con el apropiado valor de exactitud, precisión y linealidad (incertidumbre aceptable), dentro de los cuales se puede cuantificar el analito de interés por interpolación en una curva de calibración con un solo estándar. Las señales

fuera del mismo pueden ser imprecisas. El extremo inferior del intervalo de trabajo está determinado por el LOQ y el extremo superior por las concentraciones a las cuales se observan anomalías significativas en la sensibilidad analítica.

Sensibilidad

Es la capacidad de un método de discriminar entre concentraciones semejantes de analito, es una medida de la intensidad con la que cambia la señal en respuesta a los cambios en la concentración de analito. La sensibilidad se calcula como la pendiente de una curva de calibración.

Selectividad

La selectividad es el grado en el cual un método puede determinar un analito particular en una matriz, sin interferencia de otros componentes de degradación, componentes de la matriz o especies estructuralmente relacionadas.

Exactitud

La exactitud de medición expresa la proximidad de un único resultado a un valor de referencia. La validación de métodos trata de investigar la exactitud de los resultados evaluando los efectos sistemáticos y aleatorios sobre resultados individuales. Es la proximidad de la media de un número infinito de resultados producidos con el método a un valor de referencia: puesto que no es posible realizar un número infinito de mediciones, no se puede medir la veracidad. Sin embargo, podemos realizar una evaluación práctica, por lo general, expresada cuantitativamente en términos de 'sesgo'. Una determinación práctica del sesgo se basa en la comparación de la media de los resultados (\bar{x}) del método candidato con un valor de referencia adecuado (ref x).

Precisión

Es una medida de cuán cerca están los resultados entre sí. La precisión de un procedimiento analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a múltiples

muestreos de una muestra homogénea. Se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación). La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o de la repetibilidad del procedimiento analítico. La reproducibilidad se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios, como en un estudio de colaboración. La precisión intermedia expresa la variación dentro del laboratorio, como en días diferentes, o con diferentes analistas o equipos dentro del mismo laboratorio. La repetibilidad se refiere al uso del procedimiento analítico dentro de un laboratorio durante un corto período de tiempo utilizando por el mismo analista con el mismo equipo.

Incertidumbre

Es un intervalo asociado con un resultado de medida que expresa el rango de valores que razonablemente pueden atribuirse a la cantidad que se está midiendo, indicador de la calidad de una medición. Una estimación de la incertidumbre debe tener en cuenta todos los efectos reconocidos que operan en el resultado. Las incertidumbres asociadas con cada efecto se combinan de acuerdo con procedimientos bien establecidos.

Para que un resultado analítico sea apto para su uso implica que éste debe ser lo suficientemente fiable para que cualquier decisión basada en él, pueda ser tomada con confianza. Debe validarse el desempeño de un método y estimar la incertidumbre del resultado, para un determinado nivel de confianza. La incertidumbre se debe evaluar y citar de tal manera que sea ampliamente reconocida, internamente consistente y fácil de interpretar.

En el presente trabajo de tesis se propone el desarrollo de un método alternativo rápido de evaluación de higiene de superficies basado en la cuantificación de ATP por bioluminiscencia. Se plantea el diseño de un kit de producción nacional y de menor costo que los existentes en el mercado, la optimización y evaluación de desempeño con respecto a estos y al método de referencia de recuento en placa.

2. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

Existe una correlación significativa entre el método de determinación de ATP por bioluminiscencia y el método de referencia de recuento en placa de microorganismos.

Objetivo General

Desarrollar un método rápido de control de higiene de superficies mediante la de determinación de ATP por bioluminiscencia y evaluar su performance sobre matrices microbiológicas.

Objetivos Particulares

- ✓ Optimizar las condiciones de medición para la detección de ATP por bioluminiscencia y evaluar las características de desempeño del método con soluciones comerciales de ATP de concentración conocida, ensayando dos marcas de reactivos disponibles.
- ✓ Determinar el tensioactivo adecuado para la liberación del ATP intracelular y el % de extracción. Evaluar su efecto sobre la actividad de la enzima luciferasa y las características de desempeño del método con soluciones comerciales de ATP de concentración conocida con el tensioactivo seleccionado.
- ✓ Correlacionar el método de determinación de ATP por bioluminiscencia con el método de recuento en placa para tres microorganismos diferentes.

3. Metodología

3.1 Reactivos, equipamiento y cepas

Para el desarrollo del trabajo se utilizaron reactivos y materiales generales de laboratorio. Entre los específicos, los más relevantes son D-luciferín (Sigma® ≥98% /AAT Bioquest® >95%), luciferasa (Sigma® ≥98% /AAT Bioquest® >98%), adenosín trifosfato -ATP- (Sigma® ≥99%), ditioneitol -DTT- (Sigma® ≥97%), caldo tripton-soja -TSB-y agar tripton-soja -TSA-(Biokar®), cloruro de benzalconio-CIBz- (Plusquímica S.A., 80 %), ácido tricloroacético -TCA- (Biopack® ≥99%), bromuro de dodeciltrimetilamonio -DTAB- (Sigma® ≥98%), luminómetro (Hygiene SystemSure plus), espectrofotómetro (Shimadzu UV-1800) y estufa de cultivo (FAC- Fábrica de Aparatos Científicos). Además, se utilizaron tres cepas diferentes de microorganismos: *Escherichia coli* ATCC 25922, una enterobacteria gramnegativa, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, bacteria grampositiva y *Candida albicans*, una levadura. La levadura fue procedente del cepario del Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, UBA, y las bacterias del cepario del laboratorio de la empresa. Los reactivos fueron suministrados por una empresa nacional interesada en la producción del sistema. Es importante aclarar que se debió trabajar en todo momento bajo rigurosas condiciones de esterilidad con el fin de no introducir errores en las mediciones.

En la Figura 5 se puede observar un esquema general de la metodología ejecutada, en primer lugar, se procedió al desarrollo del método de cuantificación de ATP por bioluminiscencia, luego se seleccionó el tensioactivo adecuado para la extracción del ATP y por último se realizó la correlación con el método de recuento en placa con tres microorganismos.

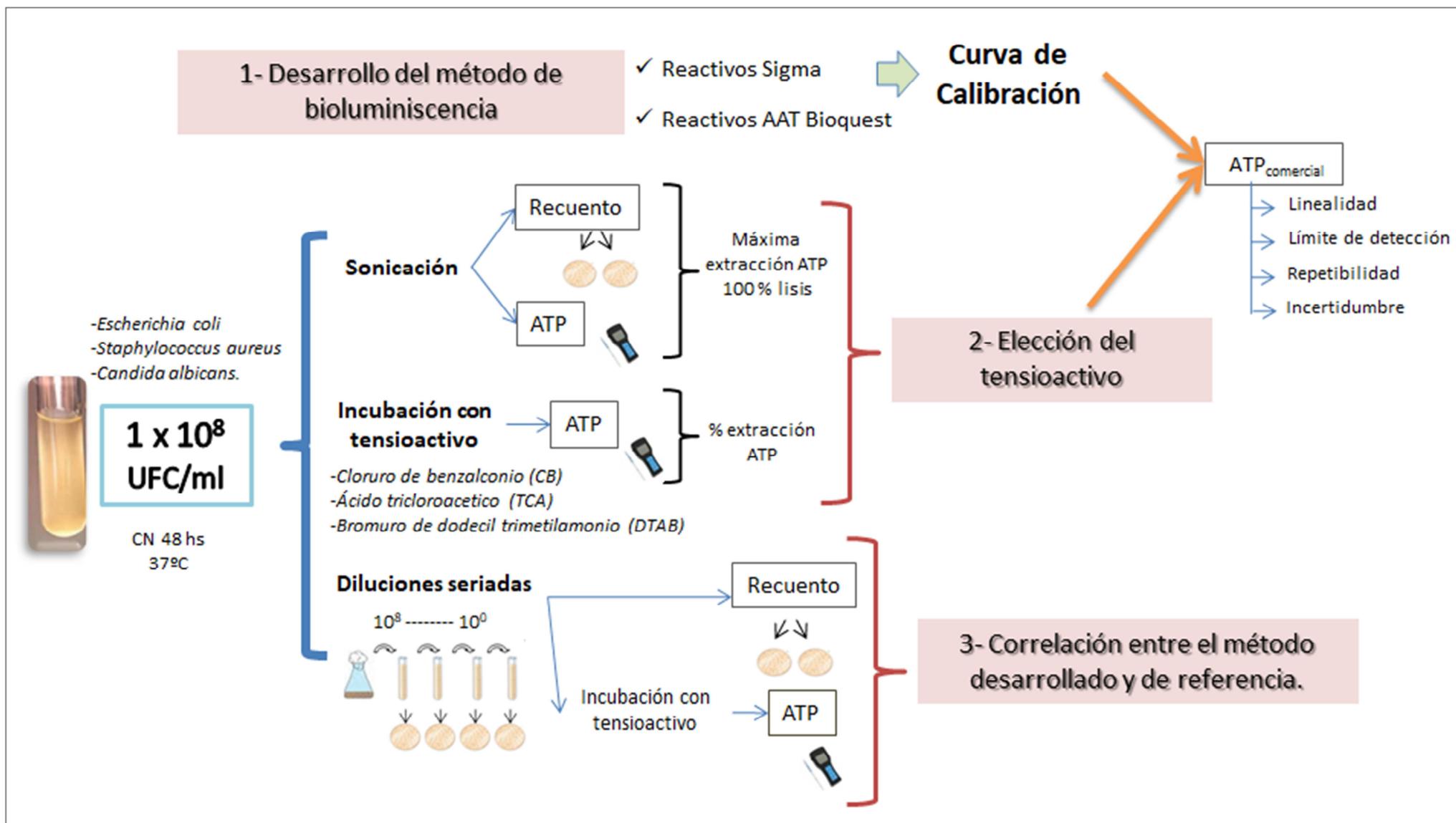


Figura 5. Esquema metodológica. Se esquematizan los pasos a seguir para cumplir con los objetivos de la tesis.

3.2 Desarrollo del método de bioluminiscencia

Se desarrolló un procedimiento para la cuantificación rápida de ATP por bioluminiscencia. El trabajo consistió en:

- ✓ Puesta a punto del procedimiento de acondicionamiento de materiales.
- ✓ Desarrollo de la solución de reacción.
- ✓ Optimización de las concentraciones de D-luciferín y luciferasa.
- ✓ Optimización de las condiciones y proceso de medición.

El ensayo se esquematiza en la Figura 6, la determinación de la bioluminiscencia consistió en: a) adición de la muestra en un tubo estéril conteniendo la solución de reacción, b) homogeneización por movimiento pendular, c) colocación del tubo en el luminómetro y d) medición de las RLU (Leach, 1981; Lundin y Thorne, 1975; Promega Technical Bulletin; Invitrogen Product Information). La mínima lectura del luminómetro utilizado es 1 RLU y la máxima 9999 RLU, sin otorgar unidades decimales.

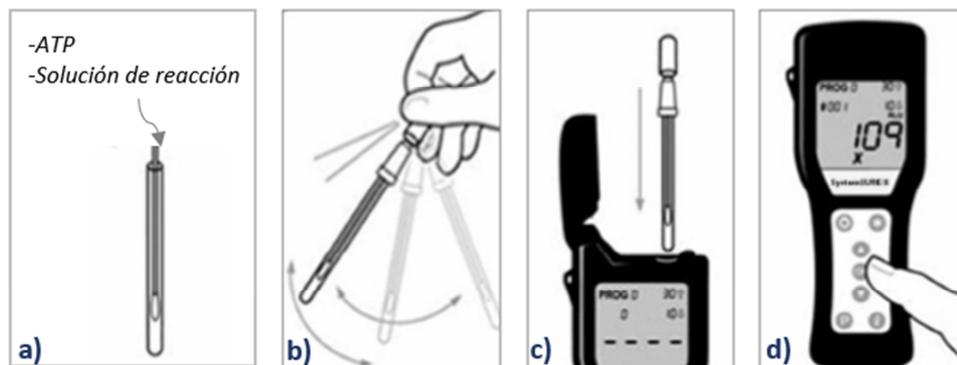


Figura 6. Esquema del procedimiento de medición. Se muestran los cuatro pasos principales: a) agregado de los componentes de reacción, b) homogeneización, c) introducción del tubo en el equipo, y d) medición.

Durante el desarrollo, se ensayaron varias concentraciones de reactivos y se midieron soluciones de ATP comercial desde 0 a 100000 fmol. Las soluciones de ATP se realizaron a partir de una solución stock por medio de diluciones seriadas con agua destilada estéril (Figura 7). Fue seleccionada la condición con la cual se obtuvo un valor de background de 0 RLU y una buena sensibilidad al graficar los valores de RLU en función de las concentraciones de ATP.

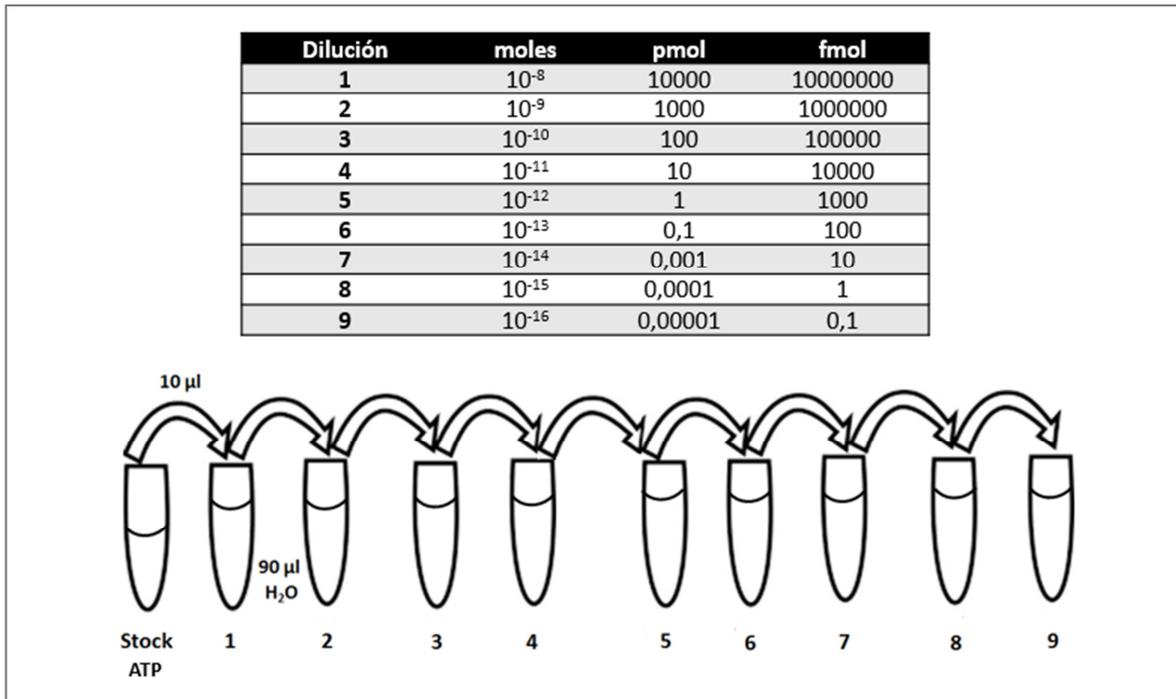


Figura 7. Diluciones de ATP comercial. Se realizaron diluciones seriadas a partir de una solución stock, siguiendo la tabla.

El procedimiento consistió en:

- ❖ Colocar 500 µl de la solución de reacción en un tubo de plástico específico para el luminómetro (volumen correspondiente al kit del instrumento).
- ❖ Medir la luminiscencia background (B).
- ❖ Agregar 10 µl de las diluciones de ATP y homogeneizar.
- ❖ Medir la luminiscencia (M).
- ❖ Restar la luminiscencia background (B).

Una vez desarrollado el método, y a pedido de la empresa en cuestión, se realizó un ajuste de los parámetros del método analítico utilizando otro proveedor de reactivos con el fin de disminuir los costos de producción. Los componentes que se modificaron fueron la enzima luciferasa y el sustrato D-luciferín. Con este fin y teniendo como referencia lo desarrollado previamente, se ensayaron nuevamente varias soluciones con distintas concentraciones de reactivos y se midieron cantidades de ATP desde 0 a 100000 fmol. Se seleccionó aquella con la cual se obtuvo un valor de background de 0 RLU y una mejor proporcionalidad entre las concentraciones de ATP y los valores de RLU. Los resultados obtenidos en esta segunda etapa del desarrollo

fueron los que se tomaron como punto de partida para las siguientes etapas del trabajo, y la solución establecida fue la utilizada para las siguientes determinaciones de ATP por bioluminiscencia.

3.3 Evaluación de performance

Para el análisis del sistema de medición utilizando soluciones comerciales de ATP de concentración conocida, se evaluaron los criterios de linealidad, límite de detección (LD), repetibilidad e incertidumbre (De Luca y McElroy, 1974).

3.3.1 Linealidad

Para la evaluación de este parámetro, se tomaron 4 concentraciones de ATP entre 1 y 1000 fmol en el caso de los reactivos Sigma® y entre 10 y 100000 fmol en el caso de los reactivos AAT Bioquest®, rangos establecidos durante el desarrollo del método. Se midieron ocho replicados de cada concentración y se graficaron las RLU en función de la cantidad de ATP.

El método más simple para el ajuste de una recta a un conjunto de pares de datos experimentales es la regresión lineal, también conocido como el de mínimos cuadrados lineales, en el cual se hace una minimización de la suma cuadrática de las distancias verticales entre los datos experimentales y la recta por ajustar, considerando como variables a la pendiente b y la ordenada al origen a (Modelo de regresión $y = a + bx$). En este caso, los parámetros de la recta se calcularon por cuadrados mínimos con una planilla Excel, así como la linealidad, que se evaluó a partir del coeficiente de correlación (r^2), el cual determina la calidad del modelo para replicar los resultados, y la proporción de variación de los resultados que puede explicarse por el modelo.

3.3.2 Límite de detección

El LD es la menor cantidad de un analito cuya señal puede ser distinguida de la del ruido. Debido a que las lecturas del blanco dieron un valor de 0 RLU en todos los casos, para poder determinar el límite de detección se utilizó la menor lectura del

luminómetro y la pendiente de la curva para el cálculo (Leclaire, 2011 - Higiene), a partir de la siguiente fórmula:

$$LD = \frac{\text{menor lectura del equipo}}{\text{pendiente}}$$

3.3.3 Repetibilidad

La repetibilidad se refiere a la posibilidad de obtener resultados consistentes al replicar un estudio siguiendo el mismo diseño experimental. Fue evaluada a partir del coeficiente de variación porcentual (CV%) de la medición de 4 niveles de concentración en tres ensayos independientes por duplicado. El mismo expresa la desviación estándar como porcentaje de la media aritmética:

$$CV\% = \frac{S}{\bar{x}} 100$$

3.3.4 Incertidumbre

Según la definición de la Guía para la Expresión de la Incertidumbre de Medida (GUM), la incertidumbre es un parámetro, asociado con el resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mesurando. En sentido estricto, no es una característica del desempeño del procedimiento de medida particular, pero sí de los resultados obtenidos al usar dicho procedimiento.

En este trabajo de tesis, se verificó la calidad del ajuste de la curva de calibración de la medida de ATP realizando un análisis de los residuos (desviación estándar residual $-S_{res}$), lo cual ofrece una medida de variabilidad de los datos y da idea del nivel de confianza respecto de las predicciones de la línea de regresión. Con los resultados (RLU) de una misma muestra de ATP medida por sextuplicado se calculó la incertidumbre estándar de la misma (S_{y_m}). La muestra se preparó realizando una dilución 1/1000 de la solución stock de ATP para el caso de AAT Bioquest® y DTAB/TCA, y de 1/100000 para el método con los reactivos Sigma®. Estas diluciones son cercanas a la mitad de la curva de calibración.

Luego, teniendo en cuenta tanto la desviación estándar residual como la desviación estándar de la muestra, se calculó la incertidumbre combinada de la muestra [$\mu(x_m)$]. Por último, se calculó la incertidumbre expandida para un 95 % de confianza ($U_{k=2}$) y se expresó el resultado como un intervalo de confianza. En la Figura 8 se muestran los parámetros y fórmulas que se utilizaron, dichos cálculos fueron realizados utilizando una planilla Excel (“Incertidumbre en regresión lineal” Inti Química F.10.2 ed.3). Para este modelo, se consideró que los aportes de la preparación de los reactivos fueron despreciables, es decir que los aportes de las fuentes de incertidumbre asociadas al eje x (como la incertidumbre de pesada y del material volumétrico) se consideraron insignificantes comparadas con las correspondientes a la respuesta del instrumento correspondientes a los replicados de la muestra (eje y). Es por ello que únicamente se tuvieron en cuenta la variabilidad de las mediciones de la muestra y de la regresión lineal (Sáez Ruiz y Avila, 2001; Miranda, 2000; Montgomery y col., 2001).

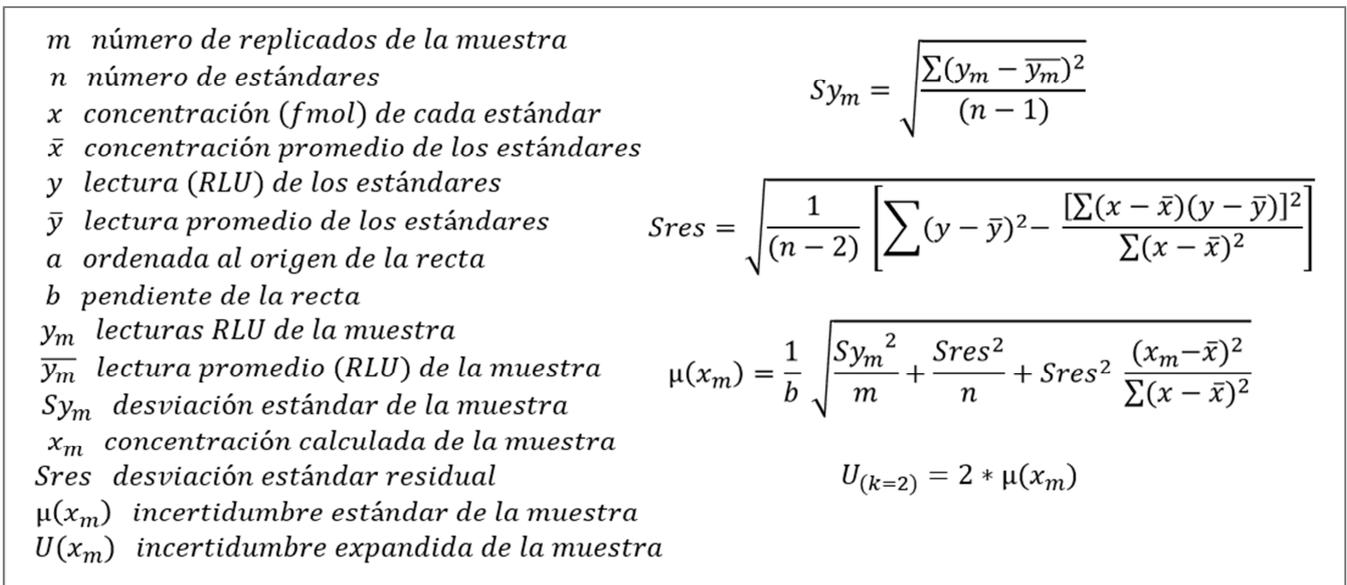


Figura 8. Cálculo de incertidumbre. Se muestran los datos y fórmulas aplicadas para el cálculo de la incertidumbre.

3.4 Mantenimiento de cepas y cultivos microbianos

Las cepas de *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* fueron facilitadas por la institución interesada en una placa de Petri con agar. Para comenzar a trabajar fue necesario

mantener las mismas en condiciones adecuadas. Para ello, se tomó una ansada de las placas provenientes del proveedor y se la introdujo en un recipiente que contenía el medio de cultivo líquido estéril (TSB), los caldos conteniendo *E. coli* y *S. aureus* se incubaron a 37°C por 48 hs, mientras que el de *C. albicans* permaneció por 96 hs. Transcurrido el tiempo de incubación, se tomó una fracción del cultivo y se les agregó glicerol estéril para obtener una concentración final de 50 %V/V, se agitó para homogeneizar, se fraccionó de a 1 ml en tubos Eppendorf y se conservó en freezer a -20°C.

Para el uso cotidiano, se realizó un repique en agar pico de flauta (TSA) y se almacenaron en heladera a 4°C, realizando repiques mensuales para el mantenimiento de las cepas. Cada vez que fue necesario utilizar los microorganismos se tomó una alícuota con un ansa estéril y se introdujo en el medio de cultivo líquido para su crecimiento, manteniendo en todo momento la esterilidad de los materiales.

3.5 Método de recuento en placa

A partir de las cepas almacenadas en pico de flauta en la heladera se sembró una ansada en caldo de triptona soja (TSB) y se incubó por 48 hs a 37°C. Los cultivos fueron estandarizados diluyendo el caldo con desarrollo microbiano en solución fisiológica estéril hasta una densidad óptica ($OD_{620\text{ nm}}$) entre 0,08 y 0,1 equivalente a 10^8 UFC/ml (McFarland, 1907). Tanto la composición del diluyente (solución fisiológica), como el tiempo de incubación y la dilución realizada fueron estandarizados en los tres casos para obtener reproducibilidad de resultados.

Se realizaron diluciones seriadas 1/10, transfiriendo 0,5 ml del inóculo a un tubo de dilución con 4,5 ml de diluyente y se homogeneizó bien. Se repitieron estos pasos hasta la dilución 10^0 . Las preparaciones debieron ser diluidas para el recuento en placa, con el fin de lograr contabilizar entre 10 y 300 colonias por placa (Figura 9). Luego, en el momento de la siembra se pipetearon por duplicado en placas de Petri, alícuotas de 1 ml de cada una de las diluciones. Se agregaron 15 ml de medio fundido a 44° - 46° C, se mezcló el inóculo con el medio fundido por movimientos de rotación en distintas direcciones. Se dejó solidificar el agar y se incubaron las placas en una estufa a 37°C durante 48 hs las bacterias y 96 hs la levadura. Una vez transcurrido este

tiempo se procedió al conteo de las placas y al posterior cálculo de recuento. Se contaron todas las colonias de cada placa, utilizando un dispositivo de luz para mejorar la visibilidad. Se calculó la media aritmética de los dos valores, se multiplicó por el factor de dilución y los valores se informaron como UFC/ml (ANMAT 2014).

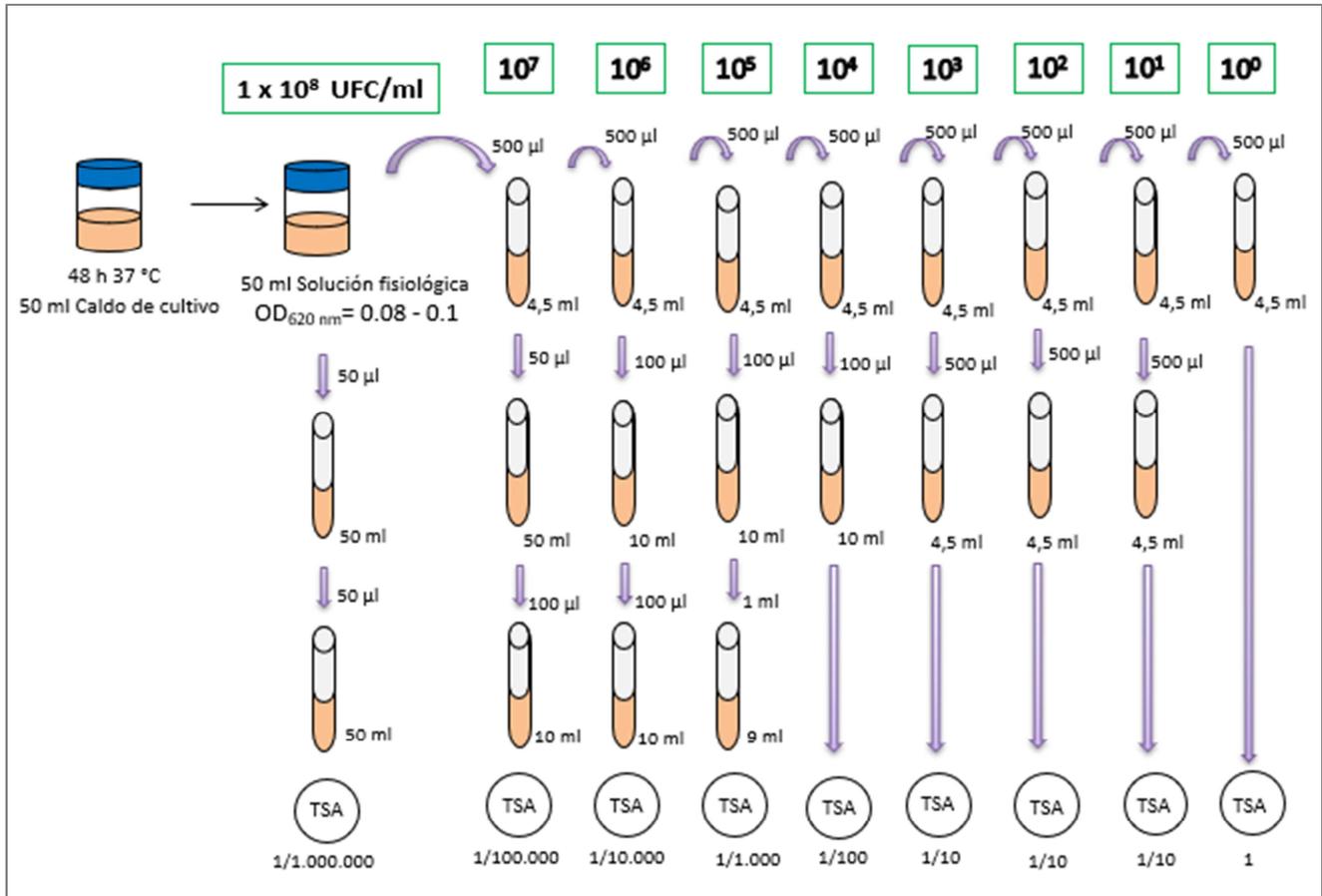


Figura 9. Diluciones para recuento en placa. Se realizaron diluciones seriadas a partir de un inóculo estandarizado y luego se realizó una dilución de cada una para la siembra con el fin de lograr contabilizar las colonias en cada caso.

3.6 Elección del tensioactivo

Una vez estandarizado el método y los cultivos microbianos, se procedió a la selección del tensioactivo adecuado para la lisis celular y la liberación del ATP. Para ello, se tomó como método de referencia la lisis celular por sonicación y se utilizó *Escherichia coli* como microorganismo de análisis. Law y col. (2003) demuestran que los tiempos de sonicación suficientes para extraer el 100 % del ATP celular no difieren en organismos con diferentes características estructurales.

La bacteria se incubó en TSB a 37 °C por 48 hs, luego el cultivo se diluyó en solución fisiológica hasta lograr una OD_{620 nm} de 0,08 - 0,1 (10⁸ UFC/ml) y se fraccionó en seis tubos con 5 ml del inóculo. Las suspensiones se trataron en un homogeneizador ultrasónico (OMNI Ruptor 4000, 400 watts potencia y 20 Hz frecuencia) por 0, 1, 2, 5, 10 y 15 minutos. A cada tiempo de sonicación, el porcentaje de células viables fue determinado por recuento en placa y se midió el ATP extraído por el método desarrollado. Para ello, se tomó 1 ml de inóculo, se centrifugó a 14000 rpm por 20 minutos, para quitar del medio los residuos que pudieran interferir, y se tomaron 10 µl del sobrenadante para realizar la medición. Con estos resultados, se estableció la máxima extracción de ATP al 100 % de lisis.

Posteriormente, se ensayaron los tensioactivos cloruro de benzalconio (ClBz), ácido tricloroacético (TCA), bromuro de dodeciltrimetilamonio (DTAB) y Tritón x100, en distintas concentraciones según bibliografía (Sigma® Technical Bulletin, 1991; Law y col, 2003; Hoffner y col., 1999). Las concentraciones de ClBz ensayadas fueron 0.02, 0.05, 0.1 y 1 %; de DTAB se ensayó 2.5%, de TCA 5% y de la combinación de DTAB/TCA se mezclaron las concentraciones 2.5/5 % y 5/10 %, respectivamente.

De la misma manera que en el paso previo, se realizó un cultivo de *E. coli* en TSB a 37°C por 48 hs y se estandarizó, llevándolo a una concentración de 10⁸ UFC/ml. Se fraccionó en alícuotas de 1 ml de inóculo y se centrifugó a 14000 rpm por 20 minutos, se quitó el sobrenadante y se agregó 1 ml de cada tensioactivo a ensayar, realizando una incubación de 1 minuto a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó nuevamente, se tomaron 10 µl del sobrenadante y se realizó la determinación de ATP según el protocolo desarrollado en el comienzo del trabajo. A partir de ello, se calculó el porcentaje de extracción de ATP para cada tensioactivo con respecto al método de referencia. Además, se realizó un control con la matriz microbiana sin tratar con ningún tensioactivo (control del buffer de reacción) con el fin de evaluar la señal de base. Con estos resultados, se estableció el tensioactivo de elección.

3.7 Ensayo inhibición de la enzima

Una vez seleccionado el tensioactivo, se analizó el efecto del mismo sobre la actividad de la enzima luciferasa en el rango de la curva de calibración; evaluando

nuevamente la linealidad, LD, repetibilidad e incertidumbre del método de la misma manera que se detalló previamente. Esto se realizó con soluciones de ATP de concentración conocida en el rango establecido durante la puesta a punto y se compararon estos resultados con los obtenidos previamente sin la inclusión del tensioactivo en el medio de reacción. Se procedió de la misma manera que se detalló previamente, utilizando diluciones de ATP comercial entre 10 y 100000 fmol con el agregado del tensioactivo en una relación 50:50, y realizando 8 replicados de cada una.

3.8 Relación UFC/ RLU

Finalmente, para evaluar la correlación entre el método desarrollado y el método microbiológico de recuento en placa, se cultivaron en dos ensayos independientes los tres microorganismos (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*) según el procedimiento 3.5 descrito anteriormente (Figura 9). Las diluciones seriadas (10^8 a 10^0) fueron, por un lado, plaqueadas por duplicado en medio TSA e incubadas por 48 hs a 37 °C para realizar recuento en placa. Y, paralelamente, se incubaron, por cuadruplicado, 1 minuto con el tensioactivo de elección y se analizaron por el método de determinación de ATP. Finalmente se graficaron los resultados de RLU en función de las UFC/ml de las diluciones, así como de la concentración de ATP en función de las UFC/ml; se identificó el rango en el cual la correlación es lineal y la menor concentración posible de detectar para cada cepa. Para el rango lineal se graficó la recta correspondiente y se establecieron los parámetros ligados a las mismas.

4. Resultados

4.1 Desarrollo del método

Se estableció la composición óptima del buffer de reacción, la concentración óptima de la enzima luciferasa y del sustrato D-luciferín para la determinación de ATP, así como las condiciones de temperatura y estabilidad para el ensayo. La fórmula cuantitativa de la solución de reacción estuvo sujeta a los criterios institucionales de la Gestión de Confidencialidad CG03 del Sistema Integral de Gestión del INTI.

Los componentes de la solución de reacción determinados fueron:

- ✓ Agua destilada estéril
- ✓ Buffer reacción 20x estéril
 - Buffer Tricine
 - MgSO_4
 - EDTA
 - Azida sódica
- ✓ DTT
- ✓ D-luciferín
- ✓ Luciferasa.

Se comprobó que es necesario que los componentes se encuentren a temperatura ambiente al momento de ser utilizados. Los mismos se debieron homogeneizar bien al preparar la solución, proteger de la luz y dejar estabilizar por al menos 30 minutos antes de realizar alguna medición.

4.2 Performance con reactivos Sigma

La curva de calibración obtenida luego de encontrar las condiciones para la detección de ATP con una solución comercial de concentración conocida, con D-luciferín y luciferasa Sigma®, se muestra en la Figura 10. Se observó un incremento proporcional en las RLU al incrementar la cantidad de ATP en una relación lineal entre 1 y 1000 fmol, el coeficiente de correlación r^2 fue de 0.9999. El límite de detección

calculado fue de 1,35 fmol ATP, y el porcentaje de variación (%CV) para cada nivel de concentración se muestra en la Tabla 1, siendo menor al 25% en todos los puntos.

fmol ATP	RLU								Promedio RLU	Desv st	% CV
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
10	10	10	11	7	8	6	7	6	8	2	24
100	89	91	85	72	71	69	59	53	74	14	19
1000	862	766	882	646	678	689	709	665	737	91	12

Tabla 1. Datos obtenidos con reactivos Sigma®. Valores de RLU medidos con soluciones de concentración conocida de ATP con sus correspondientes promedio, desvío y porcentaje de variación.

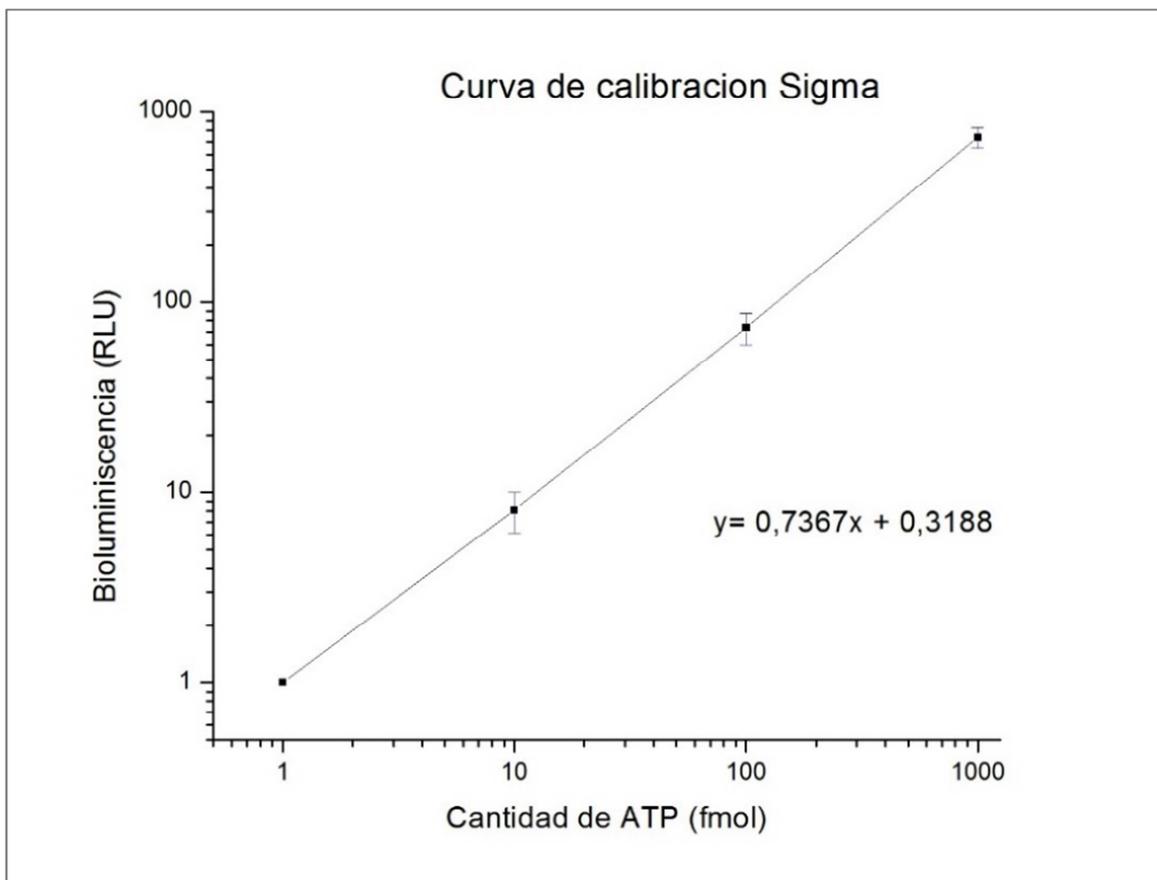


Figura 10. Curva de Calibración. Se grafican las Unidades Relativas de Luz (RLU) en función de la cantidad de ATP (fmol). Los valores corresponden a la media de 8 repeticiones independientes y sus respectivos desvíos standard.

Por otro lado, en la Tabla 2 se muestran los resultados del cálculo de incertidumbre del método. El S_{res} fue de 0,195 indicando una baja variabilidad de los datos en la línea de regresión. El resultado de la muestra fue de $107,368 \pm 10,994$ fmol de ATP con un 95 % de confianza (Sáez Ruiz y Avila, 2001).

Muestra (dilución 1/100000 stock) ~100 fmol	m	6
	n	4
	a	0,319
RLU	b	0,737
89	y_m	79,5
91	x_m	107,4
85	Sy_m	9,915
72	S_{res}	0,195
71	μ(x_m)	5,497
69	U(x_m)	10,994
Promedio: 79,5	Resultado (fmol)	107,368 ± 10,994

Tabla 2. Cálculo de incertidumbre. Se muestran, por un lado los valores de RLU medidos para un muestra en particular y, por otro lado los resultados de los calculos realizados para el método con reactivos Sigma®.

4.3 Performance con reactivos AAT Bioquest

En la siguiente etapa de puesta a punto del método con una nueva marca de D-luciferín y luciferasa se comprobó que las señales de RLU fueron menores que las obtenidas con la anterior marca de reactivos para las mismas concentraciones de ATP y el background indicaba un valor de señal. Para optimizar las medidas se probaron distintas relaciones de volúmenes de D-luciferín: luciferasa. Se concluyó que la actividad de la luciferasa AAT Bioquest® (nueva marca) era menor a la utilizada previamente (Sigma®), lo que resultó en que no se lograra la misma sensibilidad y fue necesario evaluar un nuevo rango de concentraciones de ATP comercial. Los resultados se muestran en la Tabla 3 y el la Figura 11.

fmol ATP	RLU								Promedio RLU	Desv st	% CV
100	8	9	9	10	9	6	8	9	9	1	14
1000	82	67	76	79	65	89	71	64	74	9	12
10000	599	609	771	735	775	841	727	674	716	84	12
100000	6688	5768	5933	6912	5782	8358	7518	6773	6717	908	14

Tabla 3. Datos obtenidos con reactivos AAT Bioquest®. Valores de RLU medidos con soluciones de concentración conocida de ATP con sus correspondientes promedio, desvío y porcentaje de variación.

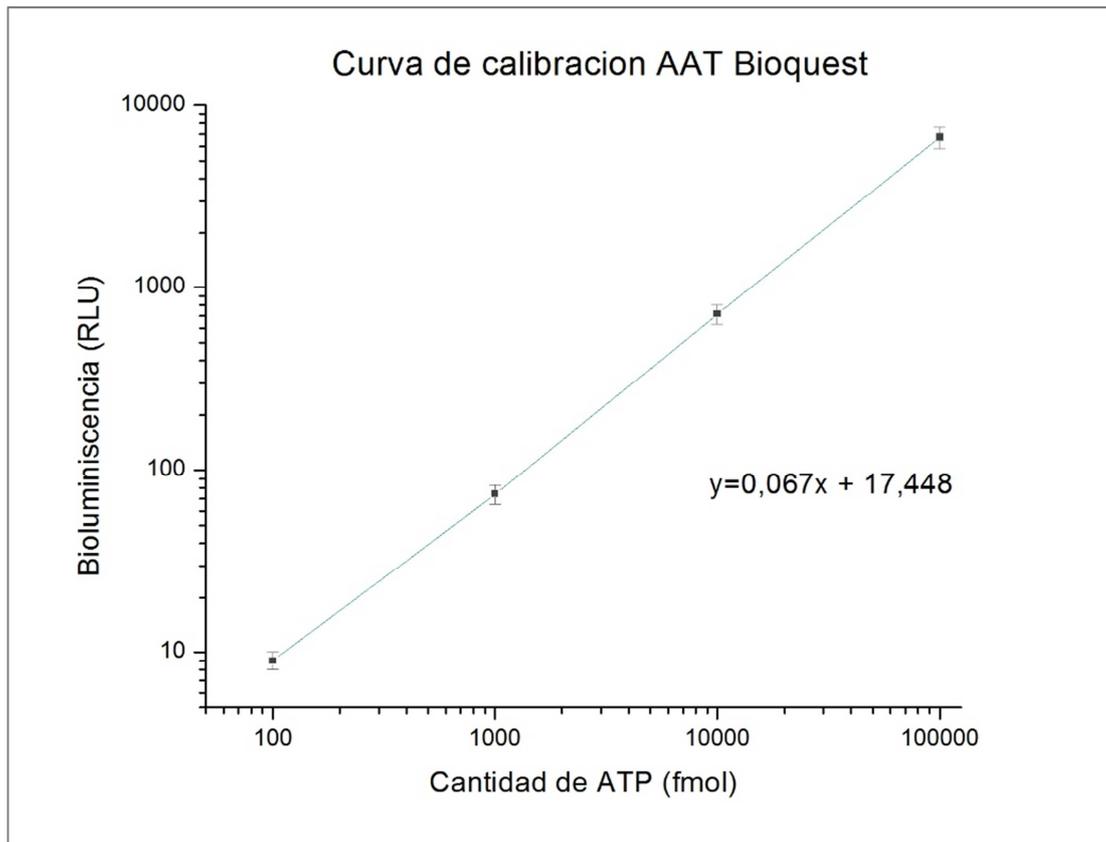


Figura 11. Curva de Calibración. Se grafican las Unidades Relativas de Luz (RLU) en función de la cantidad de ATP (fmol). Los valores corresponden a la media de 8 repeticiones independientes y sus respectivos desvíos standard.

En este caso, el límite de detección calculado fue de 14,9 fmol ATP, lo cual fue la principal diferencia con respecto al anterior. El coeficiente de variación calculado fue de entre 12 y 14 %, mientras que el coeficiente de correlación r^2 fue de 0.9999, siendo un método repetible y lineal en el rango entre 15 y 100000 fmol de ATP. Por último, se procedió a realizar el cálculo de la incertidumbre del método desarrollado, los resultados se muestran en la Tabla 4. El S_{res} fue de 23,97 indicando una mayor variabilidad de los resultados con respecto a lo obtenido con reactivos Sigma®, siendo de cualquier forma un valor aceptable. Por otro lado, resultado de la muestra ejemplo fue de $9636,861 \pm 524,939$ ATP, consistente con el valor esperado.

Muestra (dilución 1/1000 stock) ~10000 fmol	m	6
	n	4
	a	17,448
RLU	b	0,067
656	y_m	663,3
639	x_m	9636,9
664	Sy_m	28,870
673	S_{res}	23,967
634	μ(x_m)	262,469
714	U(x_m)	524,939
Promedio: 663,3	Resultado (fmol)	9636,861 ± 524,939

Tabla 4. Cálculo de incertidumbre. Se muestran, por un lado los valores de RLU medidos para un muestra de ejemplo y, por otro lado los resultados de los calculos realizados para el método con reactivos AAT Bioquest®.

Los resultados obtenidos en esta fase fueron los que se tomaron como punto de partida para las siguientes etapas del trabajo, debido a los requerimientos de la empresa y a la disponibilidad de reactivos, sabiendo que la técnica inicial posee una mejor sensibilidad, pero la linealidad y repetibilidad es constante en ambos casos.

4.4 Elección del tensioactivo

Con el fin de seleccionar el tensioactivo adecuado para la liberación del ATP celular, se utilizó un cultivo microbiano de *E. coli*. En la Figura 12 se muestra el gráfico donde se representan las RLU y UFC/ml en función del tiempo de tratamiento de sonicación, observándose claramente cómo al incrementar la bioluminiscencia descende el recuento de colonias.

A los 5 minutos de sonicación no se observa crecimiento microbiano pero la extracción del ATP es cercana al 50%. Este tiempo fue suficiente para inhibir el crecimiento sin embargo, no alcanzó para completar la lisis y extraer la totalidad del ATP intracelular. Luego de 10 minutos de sonicación ya no se observaron colonias en el recuento en placa y se alcanza la máxima señal de luminiscencia (944 RLU). Por lo tanto, se considera que este punto es el de máxima extracción de ATP (100% lisis).

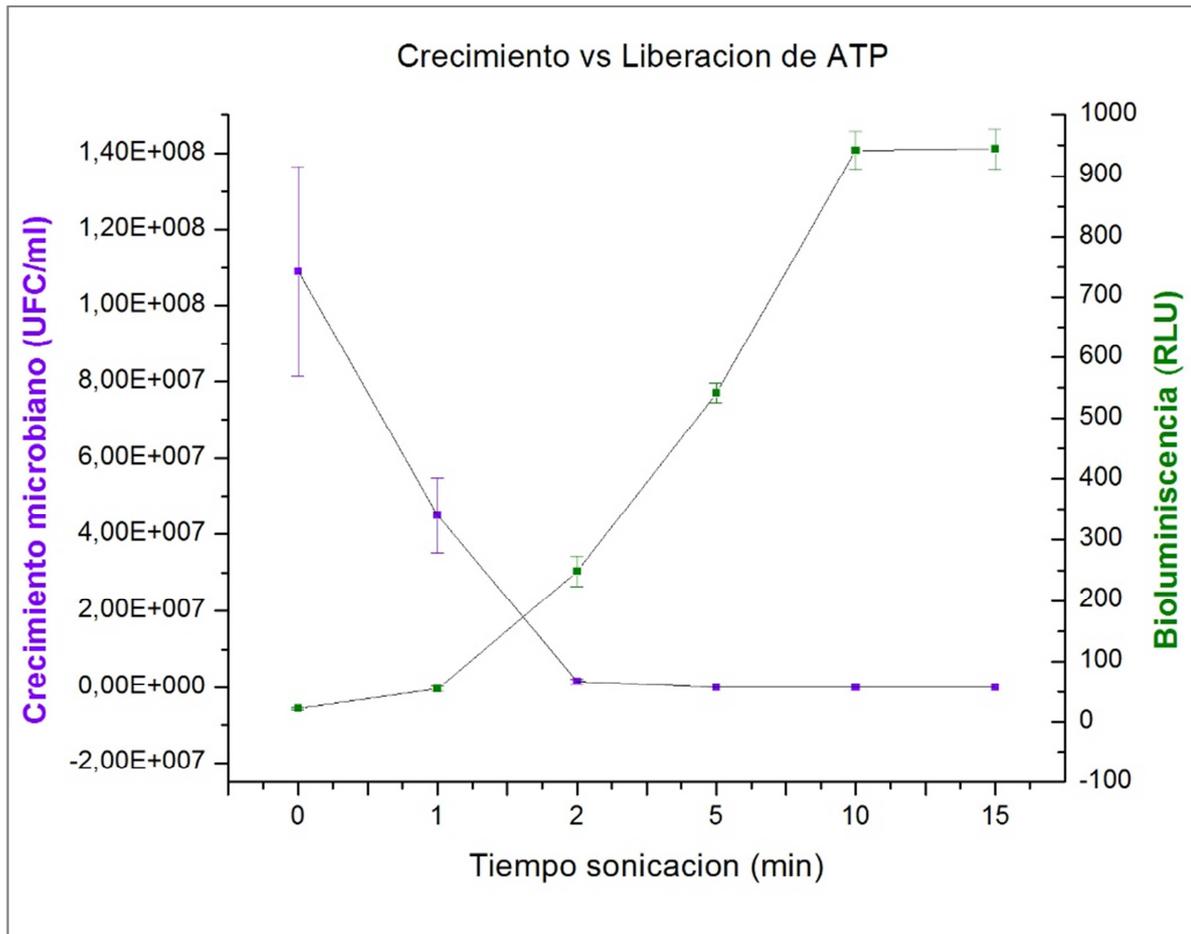


Figura 12. Lisis por sonicación. Se grafica la bioluminiscencia (RLU) y las Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) en función del tiempo de tratamiento (minutos) de un cultivo de *E. coli*. Los valores corresponden a la media de 4 repeticiones independientes y sus respectivos desvíos standard.

Los distintos tensioactivos ensayados y las respectivas concentraciones se listan en la Tabla 5, en la cual se muestran los resultados promedio de cuatro repeticiones independientes de cada condición particular. Con estos resultados se calculó el porcentaje de extracción de ATP tomando como referencia el valor máximo obtenido por el método de lisis por sonicación en el paso anterior (944 RLU). En todos los casos el %CV fue menor al 20 % por lo que se observa una buena repetibilidad en las mediciones.

Tensioactivo	Promedio RLU	Desv st	% CV	% extracción ATP
ClBz 0,02 %	440,0	23,0	5,2	46,6
ClBz 0,05 %	351,0	42,0	12,0	37,2
ClBz 0,1 %	498,0	68,0	13,7	52,8
ClBz 0,1 % + glucosa 40%	368,0	2,0	0,5	39,0
ClBz 1 %	114,0	17,0	14,9	12,1
DTAB 2,5%/TCA 5%	668,0	105,0	15,7	70,8
DTAB 2,5%/TCA 5% + glucosa 40%	656,0	25,0	3,8	69,5
DTAB 5%/TCA 10%	464,0	67,9	14,6	49,2
DTAB 2,5 %	616,0	34,0	5,5	65,3
TCA 5 %	594,0	64,0	10,8	62,9
Tritón x100 + glucosa 40%	16,0	3,0	18,8	1,7

Tabla 5. Comparación de tensioactivos. Se calculó el % de extracción de ATP tomando como referencia el valor de RLU obtenido luego de 10 minutos de sonicación de un cultivo de *E. coli* 10^8 UFC/ml. ClBz: Cloruro de Benzalconio; DTAB: dodeciltrimetil amonio; TCA: ácido tricloroacético.

Asimismo, en la Figura 13 se grafican los valores de % de extracción, mostrando que con ningún tensioactivo se logró el 100 % de lisis con respecto al método de sonificado. Con todas las concentraciones de ClBz ensayadas se obtuvo valores de RLU significativamente inferiores a los obtenidos con DTAB y TCA, alcanzando apenas el 50 % de extracción de ATP en la mejor condición. La condición en la cual se obtuvo la mayor señal fue con DTAB 2.5 % /TCA 5%, alcanzando un valor de 668 RLU, correspondiente al 71 % de extracción de ATP. Se agregó glucosa a la mezcla de estos tensioactivos y se incrementó la concentración de DTAB /TCA pero no se logró mejorar el % de extracción de ATP. Se ensayaron soluciones separadas de ambos, obteniéndose valores similares a la mezcla, sin superarlos.

Si bien el valor de señal conseguido con DTAB 2.5 % /TCA 5%, fue menor al obtenido luego del proceso de sonicación por 10 minutos, se consideró representativo y se seleccionó esta condición para continuar con el trabajo. El valor de señal obtenida con la matriz microbiana sin tratar con ningún detergente (control del buffer de reacción) fue de 40 RLU, significativamente inferior a las mediciones con los tensioactivos. Únicamente la lectura con Tritón x100 estuvo por debajo de este valor, el cual fue descartado del proceso de selección.

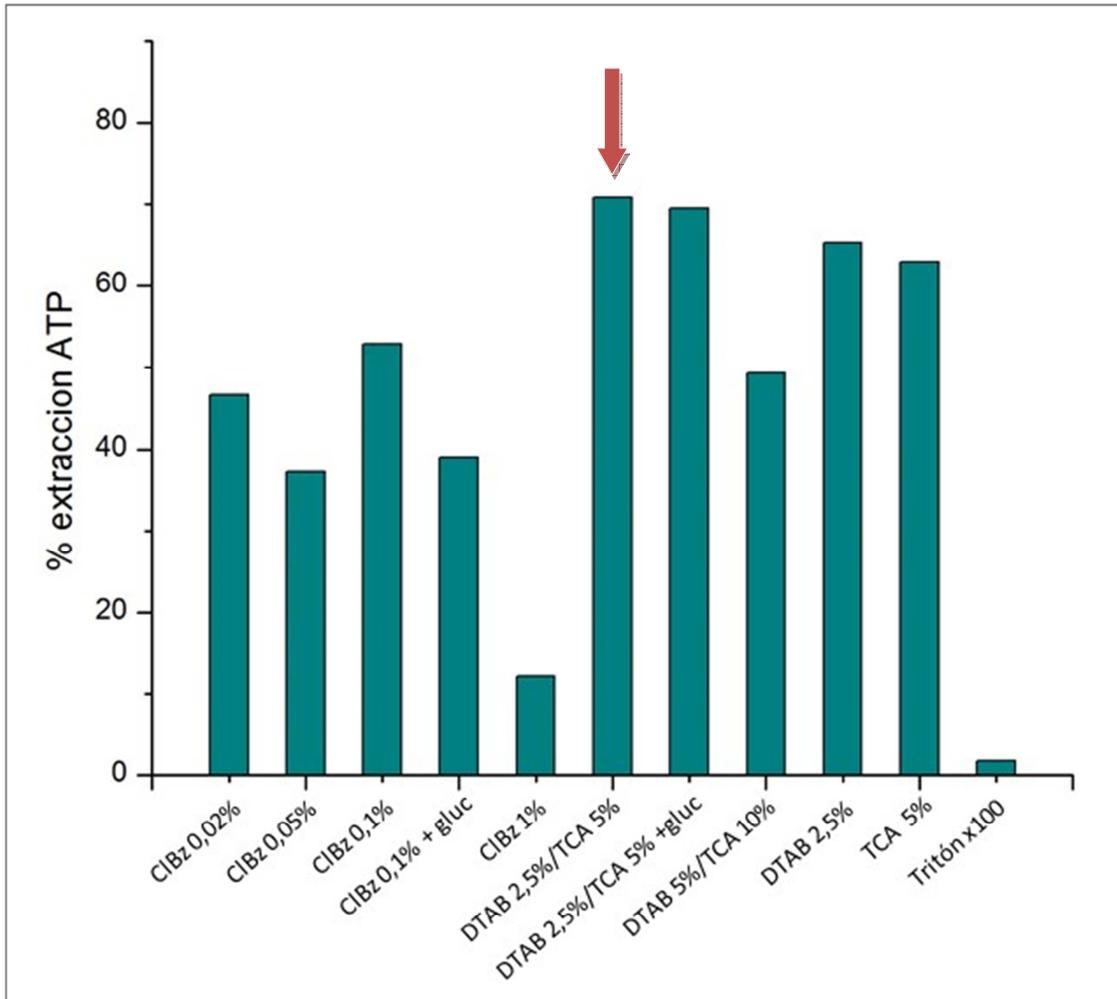


Figura 13. Comparación de extracción de ATP. Se grafica el % de extracción de ATP, con respecto al máximo obtenido con el método de lisis, en función de los distintos tensioactivos utilizados sobre el cultivo de *E. coli*.

4.5 Ensayo inhibición de la enzima

Una vez seleccionado el DTAB/TCA, y teniendo como referencia la curva de calibración realizada al comienzo del trabajo, se incluyó en el medio de reacción el tensioactivo a utilizar para la lisis celular y se volvieron a medir las concentraciones conocidas de ATP (Tabla 6).

Los resultados se muestran en la Figura 14, a partir de los mismos se pudo determinar que no existe inhibición de la enzima luciferasa con DTAB y TCA en la solución de reacción. Además, con la nueva curva obtenida se mantuvieron la linealidad ($r^2=0.9999$) y repetibilidad del método (promedio 13 %CV), y el límite de detección calculado fue similar (15,8 fmol ATP).

fmol ATP	RLU								Prom RLU	Desv st	% CV
100	6	7	7	11	11	11	8	9	9	2	23
1000	51	61	62	55	58	47	54	62	56	5	10
10000	593	545	540	560	712	637	615	736	617	74	12
100000	5901	6760	6131	5899	5920	6925	6605	6183	6291	414	7

Tabla 6. Datos obtenidos con reactivos AAT Bioquest® con el agregado del tensioactivo. Valores de RLU medidos con soluciones de concentración conocida de ATP con sus correspondientes promedio, desvío y porcentaje de variación.

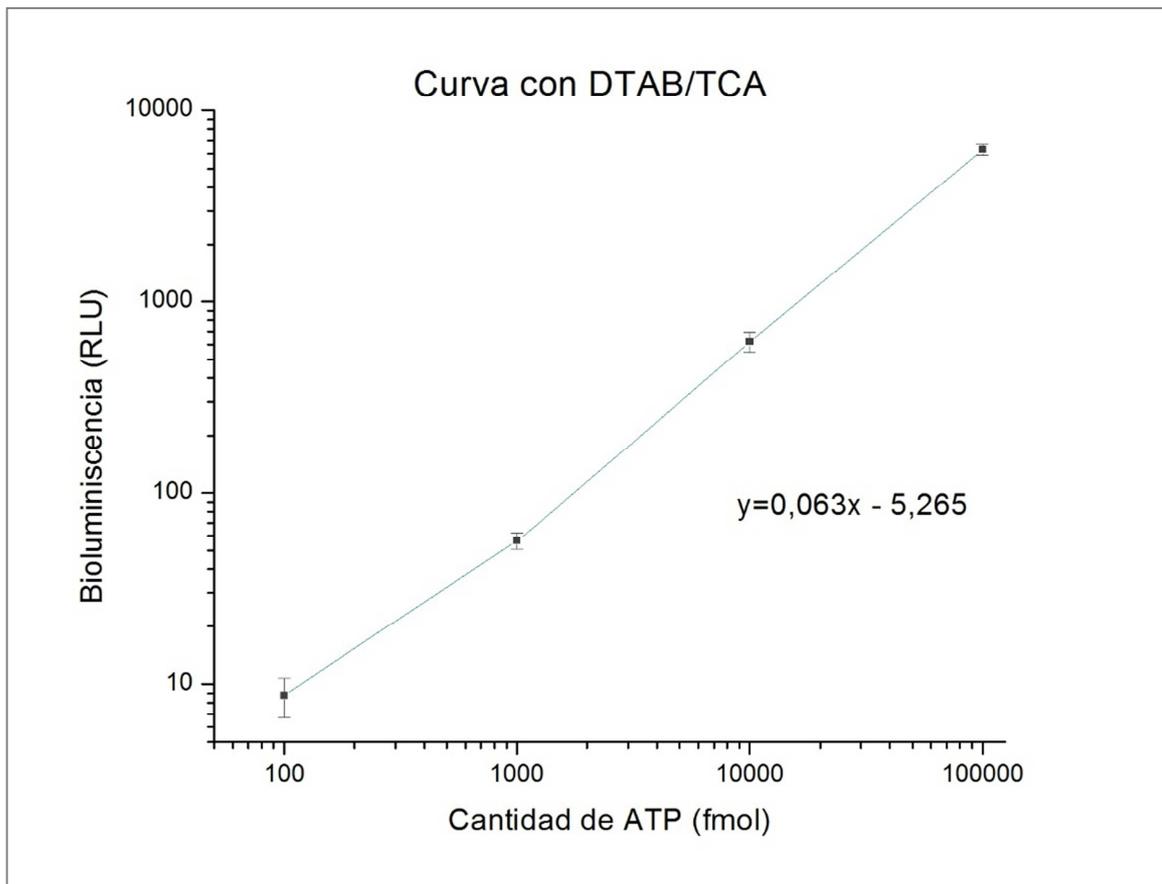


Figura 14. Inhibición de la enzima luciferasa. Se grafican las Unidades Relativas de Luz (RLU) en función de la cantidad de ATP (fmol) combinado con el detergente a utilizar para la lisis celular. Los valores corresponden a la media de 8 repeticiones independientes y sus respectivos desvíos standard.

En cuanto al cálculo de la incertidumbre, los resultados se muestran en la Tabla 7. El S_{res} fue de 7,75 indicando que los datos obtenidos se acercaron mucho a la línea de regresión y, por lo tanto las predicciones realizadas a partir de esta recta son confiables, el resultado de la muestra fue de $11034,564 \pm 431,283$ fmol de ATP. Tanto los valores del S_{res} y el intervalo de confianza para la muestra con 95 % de confianza fueron

mejores a los obtenidos sin el agregado del tensioactivo, sin embargo se observó una menor variabilidad con los reactivos Sigma®.

Muestra (dilución 1/1000 stock) ~10000 fmol	m	6
	n	4
	a	-5,265
RLU	b	0,063
668	y_m	689,3
682	x_m	11034,6
741	Sy_m	31,646
659	S_{res}	7,746
714	μ(x_m)	215,641
672	U(x_m)	431,283
Promedio: 689,3	Resultado (fmol)	11034,564 ± 431,283

Tabla 7. Cálculo de incertidumbre. Se muestran, por un lado los valores de RLU medidos para un muestra de ejemplo y, por otro lado los resultados de los calculos realizados para el método con reactivos AAT Bioquest® y agregado de tensioactivo.

4.6 Relación UFC/RLU

Una vez ensayada la inhibición de la enzima se evaluó la relación entre el método de recuento en placa y la determinación de ATP por bioluminiscencia. Para ello se utilizaron tres microorganismos para comparar los resultados según las características de cada uno, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Cándida albicans*. En las Figuras 15, 16 y 17, respectivamente, se muestran los resultados de bioluminiscencia y fmol de ATP en función de las UFC/ml para cada uno de ellos, y las rectas trazadas en las correspondientes regiones lineales.

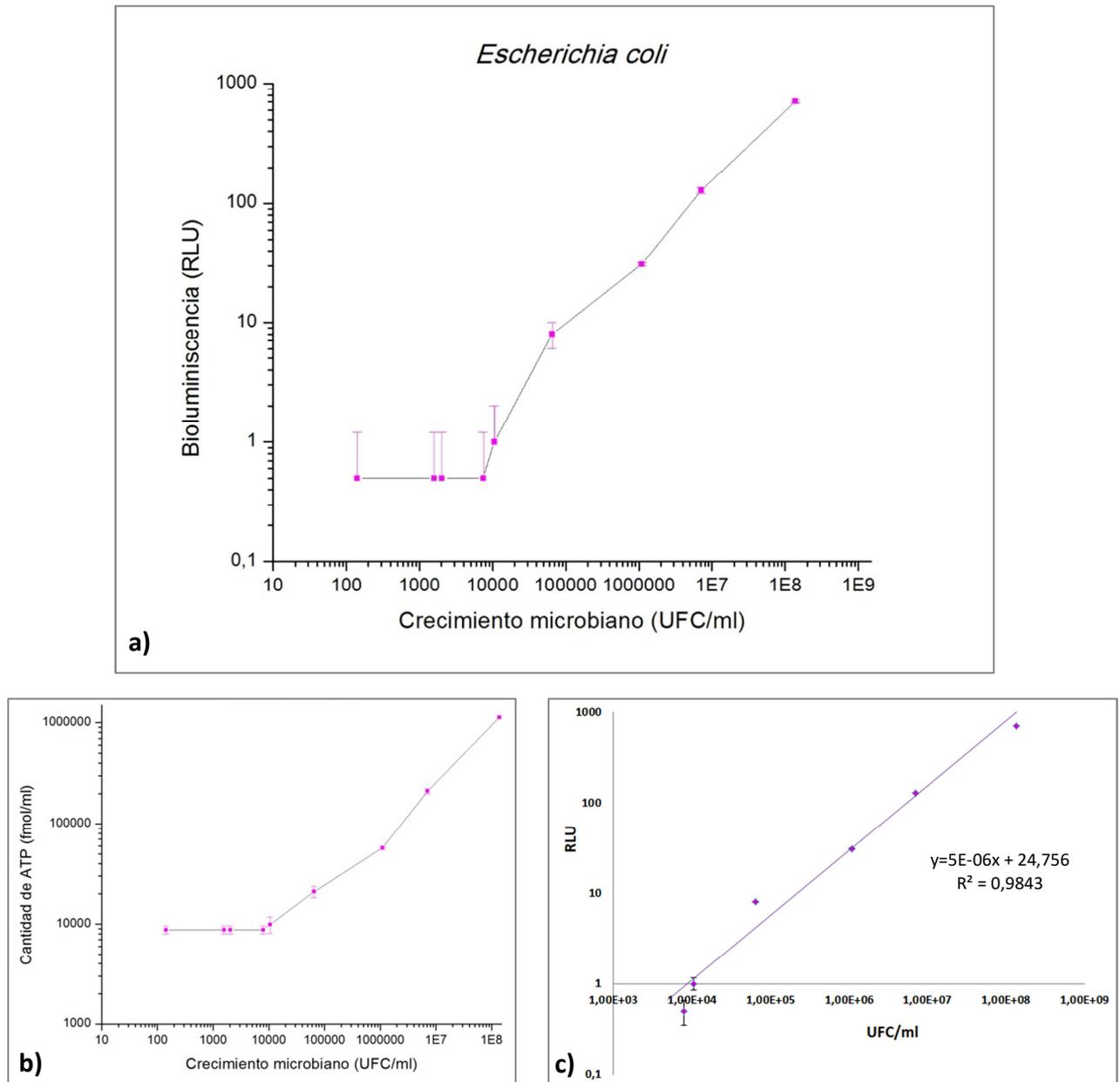


Figura 15. *Escherichia coli*. **a)** Bioluminiscencia (RLU) en función de las UFC/ml. **b)** fmol ATP en función de las UFC/ml. **c)** Ajuste de la recta en la región lineal de la curva. Los valores corresponden a la media de 4 repeticiones independientes y sus respectivos desvíos standard.

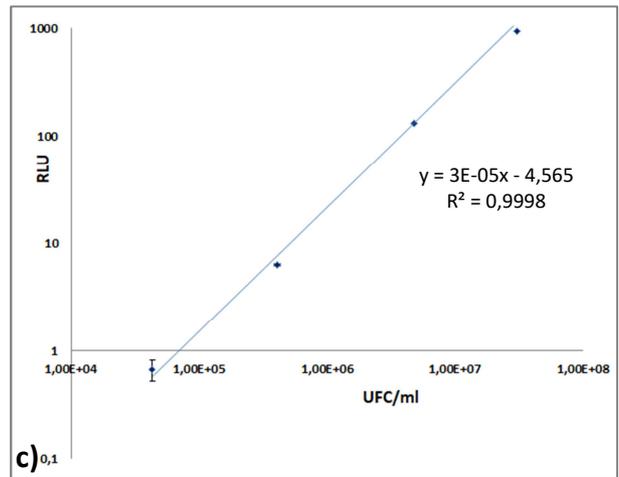
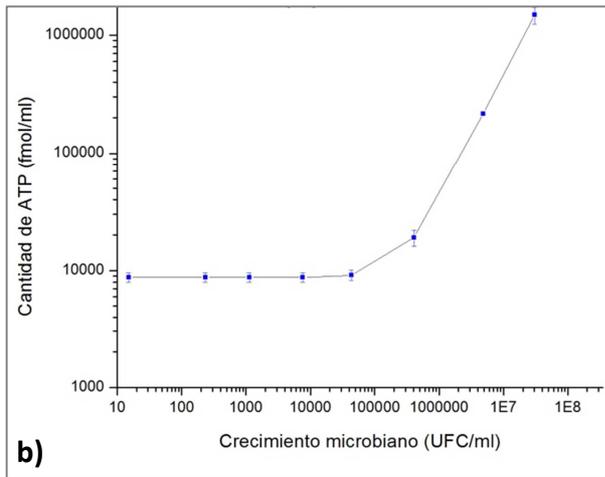
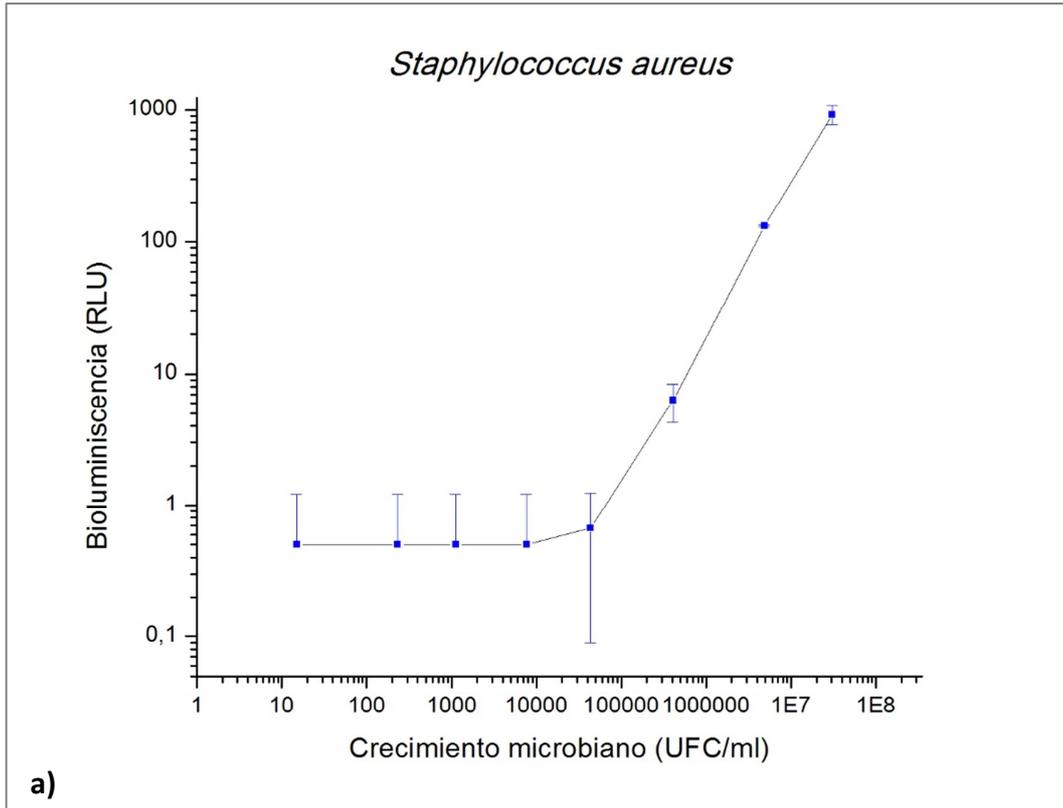


Figura 16. *Staphylococcus aureus*. **a)** Bioluminiscencia (RLU) en función de las UFC/ml. **b)** fmol ATP en función de las UFC/ml. **c)** Ajuste de la recta en la región lineal de la curva. Los valores corresponden a la media de 4 repeticiones independientes y sus respectivos desvíos standard.

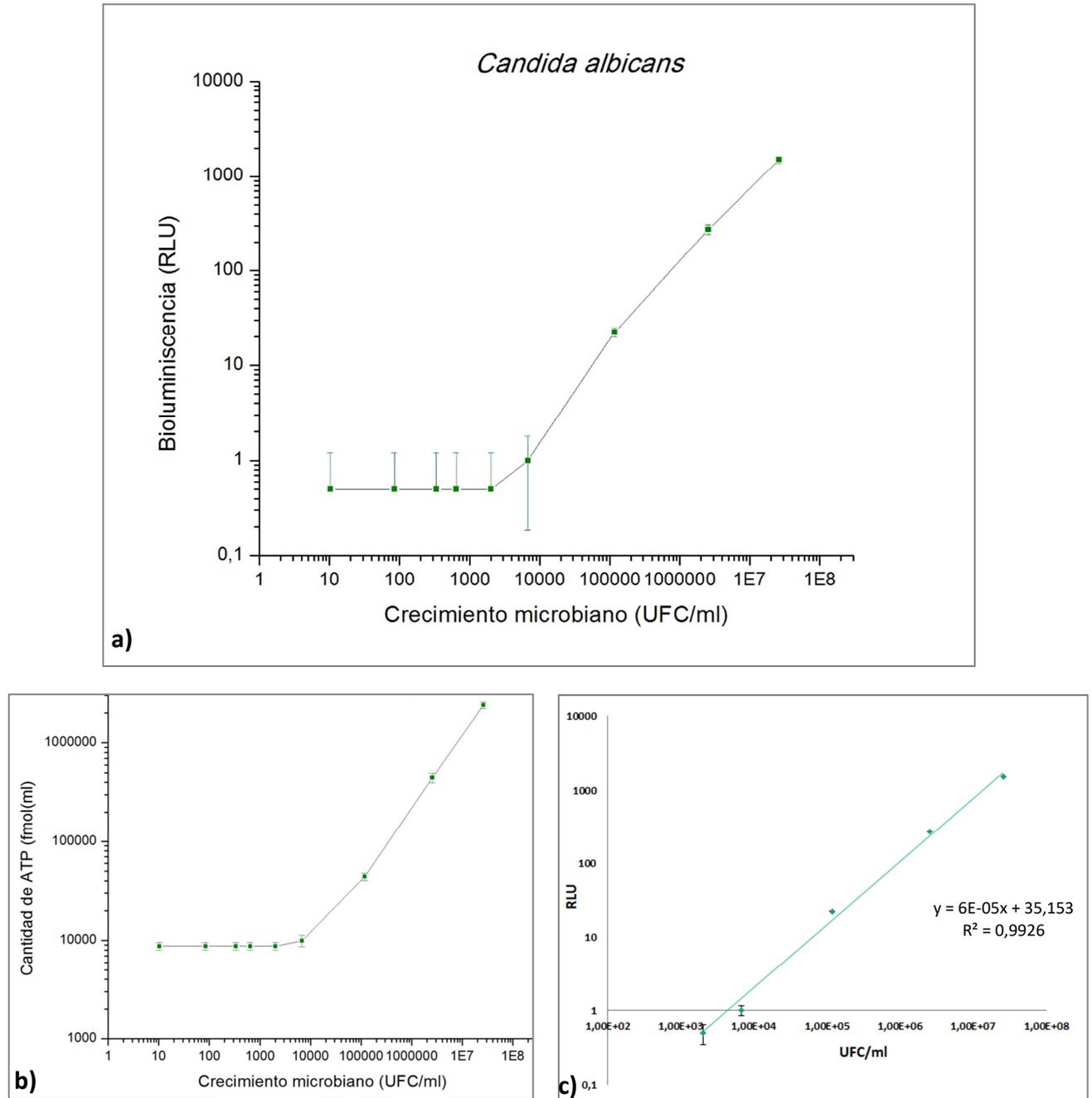


Figura 17. *Cándida albicans*. **a)** Bioluminiscencia (RLU) en función de las UFC/ml. **b)** fmol ATP en función de las UFC/ml. **c)** Ajuste de la recta en la región lineal de la curva. Los valores corresponden a la media de 4 repeticiones independientes y sus respectivos desvíos standard.

Se obtuvo un máximo de 707 RLU (11305 fmol) para el mayor recuento de *E. coli*, correspondiente a 10^8 UFC/ml y un mínimo de 1 RLU (91 fmol) para todas las concentraciones celulares menores a 10^4 UFC/ml. Para *S. aureus* el valor máximo medido fue de 924 RLU (14754) y un mínimo de 1 RLU para todas las diluciones menores a 10^5 UFC/ml. En el caso de *C. albicans*, se alcanzaron las 1500 RLU (23897) en el mayor recuento y 1 RLU en las concentraciones menores a 10^4 UFC/ml. En resumen, en los tres casos se observó un máximo de detección cercano a 1000 RLU en el mayor recuento (promedio 16650 fmol ATP), mientras que el menor valor medido fue de 1 RLU, correspondiéndose con la dilución 10^4 UFC/ml en *E. coli* y *C. albicans* y 10^5 UFC/ml en *S. aureus*; no siendo posible detectar menores concentraciones celulares con este método. Sin embargo, se observó una buena correlación entre los parámetros de ambos métodos por encima de las mismas, obteniéndose valores de r^2 superiores a 0,98 en los tres casos. Se observó una mayor sensibilidad (mayor pendiente) en el caso de la levadura.

5. Discusión

El objetivo principal de este trabajo fue el desarrollo de un método de detección de ATP por bioluminiscencia para monitoreo de higiene y su comparación con el método estándar de recuento en placa. En primer lugar, se evaluaron parámetros clave: linealidad, sensibilidad, repetibilidad e incertidumbre; en la Tabla 8 se comparan los resultados obtenidos a partir de las distintas marcas de D-luciferín y luciferasa (Sigma® y AAT Bioquest®) y con el tensioactivo de elección en la solución de reacción utilizando los reactivos marca AAT Bioquest®.

Se logró una mayor sensibilidad y menor LD con los reactivos Sigma®; con los reactivos de la marca AAT Bioquest® no se observaron diferencias en los parámetros medidos al incorporar el tensioactivo en la solución de reacción. De este modo se determinó que la enzima luciferasa no presenta inhibición por los tensioactivos utilizados. En cuanto a la incertidumbre, una desviación residual menor a 20 significa que los resultados se acercan notablemente a la línea de regresión, por lo que esta ofrece predicciones confiables (Shaw, 2003; Fox, 2008). Si bien en el caso del reactivo AAT Bioquest® el valor de desviación residual no es menor a 20, durante el uso rutinario del reactivo, en la solución de reacción se incorporará el tensioactivo. En esta condición el valor de desviación residual fue de 7,7. En el caso del reactivo Sigma® sin agregado de tensioactivo los valores de este parámetro están dentro de especificación.

Parámetros	Reactivos Sigma®	Reactivos AAT Bioquest®	Agregado de DTAB/TCA
Linealidad (r^2)	0.9999	0.9999	0.9999
LD (fmol de ATP)	1.4	15.0	15.8
Repetibilidad (CV% 100 fmol)	19	14	23
Sensibilidad	0.737	0.067	0.063
Incertidumbre (S_{res})	0.19	23.97	7.75

Tabla 8. Comparación de los parámetros medidos para cada método ensayado.

Luego, se evaluó la performance del método con respecto a otros kits disponibles en el mercado (Tabla 9). En Silliker Report (2010) se hizo una distinción entre aquellos de alta, media y baja performance para tres criterios particulares:

linealidad, repetibilidad y sensibilidad (Tabla 10). El valor de linealidad obtenido para este método, tanto con los reactivos Sigma®, AAT Bioquest® y con el agregado del tensioactivo fue de 0.9999 por lo que el método posee buena linealidad y es comparable a los kits de alta performance como BioControl, Hygiena y 3M, cuyos valores de r^2 se encuentran por encima de 0.98.

Sistema	Linealidad	Repetibilidad	Sensibilidad
	r^2	%CV en 100 fmol ATP	LD (fmol)
Biocontrol	0.982	39	1
3M Unilite	0.988	26	1
Charm Novalum	0.949	86	10
Hygiena Ultrasnap	0.988	28	1
Hygiena Spersnap	0.987	9	0.2
Neogen Accupoint	0.976	123	10

Tabla 9. Comparación de kits comerciales. Adaptado de Silliker Report Hygiena 2010.

	Baja	Media	Alta
Linealidad (r^2)	<0.94	-	0.94-0.98
LD (fmol ATP)	>10	~1	≤0.1
Repetibilidad (CV% en 100 fmol)	>80	30-40	10

Tabla 10. Clasificación según performance. Adaptado de Silliker Report Hygiena 2010.

Para comparar la repetibilidad se seleccionaron los valores correspondientes a 100 fmol de ATP y, en todos los casos, el método desarrollado con cualquier reactivo con y sin tensioactivo es comparable con los kits con performance media y alta: Hygiena y 3M, ya que el %CV calculado fue de entre 14 y 23%.

El LD fue de 1,4 fmol de ATP para el método con la enzima de Sigma® y 15 o 15.8 fmol de ATP para el caso de AAT Bioquest® con y sin tensioactivo, respectivamente. El primero puede colocarse en la categoría de performance media (Biocontrol, 3M), mientras que el segundo es comparable a aquellos de baja performance como Charm y Neogen.

Las diferencias encontradas en los parámetros de la performance al utilizar enzimas de distintos proveedores podrían deberse a los procesos de obtención y/o purificación de la luciferasa llevados a cabo en cada caso, además de la presentación de comercialización. La estabilidad de la enzima depende del origen de la misma, del

inhibidor de ATPasa y el agente estabilizante en la formulación (Promega, 2009). A su vez, la expresión del gen de la luciferasa depende de la introducción artificial de un plásmido y está influenciada por una variedad de factores como la síntesis de ADN, la síntesis de proteínas y el metabolismo general (Hoffner y col., 1999). Por lo tanto, pueden existir variaciones en cada caso y ser el motivo de las diferencias encontradas entre ambas enzimas utilizadas.

Los resultados obtenidos en este trabajo, en cuanto a los parámetros de desempeño, colocarían a este método en una buena posición con respecto a los disponibles en el mercado y su utilización dependerá de los niveles esperados y aceptados en cada situación particular en donde se preverá su utilización.

El ATP, una vez extraído del interior de las células, se degrada rápidamente; por lo tanto, los extractantes utilizados deben permeabilizar membranas celulares y, simultáneamente, inhibir o inactivar todas las enzimas que puedan degradarlo (Hoffner y col., 1999). Los agentes utilizados son detergentes (catiónicos, aniónicos y zwitteriónicos), sales biliares, caótopos, toxinas bacterianas, calor, una combinación de tratamiento con calor y cloroformo, exposición a productos químicos como dimetilsulfóxido o ácido tricloroacético (Prioli y col., 1985). El extractante que inactive la enzima luciferasa ocasionaría una interferencia analítica a menos que las muestras estén correctamente diluidas antes de ensayo. Utilizando compuestos aminos cuaternarios, como el DTAB, esta interferencia analítica puede ser parcialmente contrarrestada utilizando elevadas concentraciones de D- luciferín (Lundin y col., 1984; Anséhn y col, 1979). Se utilizó en los ensayos realizados en el presente trabajo de tesis DTAB y no se observó inhibición de la enzima luciferasa.

Kiyotaka y col. (2016) probaron varios detergentes para determinar su efecto sobre la reacción de D-luciferín-luciferasa con ATP y determinaron que, entre los detergentes probados, el cloruro de benzalconio y TritonX-100, inhibieron intensamente la actividad de la luciferasa. Lo cual se vio reflejado de la misma manera en este trabajo. Por otro lado, se ha reportado que la extracción con ácido tricloroacético (TCA) da como resultado rendimientos de ATP en todas las cepas bacterianas más altos que otros métodos de extracción, o muy cercanos a los rendimientos más altos (Lundin y Thorne, 1975), por lo que es un compuesto elegido para la extracción en gran cantidad de casos.

La sonicación es una técnica efectiva de lisis celular y extracción de ATP (Law y col., 2003; Eed y col., 2016), por lo que fue utilizada como método de referencia. Según Romanova y col. (1997) con 5 % de TCA y 2,5 % de DTAB se lisan por completo las células y extrae el 100 % del ATP. Sin embargo, es necesario realizar pruebas para cada sistema y organismo en particular. En este trabajo de tesis, si bien se logró el mejor % de extracción con esta combinación de tensioactivos entre las condiciones ensayadas, no se logró obtener el 100 % de lisis. Sin embargo, se considera que el % de extracción fue suficiente ya que lo que se busca desarrollar es un método rápido, de medición *in situ*, en el cual un paso de sonicación no es viable para el objetivo que se plantea.

El propósito del monitoreo de la higiene de superficies mediante bioluminiscencia del ATP es proporcionar una prueba simple, rápida, directa y objetiva para la verificación de la limpieza. Es un ensayo sensible e instantáneo para determinar el estado de la limpieza y los potenciales riesgos asociados a la misma. A diferencia de los métodos microbiológicos, que demoran días en proveer resultados, las pruebas de ATP brindan información importante en solo segundos, y proveen información adicional sobre residuos orgánicos. Sin embargo, no están destinados a reemplazar las pruebas microbiológicas y es importante establecer la correlación entre ambos métodos. En cuanto a esto, se utilizaron tres especies diferentes para evaluar su correlación: *Escherichia coli*, representante de las enterobacterias y organismo que puede causar graves intoxicaciones alimentarias, *Staphylococcus aureus*, una bacteria anaerobia facultativa, Gram positiva que puede producir una amplia gama de enfermedades, y *Cándida albicans*, un hongo de la familia de los sacaromicetos. En los tres casos analizados se observó una buena correlación entre el método de bioluminiscencia y el método de recuento en placa entre las 10^4 UFC/ml o 10^5 UFC/ml (según microorganismo) y las 10^8 UFC/ml. De las experiencias efectuadas con los tres microorganismos, cabe inferir que en suspensiones bacterianas cuya concentración sea inferior a 10^5 /ml, la bioluminiscencia no es sensible, este hecho fue constatado en reiteradas oportunidades con resultados similares (Temprano y Aquino, 2004).

Es pertinente examinar la evidencia en cuanto a la existencia de correlación entre recuentos microbianos y niveles de ATP. Hay numerosas publicaciones en donde se demuestra la existencia de dicha correlación. Varios estudios han comparado el

método de recuento en placa con el método de detección de ATP por bioluminiscencia en entornos variados y encontraron una correlación variable, generalmente atribuida al hecho de que la microbiología cuantitativa mide solo las bacterias, mientras que la determinación del ATP mide todos los desechos orgánicos. Öz y Özgen Arun (2019) obtuvieron una correlación significativa para *S. aureus* y *E. coli*, entre otros microorganismos, utilizando superficies contaminadas artificialmente, y concluyeron que el método puede ser utilizado con éxito para verificación general de limpieza de superficies, sin embargo, no es lo suficientemente robusto como para diferenciar distintos tipos de microorganismos. Por otra parte, Raia y col. (2018) no encontraron correlación significativa entre UFC/ml y RLU realizando mediciones en instalaciones hospitalarias. Leon y Ambrecht (2007) evaluaron el uso de la bioluminiscencia en restaurantes y en industrias de servicio alimentario, encontraron una fuerte relación entre las lecturas de ATP y UFC/ml, y concluyeron que las RLU y las UFC se encuentran estrechamente relacionados, y siguen una relación lineal con los niveles de carga microbiana mayores a 10^3 UFC y menores a 10^7 , resultado similar a los obtenidos en este trabajo de tesis. Eed y col. (2016), quienes utilizaron el método de sonicación para la liberación del ATP, concuerdan con estudios previos que muestran buena correlación entre recuentos bacterianos y concentración de ATP por bioluminiscencia en agua potable entre 10^5 y 10^8 UFC/ml. Davidson y col. (1999), utilizaron *S. aureus* y *E. coli* para contaminar superficies de acero inoxidable, e informan un límite de detección bacteriano para la prueba de ATP de 10^4 /100 cm² para ambos organismos. Ohkmidash y col. (2014) realizaron también un estudio basado en *S. aureus* en el cual compararon varios dispositivos comerciales y mostraron que los niveles de bacterias detectables por cada dispositivo son significativamente diferentes. Este estudio muestra claramente que cada química tiene un efecto único ya sea disminuyendo o incrementando las lecturas de ATP, por lo tanto, es de gran importancia la validación de cada procedimiento de limpieza y verificación del mismo, teniendo en cuenta los límites aceptados para cada sector en particular. A su vez, Gibbs y col. (2014) demuestran una correlación entre las mediciones de bioluminiscencia de ATP y la microbiología cuantitativa para seis microorganismos importantes para las infecciones asociadas a la atención médica, entre ellos *Cándida albicans* wild type, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, entre 10^4 y 10^8 UFC/ml.

El monitoreo y la evaluación de la limpieza de las superficies son prioridades en la formulación de un programa de saneamiento integrado. Aunque el método de recuento en placa ha sido el método tradicional para evaluar la limpieza de las superficies en contacto con alimentos, las desventajas de este método radican en el largo tiempo necesario para obtener un recuento microbiano y que no se pueden detectar residuos no microbianos. Los resultados aquí obtenidos, en concordancia con gran cantidad de reportes previos, indican que la prueba de bioluminiscencia de ATP es un método confiable para la verificación de la limpieza y puede correlacionarse con el método de recuento en placa entre las 10^4 UFC/ml o 10^5 UFC/ml y las 10^8 UFC/ml. Sin embargo, la prueba de bioluminiscencia del ATP no da una indicación de los tipos de microorganismos presentes en las superficies de contacto con alimentos. En ese caso, las pruebas microbiológicas son útiles para determinar los tipos de bacterias recuperadas, ya que proporcionan un perfil microbiano de la superficie para ayudar en los programas de saneamiento adecuados. A su vez, existen limitaciones entre este trabajo y las aplicaciones del método de bioluminiscencia en superficies de trabajo. Este estudio fue realizado en condiciones de laboratorio con cultivos puros para determinar la correlación entre las medidas de RLU y aquellas de la técnica microbiológica, por lo tanto, no se consideró la existencia de residuos orgánicos que pudieran encontrarse en la superficie. Además, no se realizaron ensayos de hisopado por lo que será necesario que al momento de poner en práctica el método, se establezca el porcentaje de recuperación con los hisopos a utilizar en este sistema para el muestreo de superficies.

La detección de ATP por bioluminiscencia ha demostrado ser una herramienta útil para verificar la limpieza de superficies luego de la implementación de un POES, siendo tan efectivo como el recuento en placa. Existen costos asociados a cada uno de los métodos, relacionados a la compra de equipamientos, consumibles y a los salarios del personal con diferentes niveles de capacitación. Los kits de ATP se venden por US\$ 500-1200, los hisopos tienen un costo individual de entre 4 y 6 dólares cada uno. Requieren únicamente una persona que realice el hisopado y tome nota del valor de bioluminiscencia medido, y esa persona no es necesario que posea un elevado nivel de entrenamiento. Por otro lado, el método microbiológico requiere una gran cantidad de equipamiento específico, que costaría miles de dólares para instalar; sin embargo,

muchas industrias se encuentran ya equipadas, por lo que los costos para llevar a cabo estos ensayos son significativamente menores. A diferencia de la persona que realiza el frotis que no necesita un alto nivel de capacitación, la microbiología cuantitativa también requiere al menos una persona altamente capacitada para supervisar el análisis de laboratorio (Gibbs y col., 2014).

Se busca que el presente trabajo sirva como punto de partida para la producción nacional de un kit de bioluminiscencia y así disminuir la brecha de costos entre ambos métodos, beneficiando a aquellas industrias que no son capaces de acceder a los mismos o de utilizarlos de manera rutinaria, influyendo en la utilización específica de cada uno y el aprovechamiento de las ventajas que cada uno brinda. La implementación de tecnologías rápidas permitiría a las empresas ahorrar costos y aceleraría el lanzamiento de productos (Chollet y Ribault, 2012). En cuanto a la selección de un método apropiado para el análisis microbiológico, se debe resaltar que no existe uno que sea 100 % sensible y 100 % específico que pueda brindar resultados en corto tiempo y a bajo costo. Ambos métodos poseen ventajas y desventajas, el desafío es elegir el método que cumple la mayor cantidad de las características para el contexto práctico del usuario. Las ventajas deben ser explotadas al máximo y las desventajas deben ser reconocidas (Jasson y col., 2010).

Aunque los residuos de alimentos pueden no ser inherentemente peligrosos, su presencia indica que una superficie no se ha limpiado adecuadamente y tiene el potencial de contener material peligroso. Además, los residuos de alimentos proporcionan una fuente de nutrientes para el posterior crecimiento de microorganismos (Leon y Albercht, 2007). Esta prueba valida rápidamente los procedimientos efectivos de limpieza y saneamiento. Como prueba de monitoreo de saneamiento, se ha utilizado con éxito para monitorear puntos críticos de control que son relevantes para los planes de HACCP. La seguridad microbiológica de los productos alimenticios está fuertemente relacionada con las propiedades higiénicas del entorno de procesamiento. En tales condiciones, la aplicación de métodos de saneamiento convenientes se vuelve obligatoria para la seguridad del producto final. La evaluación de la eficiencia de estos métodos es necesaria para la verificación de dichos procesos.

Varios tipos de superficies como plástico, acero inoxidable, vidrio y madera son utilizadas hoy en día en la industria alimentaria. Estas superficies están sujetas a la

contaminación con microorganismos, algunos de los cuales son capaces de formar biofilms. La contaminación de las superficies depende de sus propias características como suavidad, rugosidad, porosidad o irregularidad, y de su estado, por ejemplo, antes o después del proceso de limpieza, nueva o vieja, seca o mojada (Rached y col., 2013). Además, en la industria alimentaria, la contaminación de superficies con microorganismos es a veces necesaria como la superficie de los estantes de madera utilizados para la maduración del queso (Mariani y col., 2007), o para la producción de vinagre (Gullo y col., 2009). Sin embargo, en ambos casos, deliberada o indeseada, un método para la recuperación de microorganismos de las diferentes superficies es necesario como una herramienta para la protección de la salud del consumidor. Los procesos basados en HACCP son ahora ampliamente utilizados para el control de peligros microbiológico y la prevención de problemas de seguridad alimentaria. De acuerdo con este método preventivo, la utilización de métodos de bioluminiscencia es de gran importancia como una de las herramientas para verificar las buenas prácticas de higiene y para mantener un alto nivel de producción higiénica de alimentos.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo indican que el método desarrollado para la detección y cuantificación de ATP cumple con los requisitos específicos para su uso y es comparable a aquellos kits disponibles para esta aplicación.

6. Conclusiones

Teniendo en cuenta los objetivos planteados al comienzo del trabajo y los resultados obtenidos, se puede concluir que:

- Se desarrolló un método de determinación de ATP por bioluminiscencia comparable con los kits disponibles en el mercado para la verificación de limpieza.
- Tanto el sistema con reactivos Sigma® como AAT Bioquest® poseen buena linealidad y repetibilidad, diferenciándose principalmente en el límite de detección (1 fmol ATP el primero y 15 fmol ATP el segundo).
- La utilización de los tensioactivos DTAB/TCA fue efectiva para la extracción del ATP intracelular.
- Existe una correlación entre el método de recuento en placa y el método de bioluminiscencia de ATP con reactivos AAT Bioquest®, siendo esta relación lineal entre las 10^5 UFC/ml y las 10^8 UFC/ml en *Staphylococcus aureus*, y entre las 10^4 UFC/ml y las 10^8 UFC/ml para *Escherichia coli* y *Cándida albicans*.
- El método de bioluminiscencia no es sensible por debajo de las 10^4 UFC/ml.

7. Bibliografía

- Addanki S, Sotos JF, Rearick PD (1966). Rapid determination of picomole quantities of ATP with a liquid scintillation counter. *Analytical Biochemistry*, 14:261.
- ANMAT (2014). Análisis microbiológico de los alimentos: Metodología analítica oficial. *Microorganismos indicadores*, Volumen 3.
- Ansehn S, Lundin A, Nilsson L, Thore A (1979). Detection of bacteriuria by a simplified luciferase assay of ATP. *International Symposium on Analytical*.
- Branchini BR, Murtiashaw MH, Magyar RA, Anderson SM (2000). The role of lysine 529, a conserved residue of the acyl-adenylate-forming enzyme superfamily, in firefly luciferase. *Biochemistry*, 39:5433–5440.
- Branchini BR, Southworth TL, Khattak NF, Michelini E, Roda A (2005). Red- and green-emitting firefly luciferase mutants for bioluminescent reporter applications. *Analytical Biochemistry*, 345:140–148.
- Chollet R, Ribault S (2012). Use of ATP Bioluminescence for Rapid Detection and Enumeration of Contaminants: The Milliflex Rapid Microbiology Detection and Enumeration System. *Bioluminescence – Recent Advances in Oceanic Measurements and Laboratory Applications*, Dr. David Lapota (Ed.), ISBN 978-953-307-940-0, In Tech.
- Conti E, Franks NP, Brick P (1996). Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure*, 4:287–298.
- Davey ME, O’Toole GA (2000). Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64:847–867.
- Davidson CA, Griffith CJ, Peters AC, Fielding LM (1999). Evaluation of two methods for monitoring surface cleanliness – ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing. *Luminescence*, 14:33–8.
- De Luca M, McElroy WD (1974). Kinetics of the Firefly Luciferase Catalyzed Reactions. *Biochemistry*, 13921:925.
- Eed HR, Abdel-Kader NS, El Tahan MH, Dai T, Amin R (2016). Bioluminescence-Sensing Assay for Microbial Growth Recognition. *Journal of Sensors*, 1492467.

- FDA Food and Drug Administration Validation of Cleaning Processes (7/93). Guide to inspections validation of cleaning processes (last updated 25/11/14).
- Fox J (2008). Applied Regression Analysis and Generalized Linear Models. Sage Thousand Oaks, CA, second edition.
- Fraga H (2008). Firefly luminescence: a historical perspective and recent developments. Photochemical and Photobiological Sciences, 7146:158.
- Gibbs S, Sayles H, Chaika O, Hewlett A, Colbert E. M, Smith Ph W (2014). Evaluation of the relationship between ATP bioluminescence assay and the presence of organisms associated with healthcare-associated infections. Healthcare Infection, 19101:107.
- Gullo M, De Vero L, Giudici P (2009). Acetobacter pasteurianus selected strain and acetic acid bacteria species succession in traditional balsamic vinegar. Applied and Environmental Microbiology, 75:2585–2589.
- Hoffner S, Jimenez-Misas C, Lundin A (1999). Improved extraction and assay of mycobacterial ATP for rapid drug susceptibility testing. Luminescence, 14:255–261.
- INAB (2012). Guide to method validation for quantitative analysis in chemical testing laboratories. PS15 www.inab.ie.
- Invitrogen (2005). ATP Determination Kit (A22066). Product Information.
- Ilyina AD, Cerda FR, Estrada BC, Dukhovich AF, Gaona LGJ, Garza GY, Rodríguez MJ (1998). Sistema Bioluminiscente Luciferina-Luciferasa de las Luciérnagas. Parte I: Propiedades Bioquímicas y Catalíticas de la Enzima Luciferasa. Journal of the Mexican Chemical Society, 42,3:99-108.
- IUPAC Technical Report (2002). Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation Methods of Analysis. Pure and Applied Chemistry, 74,5:835–855.
- Jasson V, Jacxsens L, Luning P, Rajkovic A, Uyttendaele M (2010). Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. Food Microbiology, 27:710-730.

- Larson EL, Aiello AE, Gomez-Duarte C, Linc SX, Leed L, Della-Latta P, Lindhard C (2003). Bioluminescence ATP monitoring as a surrogate marker for microbial load on hands and surfaces in the home. *Food Microbiology*, 20735:739.
- Law KA, Derrik JP, Higson SPJ (2003). Initial investigations into the ultrasonic lysis of microbial cells for the release of adenosine triphosphate. *Analytical Biochemistry*, 317:266–267.
- Leclaire J (2011). Assessment of a novel ATP monitoring device. Instrument Assessment Report, Hygiene International Ltd.
- Leon MB, Albercht JA (2007). Comparison of adenosine triphosphate (ATP) bioluminescence and aerobic plate counts (APC) on plastic cutting boards. *Journal of Foodservice*, 18:145-152.
- Lundin A (2000). Use of firefly luciferase in ATP- related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Methods in Enzymology*, 305346:371.
- Lundin A (1984). Extraction and automatic luminometric assay of ATP, ADP and AMP. *Analytical Applications of Bioluminescence and Chemiluminescence*, 491-501.
- Lundin A, Thorne A (1975). Analytical information obtainable by evaluation of the time course of firefly bioluminescence in the assay of ATP. *Analytical Biochemistry*, 6647:63.
- Mariani C, Briandet R, Chamba JF, Notz E, Carnet-Pantiez A, Eyoug RN, Oulahal N (2007). Biofilm ecology of wooden shelves used in ripening the French raw milk smear cheese Reblochon de Savoie. *Journal of Dairy Science*, 90:1653–1661.
- Martinon A, Cronin UP, Quealy J, Stapleton A, Wilkinson MG (2012). Swab sample preparation and viable real-time PCR methodologies for the recovery of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* or *Listeria monocytogenes* from artificially contaminated food processing surfaces. *Food Control*, 24:86–94.
- McElroy WD (1947). The energy source for bioluminescence in an isolated system. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 33:342.

- McFarland J (1907). Nephelometer: An Instrument for Estimating the Number of Bacteria in Suspensions Used for Calculating the Opsonic Index and for Vaccines. *Journal of the American Medical Association*, 14:1176-1178.
- Miranda J (2000). Evaluación de la incertidumbre en datos experimentales. Instituto de Física, UNAM, México.
- Montgomery DC, Peck EA, Vining GG (2001). *Introduction to Linear Regression Analysis*. 3rd Edition New York, New York: John Wiley & Sons.
- Nakatsu T, Ichiyama S, Hiratake J, Saldanha A, Kobashi N, Sakata K, Kato H (2006). Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. *Nature*, 440:372–376.
- Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H, Opsteegh, M, Langelaar M, Threlfall J, Scheutz F (2010). Food-borne diseases—the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, 139:S3–S15.
- Omidbakhsh N, Ahmadpour F, Kenny N (2014). How Reliable Are ATP Bioluminescence Meters in Assessing Decontamination of Environmental Surfaces in Healthcare Settings? *Plos One*, 9(6):e99951.
- Osimani A, Garofalo C, Clementi C, Tavoletti S, Aquilanti L (2014). Bioluminescence ATP Monitoring for the Routine Assessment of Food Contact Surface Cleanliness in a University Canteen. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11:10824-10837.
- Öz P, Özgen Arun Ö (2019). Evaluating the performance of ATP bioluminescence method by comparison with classical cultural method. *Food and Health*, 5(2):77-82.
- Petruzzelli A, Blasi G, Masini L, Calza L, Duranti A, Santarelli S, Fisichella S, Pezzotti, G, Aquilanti L, Osimani A (2010). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in salami manufactured in the Marche Region (central Italy). *Journal of Veterinary Medical Science*, 72:499–502.

- Prioli RP, Tanna A, Brown IN (1985). Rapid methods for counting mycobacteria- comparison of methods for extraction of mycobacterial adenosine triphosphate (ATP) determined by firefly luciferase assay. *Tubercle*, 6:99-108.
- Promega (2009). ENLITEN[®] rLuciferase/luciferín Reagent. A Bioluminescence Detection Reagent for ATP Measurement. Technical Bulletin.
- Promega Corporation, Wood K, Hannah R, Moravec A, Ungría López J (2009). Método mejorado para la detección de ATP, ES 2 325 808 T3. Traducción de patente Europea.
- Rached I, Aviat F, Michel V, Le Bayon, Gay-Perret P, Kutnik M, Fédérighi M (2013). Methods for Recovering Microorganisms from Solid Surfaces Used in the Food Industry: A Review of the Literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10:6169-6183.
- Raia D, Cannova L, Provenzano S, Santangelo O, Piazza D, Alagna E, Bonanno V, Aprea L, Firenze A (2018). Comparison between adenosine triphosphate bioluminescence and aerobic colony count to assess surface sanitation in the hospital environment. *Epidemiology Biostatistics and Public Health*, 15:e127110.
- Rathore AS, Branning R, Cecchini D (2007). Design space for biotech products. *BioPharm International*, 20(4):36-40.
- Redsvén I, Kymäläinen HR, Pesonen- Leinonen E, Kuisma R, Ojala- Paloposki T, Hautala M, Sjöberg AM (2007). Evaluation of a bioluminescence method, contact angle measurements and topography for testing the cleanability of plastic surfaces under laboratory conditions. *Applied Surface Science* 253:5536-5543.
- Rezquellah W (2015). Validación de los procesos de limpieza en la industria farmacéutica, mediante la aplicación de análisis de riesgo, seguridad toxicológica y UPLC. Universidad de Barcelona, Facultad de Farmacia.
- Rivera E (2013). Respuestas a los 5 asuntos más comunes sobre validación de limpieza en los equipos de fabricación farmacéutica. Seminario Steris. Buenos Aires, Argentina.

- Romanova NA, Brovko LY, Ugarova NN (1997). Comparative assessment of methods of intracellular ATP extraction from different types of microorganisms for bioluminescent determination of microbial cells. *Applied Biochemistry Microbiology*, 33(3):306–311.
- Sáez Ruiz SJ, Avila LF (2001). *Incertidumbre de la medición: teoría y práctica*. LyS Consultores CA. Maracay – Estado Aragua.
- Sansebastiano G, Zoni R, Bigliardi L (2006). *Cleaning and Disinfection Procedures in the Food Industry General Aspects and Practical Applications*. Food Safety, 253:280.
- Seliger H, Buck JB, Fastie WG, McElroy WD (1964). The spectral distribution of firefly light. *Journal of General Physiology*, 48:95–104.
- Seliger H, McElroy WD (1964). The colors of firefly bioluminescence: enzyme configuration and species specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 52:75–81.
- Shama G, Malik DJ (2013). The uses and abuses of rapid bioluminescence- based ATP assays. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 216:115-125.
- Shaw PJA (2003). *Multivariate statistics for the Environmental Sciences*. Hodder-Arnold: London UK.
- Simoes M, Simoes LC, Vieira MJ (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology*, 43:573–583.
- Sigma® Chemical Company (1991). *Bioluminiscent determination of ATP with Luciferase-luciferin*. Technical Bulletin BL-100.
- Silliker Report (2010). *A Comparative Study of Commercial ATP Hygiene Monitoring Systems*. Hygiena.
- Temprano G, D´Aquino M (2004). Una Reacción de Bioluminiscencia que detecta Trifosfato de Adenosina (ATP) como determinante de Suciedad Biológica. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 23(3):373-5.

- Thompson JF, Geoghegan KF, Lloyd DB, Lanzetti AJ, Magyar RA, Anderson SM, Branchini BR (1997). Mutation of a protease-sensitive region in firefly luciferase alters light emission properties. *Journal of Biological Chemistry*, 272:18766–18771.
- VanDyke K, Stitzel R, McLella T, Szustkie C (1969). An automated procedure for sensitive and specific determination of ATP. *Clinical Chemistry*, 15:3–14.
- Wildbrett, G (2000). *Limpieza y Desinfección en la Industria Alimentaria*. Editorial Acribia.
- Zako T, Ayabe K, Aburatani T, Kamiya N, Kitayama A, Ueda H, Nagamune T (2003). Luminescent and substrate binding activities of firefly luciferase N-terminal domain. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins & Proteomics*, 1649:183–189.