



Universidad Autónoma del Estado de México  
Instituto Interamericano de Tecnología y Ciencias del Agua



“Creación y validación de un instrumento para estudiar la percepción  
del riesgo por exposición a bacterias en estado viable pero no  
cultivable (VBNC)”

Tesis para obtener el título de:

Maestra en Ciencias del Agua

Presenta: Joshua Ariel Solano Gómez

Tutora académica:

María del Carmen Jiménez Moleón

Tutores Adjuntos:

Dra. Mercedes Lucero Chávez

Dr. José Caballero Viñas

Toluca, Estado de México

Noviembre, 2022

## **Agradecimientos**

Agradezco a mi familia por su apoyo constante y su comprensión durante mis estudios de maestría. También, a los miembros de mi comité evaluador por su tiempo, consejos y enseñanzas.

De igual forma, el apoyo del Instituto Interamericano de Tecnología y Ciencias del Agua de la Universidad Autónoma del Estado de México por permitirme el uso de las instalaciones y por el acceso a las herramientas de investigación.

Expreso mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada con el número de CVU 968940 durante mi maestría en Ciencias del Agua.

## Resumen

Hoy en día cobra relevancia la percepción social de los riesgos microbiológicos ya que tiene un papel importante que va desde la gestión y las estrategias de comunicación de riesgos hasta la respuesta a las emergencias sanitarias. Puesto que al medir esta percepción se identifica si la población se considera realmente expuesta a un peligro y determina su comportamiento ya que si la población no considera riesgoso un comportamiento o un acontecimiento no se prepara o actúa en consecuencia, para minimizar sus efectos, tal como se vio al inicio de la pandemia con las personas que eran escépticos la existencia de la enfermedad COVID-19.

En este caso, el enfoque fue sobre las bacterias patógenas capaces de ingresar al estado VBNC, por sus siglas en inglés (*Viable but nonculturable*), el cual es una estrategia de supervivencia que usan los microorganismos ante condiciones ambientales estresantes como altos o bajos niveles de pH, exposición a luz UV, metales pesados o conservadores de alimentos, desinfectantes, productos de limpieza, sales inorgánicas y otros.

Durante el estado VBNC las bacterias son incapaces de formar colonias en medios de cultivo rutinarios, causando su subestimación en diferentes matrices, además, al recuperar las condiciones favorables tienen la capacidad de resucitar a un estado cultivable recuperando la capacidad de cultivo y volviendo a la normalidad los procesos fisiológicos y metabólicos. Sin embargo, solo pueden resucitar dentro de un período de tiempo específico según características de la bacteria, las condiciones que indujeron el estado VBNC y las condiciones de resucitación.

Las características de las bacterias VBNC en campos de salud pública las incluyen como riesgos para la salud humana, puesto que se les asocia con enfermedades transmitidas por agua, bebidas y alimentos, ya sean desinfectados, procesados o frescos; lo cual hace importante conocer la percepción de riesgo de la población para entender como identifica el peligro al que están expuestos.

Para recabar estos datos y debido a que no existía ningún cuestionario existente sobre la percepción de riesgo por exposición a bacterias en estado VBNC esta investigación tuvo el objetivo de diseñar y validar un cuestionario para analizar la percepción de riesgo, en

personas mayores de 18 años, por exposición a bacterias VBNC y la predisposición a adquirir hábitos más seguros microbiológicamente tras ser informados sobre los patógenos que pueden ingresar a ese estado.

Se proporcionó un instrumento cuyo diseño y validación servirá como base para medir los factores que influyen en la percepción de riesgo por exposición a bacterias VBNC a través de diferentes fuentes que incluyen agua y biosólidos, también evalúa los hábitos de la población para verificar otras posibles fuentes de exposición como los alimentos o utensilios de cocina, en los cuales se pueden encontrar por una mala higiene. Este cuestionario brinda información básica sobre estas bacterias incentivando a la población a modificar su percepción de riesgo y mostrar mayor disposición a adoptar hábitos que sean más seguros desde un punto de vista microbiológico.

Este cuestionario servirá para futuras investigaciones en las ciencias de agua para conocer la postura de la población en cuanto a la seguridad microbiológica percibida el agua y biosólidos.

Para diseñar el cuestionario se inició con la búsqueda bibliográfica al consultar investigaciones y publicaciones de fuentes confiables, reconocidas y actuales relacionadas con el tema de interés que, además resultaron ser pertinentes y sirvieron para rectificar las variables más relevantes, guiaron la selección del diseño experimental, método de estudio y las limitantes que han sido reportadas por otros investigadores.

El cuestionario se desarrolló de acuerdo con los objetivos propuestos y con los antecedentes presentados. Recabará información sobre las variables sociodemográficas de los encuestados, incluyendo: género, edad, estado civil, educación, localización y ocupación (con especial énfasis en sí tienen relación con la seguridad microbiológica en áreas de salud, biología o ingeniería etc.).

Se empleó la escala Likert con cinco puntos para evaluar las respuestas, puesto que es el método más común para medir actitudes debido a su facilidad de construcción, a que es adaptable y fiable. En esta escala se les pide a las personas que indiquen el nivel de acuerdo o desacuerdo alusivo a la idea señalada en una clave de respuesta que consta de cinco puntos que va desde un total desacuerdo, un promedio y un acuerdo total. Las respuestas se establecen como números enteros, posteriormente, se suman y se determina el grado en que el encuestado muestra el rasgo que está siendo evaluado.

La validación consistió en la evaluación del contenido del cuestionario por parte un grupo de expertos los cuales se selección según su experiencia académica y laboral en relación con el tema, en esta investigación se envió el cuestionario a un panel de 15 expertos con experiencia en áreas de la salud, ciencias biológicas y ciencias del agua, e ellos siete respondieron.

Como resultado se obtuvo un cuestionario con 59 preguntas una sección donde se informa a la población sobre las generalidades de las bacterias en estado VBNC y otra donde se les sugiere mejorar sus hábitos de higiene para prevenir la exposición y así reducir los daños que puedan causar estos microorganismos.

A partir de esta investigación se obtuvieron como producción escrita la publicación del artículo de comunicación corta Viable but Non-Cultivable Bacteria and their Implications for Microbiological Safety (Jiménez-Moleón, M. D. C., & Solano-Gómez, J. A. (2022): Open Journal of Environmental Biology 7 (1): 014- 016); el envío a una revista indexada, Ciencia Ergo Sum, del artículo de divulgación Bacterias viables pero no cultivables (VBNC): Cuando los patógenos están presentes pero no son detectados por los análisis convencionales; y sigue en elaboración el artículo Diseño, desarrollo y validación de un cuestionario para medir percepción de riesgo por exposición a bacterias en estado viable pero no cultivable (VBNC). Por lo que se está presentando la tesis de grado en su modalidad “Por artículos”.

## Abstract

Now a days, the social perception of microbiological risks is becoming relevant, since it has an important role that goes from risk management and communication strategies to response to health emergencies. By measuring this perception, it is identified whether the population considers itself really exposed to a danger and determines its behavior, because if the population does not consider a behavior or an event to be risky, it does not prepare or act in consequence, to minimize its effects, such as it was seen at the pandemic with people who were skeptical of the existence of the COVID- 19 disease.

In this case, the focus was on pathogenic bacteria capable of entering in the Viable but Nonculturable (VBNC) state, which is a survival strategy used by microorganisms against stressful environmental conditions as high or low pH levels, exposure to UV light, heavy metals of food preservatives, disinfectants, cleaning products, inorganic salts, and others.

During the VBNC state, the bacteria are unable to form colonies in routine culture media, causing their underestimation in different matrices. In addition, when favorable conditions are recovered, they can resuscitate to a cultivable state, recovering the culture capacity and returning to normality. However, they can only be resuscitated within a specific period depending on the characteristics of the bacteria, the conditions that induced the VBNC state and the resuscitation conditions.

The characteristics of VBNC bacteria in public health fields include them as risks to human health, because they are associated with diseases transmitted by water, drinks and food disinfected, processed or fresh; which makes it important to know the risk perception of the population to understand how they identify the danger to which they are exposed.

To collect these data and because there was no existing questionnaire on the risk perception to exposure to VBNC bacteria, this research had the objective of designing and validating a questionnaire to analyze the risk perception, in people over 18 years, by exposure to VBNC bacteria and their predisposition to acquire microbiological safer habits after being informed about the pathogens that can enter that state.

A designed and validated instrument was provided that will serve as a basis to measure the factors that influence the risk perception to exposure to VBNC bacteria through different sources that include water and biosolids, it also evaluates the habits of the population to verify other possible exposure sources such as food or kitchen utensils, in which they can

be found due to poor hygiene. This questionnaire provides basic information about these bacteria, encouraging the population to modify their risk perception and show greater willingness to adopt safer habits from a microbiological point of view.

This questionnaire will serve for future research in water sciences to know the position of the population regarding the perceived microbiological safety of water and biosolids.

For design the questionnaire a bibliographic search began consulting research and publications from reliable, recognized, and recent sources related to the topic of interest that, in addition, they were pertinent and served to rectify the most relevant variables, guided the selection of the experimental design, study method and the limitations that have been reported by other researchers.

The questionnaire was developed in accordance with the proposed objectives and with the information presented. It will collect information on the sociodemographic variables of the respondents, including: gender, age, marital status, education, location and occupation (with special emphasis on whether they are related to microbiological safety in the areas of health, biology or engineering, etc.).

The Likert scale with five points was used to evaluate the responses, because it is the most common method to measure attitudes due to its ease of construction, it is adaptable and reliable. In this scale, people are asked to indicate the level of agreement or disagreement alluding to the idea indicated in a response key that consist of five points that range from totally disagree, average, and totally agree. The answers are established as whole numbers, subsequently, they are added and the degree in which the respondent shows the trait that is being evaluated is determined.

The validation consisted in the evaluation of the content of the questionnaire by a group of experts who were selected according to their academic and work experience in relation to the subject, in this investigation the questionnaire was sent to a panel of 15 experts with experience in areas of health, biological sciences and water sciences and seven responded.

As a result, a questionnaire of 59 questions was obtained, a section where the population is informed about the generalities of VBNC bacteria and another, where they are suggested to improve their hygiene habits to prevent exposure and thus reduce the damage they can caused by these microorganisms.

From this research were obtained as written production the publication of the short communication article *Viable but Non-Cultivable Bacteria and their Implications for Microbiological Safety* (Jiménez-Moleón, M. D. C., & Solano-Gómez, J. A. (2022): *Open Journal of Environmental Biology* 7 (1): 014- 016); the submission to an indexed journal, *Ciencia Ergo Sum*, of the disclosure article *Bacterias viables pero no cultivables (VBNC): Cuando los patógenos están presentes pero no son detectados por los análisis convencionales*; and the article *Diseño, desarrollo y validación de un cuestionario para medir percepción de riesgo por exposición a bacterias en estado viable pero no cultivable (VBNC)* is still in preparation. Therefore, the degree thesis is being presented in its “By Articles” modality.



# Índice

Agradecimientos.....	1
Resumen.....	2
Abstract.....	5
Capítulo I. Protocolo actualizado .....	9
I.1 Introducción .....	9
I.2 Antecedentes.....	10
I.3 Justificación contextual y científica: .....	19
I.4 Hipótesis: .....	20
I.5 Objetivo general y objetivos específicos .....	21
I.5.1 Objetivo general:.....	21
I.5.2 Objetivos específicos:.....	21
I.6 Materiales y métodos:.....	22
I.6.1 Revisión bibliográfica .....	23
I.6.2 Diseño del cuestionario.....	23
I.6.3Validación del cuestionario .....	24
I.7 Programa de actividades.....	25
I.8 Recursos disponibles.....	25
I.9 Referencias.....	26
Capítulo II. Artículo especializado.....	33
II.1 Acuse de recibo .....	33
II.2 Carta de aceptación.....	34
II.3 Texto .....	35
III. Anexos.....	38
III.1.Segundo artículo especializado (enviado). Bacterias viables pero no cultivables (VBNC): Cuando los patógenos están presentes pero no son detectados por los análisis convencionales.....	38
III.1.1.Acuse de recibo .....	38
III. 1.2. Texto .....	39
III.2 Tercer artículo especializado (en elaboración): Diseño, desarrollo y validación de un cuestionario para evaluar la percepción de riesgo por exposición a bacterias viables pero no cultivables (VBNC) .....	50

# Capítulo I. Protocolo actualizado

## I.1 Introducción

Los riesgos se refieren a la probabilidad de enfrentarse a un peligro o de sufrir daños, mientras que a su interpretación y juicios subjetivos se les conoce como percepción de riesgo (Cori *et al.*, 2020, Lechowska, 2018 y Paek & Hove, 2017). Los estudios de percepción de riesgos sirven para conocer las opiniones de las personas y su comportamiento ante el peligro, quienes tienen una mayor percepción de riesgo tienden a mostrar conductas preventivas y quienes lo perciben en menor medida tienden a ser más descuidados (Ding *et al.*, 2020).

Al conocer cómo se identifica el riesgo en una población y su relación con los datos sociodemográficos permite que, a través de un análisis, se prepare la gestión de riesgo pertinente para eliminar y prevenir el problema en cuestión (Rohrmann, 2008). Estas acciones incluyen la adopción de conductas recomendadas por expertos, así como la acción conjunta con las autoridades, la introducción de leyes y reglamentos, además de promover una comunicación clara y puntual con información científica (Wen *et al.*, 2019).

En esta investigación se desarrolló un cuestionario que permite evaluar la percepción de riesgo respecto a la seguridad microbiológica puesto que, anteriormente, la detección de bacterias en alimentos, agua y otros ambientes, se basaba en el uso de técnicas dependientes de medios de cultivo los cuales no son completamente fiables y pueden conducir a la subestimación de patógenos aumentando el riesgo de exposición a ellos (Ramamurthy *et al.*, 2014). Esto ocurre porque las bacterias han desarrollado técnicas para sobrevivir ante condiciones ambientales adversas, como lo es el estado viable pero no cultivable (VBNC por sus siglas en inglés *Viable but nonculturable*) en el cual las células pierden la capacidad de dividirse y formar colonias en medios de cultivo estándar, pero se mantienen metabólicamente activas (Oliver, 2005 y Xu *et al.*, 1982), en algunos casos continúan expresando genes de virulencia y tienen la posibilidad de resucitar al recuperar las condiciones ambientales favorables (Dong *et al.*, 2020 y Roszak *et al.*, 1984).

Ya que este tipo de microorganismos implican un riesgo para la salud humana, están profundamente relacionados con el agua, biosólidos y otros medios que están en contacto directo con las personas e incluso, se relacionan con los hábitos de higiene al consumir alimentos y bebidas durante este estudio se diseñó y validó un cuestionario que mide la percepción de riesgo de la población mayor de 18 años, por exposición a bacterias VBNC

a través de diferentes medios que involucran el agua, biosólidos, entre otros y hábitos de la población, también evalúa la predisposición a adquirir hábitos microbiológicamente más seguros tras ser informados sobre los patógenos que pueden ingresar a ese estado. Este instrumento permite identificar dos grupos objetivo: (1) población general y (2) personal de ciencias de la salud, biológicas y del agua.

## **I.2 Antecedentes**

El término riesgo se ha definido de varias formas a través de los años, pero en general se le considera como una evaluación de la posibilidad de que ocurra un evento y mide la gravedad del daño que puede causar. Por otro lado, la percepción de riesgo se entiende como la evaluación social instintiva o subjetiva de los peligros a los que se puede estar expuesto e incluye varios efectos que las personas asocian con una causa particular; en otras palabras, son formas de entender el mundo (Cori *et al.*, 2020 y Lechowska, 2018).

Las percepciones se ven afectadas y difieren por factores como: las características individuales, sociales, culturales, por creencias, experiencias, el interés personal, la voluntariedad, el conocimiento, la visibilidad y la confianza (Cori *et al.*, 2020 y Neuburger & Egger, 2020). Una forma de generalizar y agrupar la información anterior es con tres perspectivas propuestas por Siegrist y Árvai (2020) que son: las características de los peligros, las características de los perceptores y la aplicación de estrategias para informar al respecto.

Un método que se emplea comúnmente para recabar este tipo de información es la encuesta, que se apoya en un instrumento que es el conocido cuestionario, el cual puede incluir una serie de preguntas abiertas y/o cerradas respecto a lo que se desea medir (Pozzo *et al.*, 2018). Con los resultados de las encuestas y a partir de la estimación del peligro, se puede determinar la gestión de riesgo, a la cual se le refiere como las actividades de los individuos o de las autoridades para minimizar o erradicar el origen de los eventos peligrosos a tal grado que la sociedad lo considere aceptable y que permita asegurar su control, monitoreo y la comunicación idónea (Rohrmann, 2017).

Al identificar la percepción de riesgo dentro de una población es posible proponer medidas para la promoción y aceptación de los comportamientos recomendados por expertos para combatir o prevenir los riesgos, por ejemplo, ante el riesgo de exposición a microorganismos se fomentan las prácticas de higiene como el correcto lavado de manos u otros como la vacunación (Cori *et al.*, 2020 y Paek & Hove, 2017). También, otorga una referencia sobre

las preferencias de la población para los gobiernos, la promoción de la publicidad o la comunicación de riesgos a través de información científica que frene informes engañosos y la introducción de leyes y reglamentos pertinentes (Wen *et al.*, 2019).

Hoy en día cobra gran relevancia la percepción social de los riesgos microbiológicos ya que tiene un papel importante que va desde la gestión y las estrategias de comunicación de riesgos hasta la respuesta a las emergencias sanitarias, un claro ejemplo es la actual pandemia por el virus del SARS- CoV- 2 (Cori *et al.*, 2020; Ding *et al.*, 2020 y Neuburger & Egger, 2020), además de las múltiples enfermedades infecciosas provocadas por bacterias, que es el grupo de microorganismos en el que se enfocará este trabajo de investigación.

Para comenzar, en 1982 Xu y colaboradores describieron por primera vez el estado viable pero no cultivable o VBNC, por sus siglas en inglés (*Viable but nonculturable*), el cual es una estrategia de supervivencia para los microorganismos ante condiciones ambientales estresantes, durante el proceso las bacterias son incapaces de formar colonias en medios de cultivo rutinarios, pero siguen vivas, y al recuperar las condiciones favorables tienen la capacidad de resucitar a un estado cultivable (Oliver, 2000). Aunque existen algunas excepciones, que son poblaciones bacterianas en las cuales una subpoblación se vuelve VBNC como prevención ante factores estresantes inesperados aun cuando están localizadas en ambientes favorables (Ayrapetyan *et al.*, 2015).

Los factores estresantes que pueden inducir el ingreso a estado VBNC incluyen altas y bajas temperaturas, cambios en el pH, presión por antibióticos, potencial osmótico elevado o reducido, estrés oxidativo, inanición, cloración, exposición a luz ultravioleta, metales pesados o sustancias químicas nocivas (Kan *et al.*, 2019 y Ramamurthy *et al.*, 2014). También, puede ser provocado por conservadores de alimentos, desinfectantes, productos de limpieza, sales inorgánicas y otros (Dong, *et al.*, 2020 y Robben *et al.*, 2018).

Al entrar en estado VBNC la célula sufre ciertos cambios, por ejemplo, alteraciones morfológicas que van desde la reducción de tamaño (Wei & Zhao, 2018), cambios en la composición de la pared celular y de la membrana, incluyendo proteínas, ácidos grasos y peptidoglicano (Muela, *et al.*, 2008). Otras modificaciones son la disminución de la tasa metabólica (Shleeva *et al.*, 2004), los microorganismos muestran mayor resistencia física, química (Signoretto *et al.*, 2000) y a antibióticos, difieren en la expresión genética, cambian sus propiedades de adhesión (Li *et al.*, 2014) y su potencial de

virulencia, ya que algunos no pueden causar enfermedades hasta que recuperan su estado cultivable, aunque otras mantienen su patogenicidad al continuar expresando toxinas (Dong *et al.*, 2020).

No obstante, las bacterias VBNC se diferencian de las células muertas ya que sus membranas no están dañadas y retienen el ADN genómico o plasmídico, mantienen su actividad respiratoria y metabólica, incluso poseen altos niveles de ATP (Oliver, 2005), pero disminuyen el transporte de nutrientes y la síntesis de macromoléculas (Zhao, *et al.*, 2017). A pesar de lo anteriormente expuesto no se replican, por tanto, no son cuantificadas por los métodos convencionales como: número más probable (NMP) o recuento en placa, ya que estas técnicas se basan en recuentos de las colonias bacterianas desarrolladas sobre una placa de Petri, un medio líquido o semisólido, durante la incubación, es decir, en su cultivabilidad.

El hecho de que estas bacterias no se repliquen no significa que sean menos peligrosas dado que, tienen la capacidad de resucitar al perder el factor estresante y encontrarse en condiciones ambientales favorables. De este modo recuperan la capacidad de cultivo y vuelven a la normalidad los procesos fisiológicos y metabólicos. Este proceso fue descrito por Roszak y colaboradores en 1984 en *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli* que había permanecido en estado VBNC. La resucitación se puede desencadenar por factores estimulantes como un aumento en la concentración de nutrientes, incremento o descenso de la temperatura, la presencia de estímulos químicos, el co-cultivo con células huésped (Zhao *et al.*, 2017), autoinductores de *quorum sensing* (sistema de comunicación célula-célula), proteínas activas (factores que promueven la resucitación Rpf, YeaZ y catalasa) (Zhang *et al.*, 2020). Cabe mencionar que las bacterias en estado VBNC solo pueden resucitar dentro de un período de tiempo específico según la especie, la edad bacteriana, las condiciones que indujeron el estado VBNC y las condiciones de resucitación. Si sobrepasan este periodo, las células VBNC aún pueden sobrevivir cierto tiempo, pero al perder la capacidad de resucitar, finalmente mueren (Dong *et al.*, 2020).

Por lo tanto, las características descritas colocan a las bacterias en estado VBNC en campos de salud pública como riesgos para la salud humana, puesto que se les asocia con enfermedades transmitidas por agua (Guo *et al.*, 2020 y Quaglia & Dambrosio, 2018), bebidas y alimentos, ya sean desinfectados, procesados o frescos (Tabla 1). También se

ha reportado su presencia en materiales antimicrobianos como catéteres urinarios (Wilks *et al.*, 2021), entre otros.

**Tabla 1.** Se muestran las bacterias que han sido reportadas y estudiadas en estado VBNC en productos alimenticios.

<b>Productos</b>	<b>Bacteria en estado VBNC</b>	<b>Referencia</b>
<b>Salmón fresco y mariscos</b>	En muestras de <i>Listeria monocytogenes</i> aisladas de este origen expuestas a un ambiente sin agua y a 4°C ingresaron al estado VBNC	Lindbäck <i>et al.</i> , 2009
<b>Salmón ahumado</b>	Identificaron que los desinfectantes a base de amonio cuaternario y peróxido de hidrógeno indujeron el estado VBNC en <i>Listeria monocytogenes</i>	Brauge <i>et al.</i> , 2020
<b>Productos cárnicos de cerdo</b>	La desinfección con agua oxidante electrolizada neutra (NEO) indujo el estado VBNC en <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Yersenia enterocolitica</i> y <i>Escherichia coli</i> O157:H7	Han <i>et al.</i> , 2018
<b>Productos cárnicos de res</b>	Identificaron las bacterias VBNC <i>Bacillus cereus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> y <i>Enterobacteriace</i> en productos frescos y procesados.	El-Aziz <i>et al.</i> , 2018
<b>Productos cárnicos de aves de corral</b>	Identificaron <i>Staphylococcus aureus</i> VBNC en productos frescos y procesados.	El- Aziz <i>et al.</i> , 2018
<b>Huevas de salmón saladas</b>	El proceso de salado indujo el ingreso VBNC en <i>Escherichia coli</i> O157:H7	Makino <i>et al.</i> , 2000
<b>Calamar salado</b>	El proceso de salado indujo el ingreso VBNC en <i>Salmonella enterica</i> Oranienburg	Asakura <i>et al.</i> , 2002

<b>Espinacas</b>	Lavados con cloro indujeron el estado VBNC <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella enterica</i> Thompson	Highmore <i>et al.</i> , 2018
<b>Lechugas</b>	La exposición a bajas temperaturas indujo el estado VBNC en <i>Escherichia coli</i>	Dinu & Bach, 2011
<b>Jugo de uva</b>	La incubación a 4°C indujo el estado VBNC en <i>Shigella flexneri</i> y <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium según el tamaño del inóculo y tiempo de incubación	Nicolò & Guglielmino, 2011
<b>Jugo de naranja</b>	Cambios en la concentración de azúcar y ácido orgánico modificó la viabilidad y cultivabilidad de las células. La adición de aminoácidos indujo el estado VBNC en <i>Escherichia coli</i>	Anvarian <i>et al.</i> , 2018
<b>Productos lácteos (Leche)</b>	La pasteurización a 63.5°C por 30 minutos indujo el estado VBNC en <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas putida</i>	Gunasekera <i>et al.</i> , 2002

El hecho de que su presencia haga que se subestime el número de bacterias viables totales y el riesgo de resucitación, junto con una percepción del peligro deficiente pueden traer consecuencias fatales referentes a la salud y la seguridad microbiológica en humanos.

Por lo que se ha expuesto anteriormente, es importante conocer el estado del arte de cómo se ha estudiado la percepción de riesgo por exposición a microorganismos.

Barret & Feng (2021) evaluaron el efecto de dos planes de estudio: desviación positiva y aprendizaje experimental, referentes a la seguridad alimentaria en la percepción de riesgo y el control conductual percibido en alumnos de nivel secundaria cursando materias de microbiología y agricultura, se les dio seguimiento un año. Aplicaron un cuestionario que recopilaba datos demográficos, 24 preguntas de conocimientos, una sección con preguntas de percepción de riesgo, control conductual percibido e interés y compromiso del estudiante en el cual midieron las respuestas con una escala Likert de cinco puntos y una sección de percepción de la seguridad alimentaria en la vida de los estudiantes donde se usaron

preguntas abiertas. Los resultados mostraron que los dos planes de estudio no causaron variaciones en las respuestas de los alumnos, sin embargo, la materia que cursaban sí influyó, los estudiantes de microbiología tuvieron los puntajes más altos en el cuestionario de conocimientos, pero su puntuación disminuyó después de un año. El estudio muestra la importancia de como proporcionar y promover la retención del conocimiento de la seguridad alimentaria.

Batista *et al.* (2021) evaluaron los conocimientos, las prácticas y la percepción de riesgo de la inocuidad alimentaria por estudiantes de escasos recursos entre 11 y 14 años a través de tres cuestionarios con 11 ítems de conocimiento, 11 de práctica y cinco de percepción de riesgo. Los resultados mostraron que los estudiantes comprenden la importancia de la higiene de manos y de la desinfección de los alimentos, relacionaron la seguridad de los alimentos con la fecha de caducidad, la apariencia y el olor (que considerados como datos poco fiables) y los alumnos mostraron preocupación por el uso de pesticidas y una mayor aceptación a productos orgánicos. Estos resultados pueden ser considerados para proponer acciones contra las enfermedades de transmisión por alimentos.

Quon *et al.* (2021) realizaron una evaluación cuantitativa del riesgo microbiano (QMRA) para estimar los riesgos para la salud asociados con *Legionella* por la inhalación de aerosoles durante la ducha con agua de cisterna de lluvia tras la presencia de huracanes. El riesgo de infección fue calculado con un modelo de dosis- respuesta e indicó un valor mediano de riesgo según la temperatura de la ducha ( $2.5 \times 10^{-6}$  a  $2.5 \times 10^{-4}$ ) y el riesgo anual ( $9.1 \times 10^{-4}$  a  $1.4 \times 10^{-2}$ ). Los resultados fueron comparados con la percepción de riesgo evaluada con el uso de encuestas las cuales mostraron poco conocimiento de la transmisión de patógenos en aerosol a través del rocío de la ducha y se dividieron en dos grupos, los de altos ingresos consideraban su agua segura y los de bajos ingresos “algo segura”. Los autores sugirieron varias medidas para la mitigación de los riesgos y propusieron la educación pública como una herramienta importante para mejorar la conciencia sobre el riesgo de infección con la bacteria *Legionella*, así como el desarrollo de políticas públicas y gestión de calidad del agua.

Brouwer *et al.* (2020) realizaron una encuesta en los Países Bajos para conocer la percepción de riesgo con relación al agua potable, ya que comúnmente en esta región no usan el proceso de cloración para su desinfección. El cuestionario fue aplicado vía telefónica a 24 personas e incluyó 30 preguntas con respuestas en escala Likert de cinco puntos. Los resultados mostraron que el 90% de la población consideraba segura el agua



potable, 23% expresaba incertidumbre por la calidad del agua principalmente les preocupaban la posible contaminación por antibióticos, pesticidas, residuos industriales y otros, los resultados indicaron que el 38% de los encuestados desconocen si hay suficiente información sobre la calidad del agua y el 20% considero que era insuficiente, este porcentaje se relacionó a mujeres jóvenes con bajo nivel de estudios.

Thomas *et al.* (2020) evaluaron el conocimiento de los dueños de mascotas referente a la seguridad alimentaria, las prácticas de manipulación de los alimentos para mascotas y la percepción de riesgo a la salud humana a través de una encuesta con 62 preguntas. Los resultados mostraron que el 78% de los usuarios no tenían conocimiento del retiro de alimentos de mascotas asociados con brotes producidos por patógenos, 25% consideró los alimentos secos y las golosinas como una potencial fuente de patógenos. Sin embargo, se mostró una baja percepción de riesgo a la salud humana y una mayor preocupación por el bienestar de las mascotas.

Anthonj *et al.* (2019) evaluaron la percepción de riesgo a la exposición de enfermedades infecciosas en el pantano de Ewaso Narok (Kenia) al recopilar datos de la comunidad a través de entrevistas y encuestas. Con esos resultados identificaron que las comunidades eran muy conscientes del riesgo por enfermedades infecciosas debido a las interacciones con el pantano, pero los grupos de usuarios que incluía ocupaciones como pastores y agricultores mostraron una percepción diferente. Estos datos han sido identificados como importantes herramientas de apoyo para el manejo de humedales permitiendo adoptar acciones que protejan la salud humana, la ecología e incluso a los animales afectados.

De Andrade *et al.* (2019) evaluaron el conocimiento, la percepción de riesgo y el sesgo optimista de manipuladores de alimentos, comensales de restaurantes y su relación con el riesgo de infección por microorganismos transmitidos por alimentos en Sao Paulo, Brasil. Encuestaron a 324 personas en 14 restaurantes, emplearon un cuestionario estructurado y las respuestas se midieron con una escala de 4 opciones. Los resultados mostraron que el conocimiento no tuvo diferencias significativas en los manipuladores y los comensales, la percepción de riesgo fue baja por ambas partes y el sesgo optimista mostro que los comensales podían ponerse en riesgo al asistir a restaurantes con medidas de higiene deficientes. Las respuestas mostraron que los comensales no diferencian los restaurantes respecto a la seguridad alimentaria y por ello es necesario que los gobiernos y las agencias de salud intervengan para proteger la salud de la población.

Wen *et al.* (2019) estudiaron la intención de compra de consumidores de pollo y la percepción de riesgo por los brotes de influenza aviar en China. Obtuvieron 330 encuestas que fueron aplicadas entre posibles compradores en los mercados y supermercados, las cuales incluían 26 preguntas y datos sobre género, edad, educación e información del hogar. Los resultados mostraron que los consumidores tenían una alta percepción del riesgo a adquirir pollo fresco durante el brote de influenza aviar, reducían sus compras y mostraron bajos niveles de confianza en la calidad del producto. Además, detectaron que los medios de comunicación tuvieron un efecto crucial en la respuesta de los consumidores y recomendaron a los expertos proporcionar información precisa sobre el sistema de salud pública para garantizar la calidad de los productos derivados de aves y para evitar información engañosa de parte de los medios de comunicación.

Graw *et al.* (2018) evaluaron la percepción de riesgo por la administración de transfusiones de sangre en dos grupos uno de profesionales de la salud y otro de pacientes. El cuestionario presentaba 9 preguntas y solicitaba datos sociodemográficos, pedía especificar si era paciente o profesional de la salud, a estos últimos se les pidió nombrar la especialidad médica en la que estaban trabajando actualmente y se midieron las respuestas de percepción con la escala Likert. Los resultados mostraron que el personal de salud consideraba las transfusiones más nocivas (14.6%) que los pacientes (10.9%), de todos los encuestados el 36.8% mostró preocupación por la transmisión de infecciones. Los pacientes lo consideraban una complicación frecuente (13.6%) comparado con los médicos (5.4%), mientras que los médicos consideraban mayor el riesgo de incompatibilidad y reacción alérgica (29.7% y 17.3%, respectivamente) que los pacientes (19.2% y 11.1% respectivamente). Este estudio demostró que las ocupaciones y el conocimiento de un tema se relacionan con la percepción del riesgo.

Odetokun *et al.* (2018) estudiaron el riesgo referente a la prevalencia y propagación de *Staphylococcus aureus* en mataderos de Nigeria. Analizaron 1671 muestras en la búsqueda del patógeno y aplicaron un cuestionario a 275 trabajadores para identificar los factores de riesgo. Los resultados mostraron una baja prevalencia del patógeno del 6.5% y en las encuestas se reveló que había una baja percepción de riesgo y de las prácticas de higiene para la mitigación de *S. aureus*, además los factores que sobresalieron fueron el sexo, estado civil, ocupación y la ubicación del matadero.

Yu *et al.* (2018) evaluaron la percepción de riesgo referente a factores implicados en la seguridad alimentaria asociados con el consumo de productos. Aplicaron un cuestionario

que incluyó datos demográficos y preguntas de la percepción de riesgo en el proceso de obtención de productos frescos recién cortados por la presencia de patógenos como *E. coli*, *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes*, organismos genéticamente modificados, antibióticos y pesticidas, las respuestas se midieron con la escala de Likert de cinco puntos. Los resultados mostraron una percepción de riesgo mayor a los pesticidas que a los patógenos transmitidos por los alimentos y con un análisis de varianza (ANOVA) observaron que las consumidoras mujeres de todas las edades y los consumidores jóvenes tenían una percepción más alta referente al riesgo de patógenos. Estos resultados sirvieron para mejorar las prácticas de seguridad alimentaria.

### **I.3 Justificación contextual y científica:**

Los estudios de percepción de riesgos proporcionan información sobre como identifica una población un peligro en particular al que están expuestos que, además, suele estar relacionado con datos que van desde características culturales, de visibilidad, conocimiento y variables sociodemográficas, como: género, edad, educación, estad civil, ocupación y otras (Cori *et al.*, 2020, Neuburger & Egger, 2020 y Lechowska, 2018). Para recabar estos datos y obtener la información necesaria es preciso crear el instrumento apropiado con preguntas claras, concretas y debidamente seleccionadas, para que los resultados guíen planificación de la gestión de riesgo que debe ser desarrollada y establezca cómo debe ser comunicado el riesgo a través de expertos en el tema y que acciones se deben poner en marcha para mitigarlo y prevenirlo (Wen *et al.*, 2019).

En el caso de los microorganismos VBNC se les considera un riesgo a la salud humana por el peligro que implica el proceso de resurrección, el hecho de que aún en estado VBNC algunas especies son capaces de mantener activos sus genes de virulencia y que se pueden encontrar en diversos ambientes incluyendo el agua potable (Guo *et al.*, 2020), biosólidos (Isovaeb *et al.*, 2019) y productos alimenticios (Dong *et al.*, 2020; Wideman *et al.*, 2020 y Highmore *et al.*, 2018). Por ahora las investigaciones se han centrado en identificar los procesos que causan el ingreso a ese estado y las técnicas que cuantifican el número de bacterias VBNC (Brauge *et al.*, 2020; Han *et al.*, 2018 y Dinu & Bach, 2011).

Así mismo, los estudios de percepción de riesgo por exposición a bacterias patógenas no han incluido a las que se encuentran en estado VBNC, sin embargo, han proporcionado una base para identificar algunos de los factores que influyen en la percepción como lo son el conocimiento de los patógenos, las prácticas de higiene y las variables sociodemográficas (Barret & Feng, 2021, Batista *et al.*, 2021, Thomas *et al.*, 2020 y De Andrade *et al.*, 2019).

La relevancia de los estudios de percepción de riesgo por exposición a microorganismos patógenos está orientada a tener conocimientos adecuados, actitudes de prevención y buenas prácticas de manejo o higiene dirigidos al cuidado de ciertas enfermedades son indispensables para que sean controladas (Al Ahdab *et al.*, 2021: Delgado- Hernández *et al.*, 2021 y Van Nhu *et al.*, 2020), por lo que no se pueden adaptar para la medición del riesgo percibido en cuanto a un tema tan actual, relevante y amenazante como es la presencia de bacterias viables pero no cultivables en distintas matrices. Esta investigación proporcionará un instrumento cuyo diseño y validación servirá como base para medir los

factores que influyen en la percepción de riesgo por exposición a bacterias VBNC a través de diferentes fuentes que incluyen agua y biosólidos, también evalúa los hábitos de la población para verificar otras posibles fuentes de exposición como los alimentos o utensilios de cocina, en los cuales se pueden encontrar por una mala higiene. Este cuestionario también brindará información básica sobre estas bacterias incentivando a la población a modificar su percepción de riesgo y mostrar mayor disposición a adoptar hábitos que sean más seguros desde un punto de vista microbiológico.

Este cuestionario servirá para futuras investigaciones en las ciencias de agua para conocer la postura de la población en cuanto a la seguridad microbiológica percibida el agua y biosólidos.

#### **I.4 Hipótesis:**

A partir de una detallada investigación sobre percepción de riesgo y bacterias en estado viable pero no cultivable se obtendrá un cuestionario capaz de medir el riesgo percibido por la exposición a estas, al recabar datos sociodemográficos, información sobre experiencias, conocimientos, percepciones de riesgo y hábitos de higiene.

## **I.5 Objetivo general y objetivos específicos**

### **I.5.1 Objetivo general:**

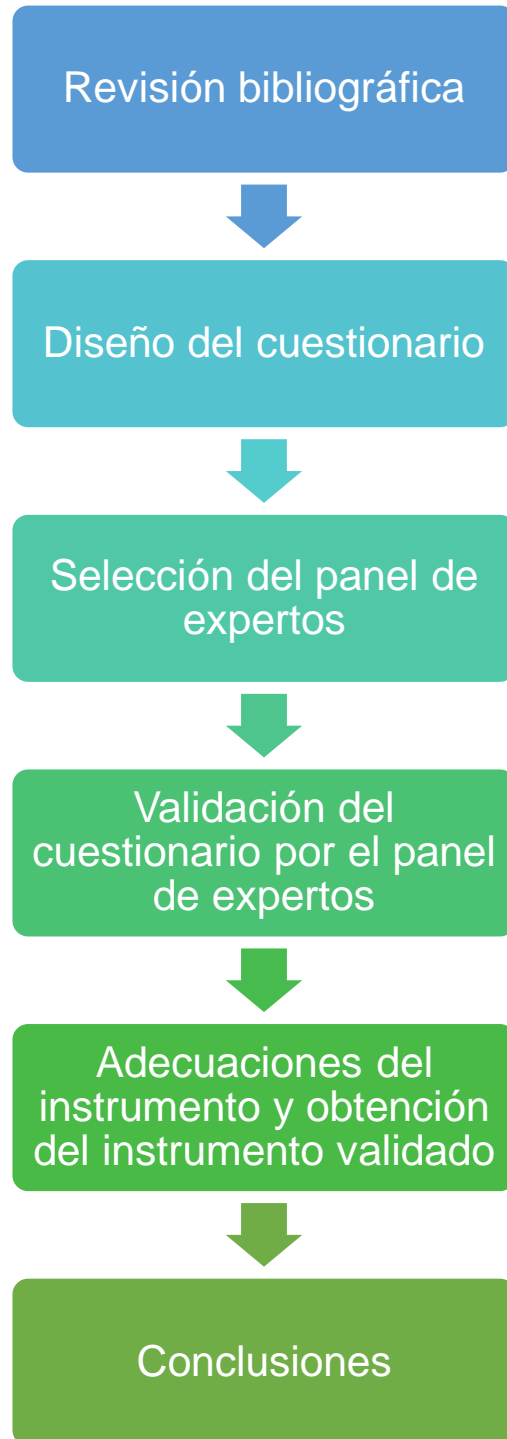
Diseñar y validar un cuestionario para analizar la percepción de riesgo, en personas mayores de 18 años, por exposición a bacterias VBNC y la predisposición a adquirir hábitos más seguros microbiológicamente tras ser informados sobre los patógenos que pueden ingresar a ese estado.

### **I.5.2 Objetivos específicos:**

1. Establecer el conocimiento previo de los entrevistados del riesgo asociado a la exposición a bacterias en estado viable pero no cultivable, mediante la redacción de preguntas cerradas, cuidando la pertinencia y redacción clara.
2. Identificar la percepción del riesgo por exposición a bacterias en estado viable pero no cultivable, mediante la redacción de preguntas cerradas, cuidando la pertinencia y redacción clara.
3. Prever el alcance y diversidad del tratamiento de datos recabados a través de preguntas sociodemográficas y de experiencia previa que, sirvan para determinar la existencia de tendencias de los apartados bajo estudio.
4. Determinar la sensibilidad y tendencia a cambiar hábitos riesgosos para la salud (tras recibir información sobre la existencia de bacterias en estado VBNC), mediante la redacción de preguntas cerradas, cuidando la pertinencia y redacción clara.
5. Verificar la validez del cuestionario propuesto a través de su revisión por un panel de expertos con experiencia en áreas relacionadas con ciencias del agua, de la salud y biológicas.
6. Obtener un cuestionario validado aplicable, tras atender las correcciones y sugerencias planteadas por el panel de expertos.

## I.6 Materiales y métodos:

En la figura 1 se muestra de forma general el método que se seguirá para el desarrollo de esta investigación.



**Figura 1.** Procedimiento propuesto para la investigación.

### **I.6.1 Revisión bibliográfica**

La búsqueda bibliográfica es el primer paso durante una investigación y establece un momento fundamental para la producción de nuevos conocimientos (Pozzo *et al.*, 2018). Al consultar investigaciones y publicaciones de fuentes confiables, reconocidas y actuales relacionadas con el tema de interés que, además resulten ser pertinentes, (por ejemplo: artículos científicos, libros y otros) se puede conocer el estado del arte, mejorando la perspectiva conforme avanza la búsqueda (Salamanca- Castro, 2021 y Guirao-Goris, 2015).

Así mismo, posibilita rectificar las variables más relevantes y las limitantes que han sido reportadas por otros investigadores brindando información sobre los aspectos que se deben considerar, el diseño experimental, el método de estudio, las características de los individuos de la muestra y el tamaño muestral (Salamanca-Castro, 2021).

Por consiguiente, se continuará llevando a cabo una minuciosa revisión bibliográfica para conocer las investigaciones de las bacterias VBNC que incluyan sus características, los factores que inducen el ingreso a este estado y los ambientes donde ya ha sido registrada su presencia, así como los estudios de percepción de riesgo ante la exposición a microorganismos patógenos con la finalidad de adecuar la metodología y el tratamiento de datos.

La información será recabada a partir de artículos científicos en fuentes como: Science direct, Springer Link, Pub Med, World Wide Science, Redalyc, MDPI, Scielo, Google Scholar, entre otras.

### **I.6.2 Diseño del cuestionario**

Una de las partes más importantes al momento de recolectar datos durante las investigaciones es la construcción del instrumento que será empleado. Su selección debe estar relacionada a la evaluación de las características del estudio para que corresponda con el enfoque de la investigación, las bases teóricas, el contexto donde será aplicado, etc., de tal forma que aporte información confiable y válida (González *et al.*, 2017).

El cuestionario será desarrollado de acuerdo con los objetivos propuestos y con los antecedentes presentados. Recabará información sobre las variables sociodemográficas de los encuestados, incluyendo: género, edad, estado civil, educación, localización y ocupación (con especial énfasis en sí forman tienen con la seguridad microbiológica en áreas de salud, biología o ingeniería etc.).



Comprenderá ítems de importancia para evaluar si existe un conocimiento previo de este estado en el que pueden caer los microorganismos, las prácticas de higiene y la percepción de riesgo referentes a este grupo de bacterias, así como, un párrafo con información básica sobre ellas y preguntas sobre como impactarían esos datos su conducta al modificar sus hábitos de higiene.

Se empleará la escala Likert con cinco puntos para evaluar las respuestas, puesto que es el método más común para medir actitudes debido a su facilidad de construcción, a que es adaptable y fiable. En esta escala se les pide a las personas que indiquen el nivel de acuerdo o desacuerdo alusivo a la idea señalada en una clave de respuesta que consta de cinco puntos que va desde un total desacuerdo, un promedio y un acuerdo total. Las respuestas se establecen como números enteros, posteriormente, se suman y se determina el grado en que el encuestado muestra el rasgo que está siendo estudiado (Hodge *et al.*, 2005).

### **I.6.3 Validación del cuestionario**

La validación consistirá en la evaluación del contenido del cuestionario por parte un grupo de expertos, como mencionan Kennedy *et al.* (2019) la selección del panel de expertos varía según el autor o literatura consultados, ellos seleccionaron 17, considerando que Gilbert & Prion (2016) señalaban suficientes entre 5 a 10 expertos, pero otros autores sugieren un mayor número. Aunque de forma general la selección del panel de expertos se realiza según las necesidades de la investigación. Por ejemplo, autores como Batista *et al.* (2021) enviaron su cuestionario a 22 expertos de los cuales 16 participaron en el análisis de la segunda versión. Tras una revisión bibliográfica, se propone enviar el cuestionario a un panel de 15 expertos esperando que al menos la mitad de ellos respondan y participen.

Los expertos serán seleccionados según su formación académica, años de experiencia laboral en el campo de la seguridad en alimentos, agua y salud y su disposición para participar. El proceso de selección se realizará en una reunión con los asesores para identificar a los expertos y elaborar un directorio con los nombres seleccionados para contactarlos y solicitar su colaboración.

## I.7 Programa de actividades

A continuación, se muestra una con tabla las actividades que se realizarán incluyendo las correcciones pertinentes para finalizar con la graduación en tiempo y forma, debido al cambio de tema de tesis ocurrido por la disponibilidad de las instalaciones dentro del IITCA ocasionadas por la pandemia por el virus del SARS- COV 2.

Actividad	Meses											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Consulta de bibliografía	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Diseño y ajuste del cuestionario			■	■								
Validación del cuestionario					■	■						
Aplicación de la encuesta							■	■				
Presentación del protocolo y avances			■						■			
Análisis de resultados					■	■	■	■	■	■	■	
Redacción de tesis	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
Adecuación del documento final											■	
Graduación												■

## I.8 Recursos disponibles

En esta sección se muestra un listado con los recursos a los que se tiene acceso:

- Equipo de cómputo con conexión a internet.
- Recursos de acceso abierto.
- Biblioteca IITCA.
- Bibliotecas virtuales de la UAEMéx.
- Sala de cómputo IITCA

## I.9 Referencias

Akins, R. B., Tolson, H., & Cole, B. R. 2005. *Stability of response characteristics of a Delphi panel: application of bootstrap data expansion. BMC medical research methodology*, 5, 37.

Al Ahdab S. 2021. *A cross-sectional survey of knowledge, attitude and practice (KAP) towards COVID-19 pandemic among the Syrian residents. BMC Public Health*. 21:296.

Anthonj, C., Diekkrüger, B., Bogemeister, C. & Kistemann, T. 2019. *Health risk perceptions and local knowledge of water-related infectious disease exposure among Kenyan wetland communities*. 222 (1), 34- 48.

Anvarian, A. H., Smith, M. P., & Overton, T. W. 2018. *Use of flow cytometry and total viable count to determine the effects of orange juice composition on the physiology of Escherichia coli. Food science & nutrition*, 6(7), 1817-1825.

Asakura, H., Makino, S. I., Takagi, T., Kuri, A., Kurazono, T., Watarai, M., & Shirahata, T. 2002. *Passage in mice causes a change in the ability of Salmonella enterica serovar Oranienburg to survive NaCl osmotic stress: resuscitation from the viable but non-culturable state. FEMS microbiology letters*, 212(1), 87-93.

Ayrapetyan, M., Williams, T. C., Baxter, R., & Oliver, J. D. 2015. *Viable but nonculturable and persister cells coexist stochastically and are induced by human serum. Infection and immunity*, 83(11), 4194-4203.

Barrett, T., & Feng, Y. 2021. *Evaluation of food safety curriculum effectiveness: A longitudinal study of high-school-aged youths' knowledge retention, risk-perception, and perceived behavioral control. Food Control*, 121, 107587.

Batista, S. A., Stedefeldt, E., Nakano, E. Y., Cortes, M. D. O., Botelho, R. B. A., Zandonadi, R. P., Raposo, A., Han, H. & Ginani, V. C. 2021. *Design and Development of an Instrument on Knowledge of Food Safety, Practices, and Risk Perception Addressed to Children and Adolescents from Low-Income Families. Sustainability*, 13(4), 2324.

Brauge, T., Faille, C., Leleu, G., Denis, C., Hanin, A., & Midelet, G. 2020. *Treatment with disinfectants may induce an increase in viable but non culturable populations of Listeria monocytogenes in biofilms formed in smoked salmon processing environments. Food Microbiology, 92, 103548.*

Brouwer, S., Hofman-Caris, R., & van Aalderen, N. 2020. *Trust in Drinking Water Quality: Understanding the Role of Risk Perception and Transparency. Water, 12(9), 2608.*

Cori, L., Bianchi, F., Cadum, E., & Anthonj, C. 2020. *Risk perception and COVID-19. Int. J. Environ. Res. Public Health. 17 (9) 3114.*

de Andrade, M. L., Rodrigues, R. R., Antongiovanni, N., & da Cunha, D. T. 2019. *Knowledge and risk perceptions of foodborne disease by consumers and food handlers at restaurants with different food safety profiles. Food Research International, 121, 845-853.*

Delgado-Hernández, B., Mugica, L., Acosta, M., Pérez, F., de las Nieves Montano, D., Abreu, Y., ... & Alfonso, P. 2021. *Knowledge, Attitudes, and Risk Perception Toward Avian Influenza Virus Exposure Among Cuban Hunters. Frontiers in Public Health, 9.*

Ding, Y., Du, X., Li, Q., Zhang, M., Zhang, Q., Tan, X., & Liu, Q. 2020. *Risk perception of coronavirus disease 2019 (COVID-19) and its related factors among college students in China during quarantine. PloS one, 15(8), e0237626.*

Dinu, L. D., & Bach, S. 2011. *Induction of viable but nonculturable Escherichia coli O157: H7 in the phyllosphere of lettuce: a food safety risk factor. Applied and environmental microbiology, 77(23), 8295-8302.*

Dong, K., Pan, H., Yang, D., Rao, L., Zhao, L., Wang, Y., & Liao, X. 2020. *Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 19 (1): 149-183.*

El-Aziz, N. K. A., Tartor, Y. H., El-Aziz Gharib, A. A., & Ammar, A. M. 2018. *Propidium monoazide quantitative real-time polymerase chain reaction for enumeration of some viable but nonculturable foodborne bacteria in meat and meat products. Foodborne pathogens and disease, 15(4), 226-234.*

González, D., Alvarado, C. & Marín, C. 2017. *Diseño y validación de una encuesta para la caracterización de unidades de producción caprina. Revista de la facultad de ciencias veterinarias*. 158 (2): 68-74.

Graw, J.A., Eymann, K., Kork, F. Zorembo, M. & Burchard, R. 2018. *Risk perception of blood transfusions – a comparison of patients and allied healthcare professionals. BMC Health Serv Res* 18, 122.

Guirao-Goris, S. J. A. 2015. *Utilidad y tipos de revisión de literatura. Ene*, 9(2), 0-0.

Gunasekera, T. S., Sørensen, A., Attfield, P. V., Sørensen, S. J., & Veal, D. A. 2002. *Inducible gene expression by nonculturable bacteria in milk after pasteurization. Applied and environmental microbiology*, 68(4), 1988-1993.

Guo, L., Wan, K., Zhu, J., Ye, C., Chabi, K. & Yu, X. 2020. *Detection and distribution of VBNC/ viable pathogenic bacteria in full- scale drinking water treatment plants. Journal of Hazardous Materials*. 2- 12.

Han, D., Hung, Y. C., & Wang, L. 2018. *Evaluation of the antimicrobial efficacy of neutral electrolyzed water on pork products and the formation of viable but nonculturable (VBNC) pathogens. Food microbiology*, 73, 227-236.

Han, G., & Liu, Y. 2018. *Does information pattern affect risk perception of food safety? A national survey in China. International journal of environmental research and public health*, 15 (9), 1935.

Highmore, C. J., Warner, J. C., Rothwell, S. D., Wilks, S. A., & Keevil, C. W. 2018. *Viable-but-nonculturable Listeria monocytogenes and Salmonella enterica serovar Thompson induced by chlorine stress remain infectious. MBio*, 9(2), e00540-18.

Hodge, D. & Gillespie, D. 2005. *Phrase Completion Scales. Encyclopedia of Social Measurement*. 53- 62.

Kan, Y., Jiang, N., Xu, X., Lyu, Q., Gopalakrishnan, V., Walcott, R., Burdman, S. Li, J. & Luo, L. 2019. *Induction and resuscitation of the viable but non-culturable (VBNC) state in Acidovorax citrulli, the causal agent of bacterial fruit blotch of cucurbitaceous crops. Frontiers in microbiology*, 10, 1081.

Lechowska, E. 2018. *What determines flood risk perception? A review of factors of flood risk perception and relations between its basic elements.* *Nat Hazards* 94, 1341–1366.

Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D., & Faucher, S. P. 2014. *The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens.* *Frontiers in microbiology*, 5, 258.

Lindbäck, T., Rottenberg, M. E., Roche, S. M., & Rørvik, L. M. 2010. *The ability to enter into an avirulent viable but non-culturable (VBNC) form is widespread among Listeria monocytogenes isolates from salmon, patients and environment.* *Veterinary research*, 41(1), 1-10.

Makino, S. I., Kii, T., Asakura, H., Shirahata, T., Ikeda, T., Takeshi, K., & Itoh, K. 2000. *Does enterohemorrhagic Escherichia coli O157: H7 enter the viable but nonculturable state in salted salmon roe?* *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5536-5539.

Muela, A., Seco, C., Camafeita, E., Arana, I., Orruño, M., López, J. A., & Barcina, I. 2008. *Changes in Escherichia coli outer membrane subproteome under environmental conditions inducing the viable but nonculturable state.* *FEMS microbiology ecology*, 64(1), 28-36.

Neuburger, L., & Egger, R. 2021. *Travel risk perception and travel behaviour during the COVID-19 pandemic 2020: A case study of the DACH region.* *Current Issues in Tourism*, 24(7), 1003-1016.

Nicolò, M. S., Gioffre, A., Carnazza, S., Platania, G., Silvestro, I. D., & Guglielmino, S. P. P. 2011. *Viable but nonculturable state of foodborne pathogens in grapefruit juice: a study of laboratory.* *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(1), 11-17.

Odetokun, I. A., Borokinni, B. O., Bakare, S. D., Ghali-Mohammed, I., & Alhaji, N. B. 2021. *A Cross-Sectional Survey of Consumers' Risk Perception and Hygiene of Retail Meat: A Nigerian Study.* *Food Protection Trends*, 41(3), 274-283.

- Oliver, J. D. 2005. *The viable but nonculturable state in bacteria*. *Journal of microbiology*, 43 (1): 93-100
- Otzen, T., & Manterola, C. 2017. *Técnicas de Muestreo sobre una Población a Estudio*. *International journal of morphology*, 35(1), 227-232.
- Paek, H. J., & Hove, T. 2017. *Risk perceptions and risk characteristics*. In *Oxford research encyclopedia of communication*. <https://oxfordre.com/communication/view/10.1093/acrefore/9780190228613.001.0001/acrefore-9780190228613-e-283>
- Pozzo, M., Borgobello, A. & Pierella, M. 2018. *Uso de cuestionarios en investigaciones sobre universidad: análisis de experiencias desde una perspectiva situada*. *Revista Latinoamericana de Metodología de las ciencias Sociales*. 8 (2) e 046.
- Quaglia, N. C., & Dambrosio, A. 2018. *Helicobacter pylori: A foodborne pathogen?*. *World journal of gastroenterology*, 24(31), 3472.
- Quon, H., Allaire, M., & Jiang, S. C. 2021. *Assessing the Risk of Legionella Infection through Showering with Untreated Rain Cistern Water in a Tropical Environment*. *Water*, 13(7), 889.
- Ramamurthy, T., Ghosh, A., Pazhani, G. P., & Shinoda, S. 2014. *Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria*. *Frontiers in public health*, 2, 103.
- Robben, C., Fister, S., Witte, A. K., Schoder, D., Rossmann, P., & Mester, P. 2018. *Induction of the viable but non-culturable state in bacterial pathogens by household cleaners and inorganic salts*. *Scientific reports*, 8(1), 1-9.
- Rohrmann, B. 2017. *Risk perception, risk attitude, risk communication, risk management: a conceptual Appraisal*. *The International Emergency Management Society (TIEMS) 2008 Annual Conference in Prague; 17-19 Jun 2008*.

Roszak, D. B., Grimes, D. J., & Colwell, R. R. 1984. *Viable but nonrecoverable stage of Salmonella enteritidis in aquatic systems. Canadian journal of microbiology*, 30 (3): 334-338.

Salamanca- Castro, A. B. 2021. *Las utilidades de la búsqueda bibliográfica y su importancia para el éxito del estudio. Nure Investigación*. 18 (111) 1- 2.

Shleeva, M., Mukamolova, G. V., Young, M., Williams, H. D., & Kaprelyants, A. S. 2004. *Formation of 'non-culturable' cells of Mycobacterium smegmatis in stationary phase in response to growth under suboptimal conditions and their Rpf-mediated resuscitation. Microbiology*, 150 (6): 1687-1697.

Siegrist, M., & Árvai, J. 2020. *Risk perception: Reflections on 40 years of research. Risk Analysis*, 40(S1), 2191-2206.

Signoretto, C., del Mar Lleò, M., Tafi, M. C., & Canepari, P. 2000. *Cell Wall Chemical Composition of Enterococcus faecalis in the Viable but Nonculturable State. Applied and environmental microbiology*, 66 (5): 1953-1959.

Thomas, M., & Feng, Y. 2020. *Risk of foodborne illness from pet food: assessing pet owners' knowledge, behavior, and risk perception. Journal of Food Protection*, 83(11), 1998-2007.

Thongpalad, K., Koirala, S., & Anal, A. K. 2021. *Risk perceptions, on-farm handling, and food safety practices among egg producing farmers in Thailand. Journal of Agribusiness in Developing and Emerging Economies*. <https://www.emerald.com/insight/content/doi/10.1108/JADEE-05-2021-0110/full/html>

Van Nhu H, Tuyet-Hanh TT, Van NTA, Linh TNQ, Tien TQ. 2020. *Knowledge, attitudes, and practices of the vietnamese as key factors in controlling COVID-19. J Community Health*. 45:1263–9.

Wei, C., & Zhao, X. 2018. *Induction of viable but nonculturable Escherichia coli O157: H7 by low temperature and its resuscitation. Frontiers in microbiology*, 9, 2728.



Wen, X., Sun, S., Li, L., He, Q., & Tsai, F. S. 2019. *Avian influenza—Factors affecting consumers' purchase intentions toward poultry products. International journal of environmental research and public health*, 16(21), 4139.

Wideman, N. E., Oliver, J. D., Crandall, P. G., & Jarvis, N. A. 2021. *Detection and potential virulence of viable but non-culturable (VBNC) Listeria monocytogenes: a review. Microorganisms*, 9(1), 194.

Wilks, S. A., Koerfer, V. V., Prieto, J. A., Fader, M., & Keevil, C. W. 2021. *Biofilm Development on Urinary Catheters Promotes the Appearance of Viable but Nonculturable Bacteria. Mbio*, 12(2), e03584-20.

Xu, H. S., Roberts, N., Singleton, F. L., Attwell, R. W., Grimes, D. J., & Colwell, R. R. 1982. *Survival and viability of nonculturable Escherichia coli and Vibrio cholerae in the estuarine and marine environment. Microbial ecology*, 8(4), 313-323.

Yu, H., Neal, J. A., & Sirsat, S. A. 2018. *Consumers' food safety risk perceptions and willingness to pay for fresh-cut produce with lower risk of foodborne illness. Food Control*, 86, 83-89.

Zhang, X. H., Ahmad, W., Zhu, X. Y., Chen, J., & Austin, B. 2020. *Viable but nonculturable bacteria and their resuscitation: implications for cultivating uncultured marine microorganisms. Marine Life Science & Technology*, 1-15.

Zhao, X., Zhong, J., Wei, C., Lin, C. W., & Ding, T. 2017. *Current perspectives on viable but non-culturable state in foodborne pathogens. Frontiers in Microbiology*, 8, 580.

## Capítulo II. Artículo especializado

### II.1 Acuse de recibo

**De:** Samuel s

**Enviado:** lunes, 11 de abril de 2022 02:17 a. m.

**Para:** Maria del Carmen Jimenez Moleon

; Joshua Ariel Solano Gomez

**Asunto:** Article acknowledgment: OJEB

Dear Maria del Carmen Jimenez Moleon,

Thank you for submitting your article entitled as: "Viable but Non-Cultivable Bacteria and their Implications for Microbiological Safety" to the Open Journal of Environmental Biology.

The article is being forwarded to the Peer-review Department for further process.

All the further communication with you regarding article processing will be done through provided email ID: [review.article@ptechz.com](mailto:review.article@ptechz.com)

Kindly save the above Email ID for further communication purpose; such that we can avoid the chances of hitting our mails to the spam folder.

Wish you hassle-free publication of your valuable work

Hope to receive an everlasting scientific association with you!  
Regards,

Catharine A, Managing Editor

## II.2 Carta de aceptación

**De:** Samuel s

**Enviado:** lunes, 11 de abril de 2022 02:18 a. m.

**Para:** Maria del Carmen Jimenez Moleon  
Gomez

; Joshua Ariel Solano

**Asunto:** Handling article to Peer Review Department: OJEB

To,

Peer-Review Department,

Open Journal of Environmental Biology

Dear Sir/Madam,

Please accept enclosed article, entitled: "Viable but Non-Cultivable Bacteria and their Implications for Microbiological Safety"; corresponding author name: Maria del Carmen Jimenez Moleon for Peer-Review process.

Terms & Conditions:

Ø As per the ethical policy, the manuscript once submitted should not be submitted elsewhere for the next 21 days.

Ø The authors should provide the cover letter which includes Author's and Co- Author's affiliation details, telephone and fax numbers along with NOC, so that we don't face any discrepancies latter.

If you have any other query related to this article, please forward the same to us.

We hope the peer-review will be expedited and the authors receive the review comments shortly.

Regards,

Catharine A, Managing Editor

---

 **Manuscript Review Report -OJEB-22-SC-148.pdf**  
734K [Visualizar como HTML](#) [Descargar](#)

## II.3 Texto



LIFE SCIENCES GROUP

OPEN JOURNAL OF  
Environmental Biology

ISSN: 2690-0777 DOI: <https://dx.doi.org/10.17352/ojeb>

Received: 12 April, 2022  
Accepted: 31 May, 2022  
Published: 01 June, 2022

\*Corresponding author: Jiménez-Moleón MC, Ph.D, Inter-American Institute of Technology and Water Sciences, Autonomous Mexico State University, México, Tel: +52 722 296 55 50 ext. 115; Fax: +52 722 296 55 50 ext. 126; E-mail: mcjimenezm@uaemex.mx

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0604-6822>

Copyright License: © 2022 Jiménez-Moleón MC, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

<https://www.peertechzpublications.com>



### Short Communication

# Viable but non-cultivable bacteria and their implications for microbiological safety

Jiménez-Moleón MC\* and Solano-Gómez JA

Inter-American Institute of Technology and Water Sciences, Autonomous Mexico State University, México

### Communication

Bacteria are microorganisms found in all environments and they fulfill various tasks in ecosystems, however, some can affect the human population causing outbreaks of disease and death. The most common forms of exposure and infection are contaminated food and water. That is the reason there are different organizations in the world that study the incidence of gastrointestinal and/or enteric diseases. For example, in the United States, there is the Active Surveillance Network of Foodborne Diseases (Food Net), which monitors 10 sites for infections that are diagnosed in the laboratory by eight pathogens (*Campylobacter*, *Cyclospora*, *Listeria*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Yersinia* y *Escherichia coli*). Their data, in 2019, revealed 25,866 infections; 6,164 cases requiring hospitalization, and 122 deaths. Without forgetting that, according to the WHO, diarrhea remains the second cause of death in children under 5 years in the world, which translated (in 2019) into the death of 525,000 children globally and 9,904 in Latin America [1].

Trying to reduce these figures, the authorities implement regulations and standards that specify the limits of abundance and methods for the detection of pathogenic microorganisms, which are usually based on cultivation techniques in Petri dishes where the Colony Forming Units are counted. So, if a plate shows a clean culture medium (without colonies), the sample is considered to be free of bacteria and therefore safe. That is, the microbiological safety of a sample is measured by the cultivability of the species present in it.

However, in 1982, Xu, et al. discovered the existence of the Viable but Non-Culturable (VBNC) state. Which was defined as a tactic of non-spore-forming bacteria to survive in front of environmental stressors, which include the most common disinfection methods such as exposure to UV light [2], antibiotics [3], chlorine [4], high or low temperatures [5], high or low pH levels [6], as well as food preservation processes such as salting [7], dehydration [8] or freezing [9], which were considered "safe".

Upon entering into the VBNC state, the cell undergoes certain changes, for example, morphological alterations ranging from size reduction [5], to changes in the composition of the cell wall and membrane, including proteins, fatty acids, and peptidoglycan [10]. Other modifications are the decrease in metabolic rate [11], microorganisms showing greater physical, and chemical resistance [12] and antibiotics, which differ in gene expression, change their adhesion properties [13] and their potential for virulence, since some cannot cause diseases until they recover their cultivable state, although others maintain their pathogenicity by continuing to express toxins [14].

However, VBNC bacteria differ from dead cells since their membranes are not damaged and retain genomically or plasmid DNA, maintain their respiratory and metabolic activity, and even possess high levels of ATP [15], but decrease nutrient transport and macromolecule synthesis [16]. Despite the above, they don't replicate, therefore, they are not quantified by conventional methods such as Most Probable Number (MPN) or Plate Count Agar (PCA), since these techniques are based on counts of bacterial colonies developed on a Petri plate,

a liquid or semi-solid medium, during incubation, that is, on their cultivability.

In addition, it has been discovered that VBNC bacteria can be resurrected when the environment becomes favorable again. The term "resuscitation" refers to the fact that they recover their ability to cultivate and return their physiological characteristics and metabolic processes to normal. This resuscitation can be reached by stimulating factors such as an increase in nutrient concentration, increase or decrease in temperature, the presence of chemical stimuli, co-culture with host cells [16], quorum sensing autoinducers (cell-cell communication system), active proteins (factors that promote resuscitation Rpf, YeaZ and catalase) [4]. However, it is important to mention that bacteria in the VBNC state can only be resurrected within a specific period in the so-called "resuscitation window", their duration depends on the species, bacterial age, and the conditions that induced the VBNC state and the resuscitation conditions. If they exceed this window, VBNC cells can still survive for some time, but eventually die [14].

At this time, it is important to remember again that the standard techniques to know the bacteriological quality of the different matrices are based on the count of the Colony Forming Units (CFUs) using solid, liquid, or semi-solid culture media, but since VBNC bacteria are not able to form colonies, these methods do not allow to count the real number of viable bacteria present and underestimate the microbiological contamination. To avoid this serious microbiological safety problem in different matrices, there are viable bacterial detection methods such as [17]: fluorescence microscopy including staining with acridine orange and nalidixic acid or countersanctions with 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) and 4,6-diamino-2-phenylindole chloride (DAPI) or molecular methods such as quantitative polymerase chain reaction (qPCR) combined with monoazide propidium (PMA) or reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Currently, a large number of bacteria entering the VBNC state and even some species of fungi have been identified [14]. Most bacteria are Gram-negative, although there are also Gram-positive and several of them, are pathogenic [18]. In fact, it is considered that most non-specific food infections may be related to the resuscitation of bacteria that entered the VBNC state during their previous handling.

The existence and significance of VBNC bacteria within the "human system" has been presented, but what about these bacteria in the VBNC state in the environment? In the marine environment, many bacteria have been associated with dormancy, typified as the VBNC state [19]. Bacteria found in the sea are exposed to a natural environment that has various stressors that cause the induction of the VBNC state [20,21]. As in other matrices, later, when they come into contact with stimuli such as increased temperature, they resurrect.

An example of its importance is the bacteria of the *Vibrio* genus that are found in estuarine and brackish surface waters, this pathogen is the cause of diseases in animals and humans

such as infections, diarrhea, cholera, gastroenteritis, and septicemia [20,22]. People can come into contact with these microorganisms through food, such as eating oysters, which are products that are usually consumed raw or undercooked. When these mollusks are contaminated with *Vibrio vulnificus*, they cause infections such as gastroenteritis with abdominal pain, diarrhea, and vomiting, which can progress to primary septicemia. It has been reported that these bacteria enter the VBNC state due to exposure to low temperatures (during the winter months) and that they can resuscitate both when the season changes (and they are in warm environments), and by stimulation with bacteria that are not in the VBNC state, by cell-cell communication (*quorum sensing* signaling) [23-26]. Also, it has been detected that cholera outbreaks caused by *Vibrio cholerae* 01 are related to human contact with fresh or saltwater, a medium in which the bacteria can enter or leave the VBNC state depending on the environmental temperature, determined by the seasons of the year [21,22]. The aforementioned are examples of the behavior of VBNC microorganisms in the environment and the importance of their presence for public health.

## Conclusion

Bacteria in the VBNC state represent a risk to human health, even in the field of public health. They are often associated with diseases transmitted by water or food. The entry into this state prevents its detection by conventional techniques, based on growth and plate counting, which leads to the underestimation of pathogens since these are the methods that mark the official standards of different countries. Because of this, it is relevant to include complimentary techniques which evaluate the viability of bacteria and not only their cultivability within the regulations that safeguard microbiological safety in different matrixes (beverages, food, biosolids, etc.).

## References

1. WHO. Diarrhoeal disease. World Health Organization. 2019.
2. Zhang S, Ye C, Lin H, Lv L, Yu X. UV disinfection induces a VBNC state in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Sci Technol*. 2015 Feb 3;49(3):1721-8. doi: 10.1021/es505211e. Epub 2015 Jan 26. PMID: 25584685.
3. Pasquaroli S, Zandri G, Vignaroli C, Vuotto C, Donelli G, Biavasco F. Antibiotic pressure can induce the viable but non-culturable state in *Staphylococcus aureus* growing in biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 2013 Aug;68(8):1812-7. doi: 10.1093/jac/dkt086. Epub 2013 Mar 20. PMID: 23515246.
4. Ye C, Lin H, Zhang M, Chen S, Yu X. Characterization and potential mechanisms of highly antibiotic tolerant VBNC *Escherichia coli* induced by low level chlorination. *Sci Rep*. 2020 Feb 6;10(1):1957. doi: 10.1038/s41598-020-58106-3. PMID: 32029755; PMCID: PMC7005040.
5. Wei C, Zhao X. Induction of Viable but Nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 by Low Temperature and Its Resuscitation. *Front Microbiol*. 2018 Nov 13;9:2728. doi: 10.3389/fmicb.2018.02728. PMID: 30555428; PMCID: PMC6282054.
6. Wasfi R, Abdellatif GR, Elshishtawy HM, Ashour HM. First-time characterization of viable but non-culturable *Proteus mirabilis*: Induction and resuscitation. *J Cell Mol Med*. 2020 Mar;24(5):2791-2801. doi: 10.1111/jcmm.15031. Epub 2020 Feb 7. PMID: 32030883; PMCID: PMC7077546.
7. Makino SI, Kii T, Asakura H, Shirahata T, Ikeda T, Takeshi K, Itoh K. Does

- enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 enter the viable but nonculturable state in salted salmon roe? *Appl Environ Microbiol.* 2000 Dec;66(12):5536-9. doi: 10.1128/AEM.66.12.5536-5539.2000. PMID: 11097946; PMCID: PMC92500.
8. Asakura H, Makino S, Takagi T, Kuri A, Kurazono T, Watarai M, Shirahata T. Passage in mice causes a change in the ability of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg to survive NaCl osmotic stress: resuscitation from the viable but non-culturable state. *FEMS Microbiol Lett.* 2002 Jun 18;212(1):87-93. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11249.x. PMID: 12076792.
  9. Lindbäck T, Rottenberg ME, Roche SM, Rørvik LM. The ability to enter into an avirulent viable but non-culturable (VBNC) form is widespread among *Listeria monocytogenes* isolates from salmon, patients and environment. *Vet Res.* 2010 Jan-Feb;41(1):8. doi: 10.1051/vetres/2009056. Epub 2009 Oct 2. PMID: 19796607; PMCID: PMC2775167.
  10. Muela A, Seco C, Camafeita E, Arana I, Orruño M, López JA, Barcina I. Changes in *Escherichia coli* outer membrane subproteome under environmental conditions inducing the viable but nonculturable state. *FEMS Microbiol Ecol.* 2008 Apr;54(1):28-36. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00453.x. Epub 2008 Mar 3. PMID: 18318713.
  11. Shleeva M, Mukamolova GV, Young M, Williams HD, Kaprelyants AS. Formation of 'non-culturable' cells of *Mycobacterium smegmatis* in stationary phase in response to growth under suboptimal conditions and their Rpf-mediated resuscitation. *Microbiology (Reading).* 2004 Jun;150(Pt 6):1687-1697. doi: 10.1099/mic.0.26893-0. PMID: 15184555.
  12. Signoretto C, Lleò MM, Tafi MC, Canepari P. Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *Appl Environ Microbiol.* 2000 May;66(5):1953-9. doi: 10.1128/AEM.66.5.1953-1959.2000. PMID: 10788366; PMCID: PMC101439.
  13. Li L, Mendis N, Trigui H, Oliver JD, Faucher SP. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front Microbiol.* 2014 Jun 2;5:258. doi: 10.3389/fmicb.2014.00258. PMID: 24917854; PMCID: PMC4040921.
  14. Dong K, Pan H, Yang D, Rao L, Zhao L, Wang Y, Liao X. Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2020 Jan;19(1):149-183. doi: 10.1111/1541-4337.12513. Epub 2019 Dec 19. PMID: 33319518.
  15. Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol.* 2005 Feb;43 Spec No:93-100. PMID: 15765062.
  16. Zhao X, Zhong J, Wei C, Lin CW, Ding T. Current Perspectives on Viable but Non-culturable State in Foodborne Pathogens. *Front Microbiol.* 2017 Apr 4;8:580. doi: 10.3389/fmicb.2017.00580. PMID: 28421064; PMCID: PMC5378802.
  17. Bodor A, Bounedjoum N, Vincze GE, Erdeiné Kis Á, Laczi K, Bende G. et al. Challenges of unculturable bacteria: environmental perspectives. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology.* 2020; 19(1):1-22.
  18. Ramamurthy T, Ghosh A, Pazhani GP, Shinoda S. Current Perspectives on Viable but Non-Culturable (VBNC) Pathogenic Bacteria. *Front Public Health.* 2014 Jul 31;2:103. doi: 10.3389/fpubh.2014.00103. PMID: 25133139; PMCID: PMC4116801.
  19. Zhang XH, Ahmad W, Zhu XY, Chen J, Austin B. Viable but nonculturable bacteria and their resuscitation: implications for cultivating uncultured marine microorganisms. *Marine Life Science & Technology.* 2021; 3(2): 189-203.
  20. Vezzulli L, Colwell RR, Pruzzo C. Ocean warming and spread of pathogenic vibrios in the aquatic environment. *Microb Ecol.* 2013 May;65(4):817-25. doi: 10.1007/s00248-012-0163-2. Epub 2013 Jan 3. PMID: 23280498.
  21. Colwell RR. Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. *J Infect Chemother.* 2000 Jun;6(2):121-5. doi: 10.1007/pl00012151. PMID: 11810550.
  22. Binsztejn N, Costagliola MC, Pichel M, Jurquiza V, Ramirez FC, Akselman R, Vacchino M, Huq A, Colwell R. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of Argentina. *Appl Environ Microbiol.* 2004 Dec;70(12):7481-6. doi: 10.1128/AEM.70.12.7481-7486.2004. PMID: 15574951; PMCID: PMC535145.
  23. Ayrapetyan M, Williams TC, Oliver JD. Interspecific quorum sensing mediates the resuscitation of viable but nonculturable vibrios. *Appl Environ Microbiol.* 2014 Apr;80(8):2478-83. doi: 10.1128/AEM.00080-14. Epub 2014 Feb 7. PMID: 24509922; PMCID: PMC3993182.
  24. Froelich BA, Noble RT. Factors affecting the uptake and retention of *Vibrio vulnificus* in oysters. *Appl Environ Microbiol.* 2014 Dec;80(24):7454-9. doi: 10.1128/AEM.02042-14. Epub 2014 Sep 26. PMID: 25261513; PMCID: PMC4249221.
  25. Tack DM, Ray L, Griffin PM, Cieslak PR, Dunn J, Rissman T, Jervis R, Lathrop S, Muse A, Duwell M, Smith K, Tobin-D'Angelo M, Vugia DJ, Zablotsky Kufel J, Wolpert BJ, Tauxe R, Payne DC. Preliminary Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2016-2019. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2020 May 1;69(17):509-514. doi: 10.15585/mmwr.mm6917a1. PMID: 32352955; PMCID: PMC7206985.
  26. Xu HS, Roberts N, Singleton FL, Attwell RW, Grimes DJ, Colwell RR. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb Ecol.* 1982 Dec;8(4):313-23. doi: 10.1007/BF02010671. PMID: 24226049.

### III. Anexos

**III.1.Segundo artículo especializado (enviado). Bacterias viables pero no cultivables (VBNC): Cuando los patógenos están presentes pero no son detectados por los análisis convencionales.**

#### III.1.1.Acuse de recibo

**De:** Hemeroteca Digital <[hemerotecadigital@uaemex.mx](mailto:hemerotecadigital@uaemex.mx)>

**Enviado:** lunes, 17 de octubre de 2022 12:09 p. m.

**Para:** Maria del Carmen Jimenez Moleon <[mcjimenezm@uaemex.mx](mailto:mcjimenezm@uaemex.mx)>

**Asunto:** [cienciaergosum] Envío recibido

María (del) Carmen Jiménez-Moleón:

Gracias por enviarnos su manuscrito " Bacterias viables pero no cultivables (VBNC): Cuando los patógenos están presentes pero no son detectados por los análisis convencionales" a CIENCIA ergo-sum. Gracias al sistema de gestión de revistas online que usamos podrá seguir su progreso a través del proceso editorial identificándose en el sitio web de la revista:

URL del manuscrito: <https://cienciaergosum.uaemex.mx/authorDashboard/submission/19954>

Nombre de usuario/o: mcjimenezm

Si tiene cualquier pregunta no dude en contactar con nosotros/as. Gracias por tener en cuenta esta revista para difundir su trabajo.

Eduardo Gilberto Loría Díaz de Guzmán

---

{JournalName} <http://hemeroteca.uaemex.mx/index.php/cienciaergosum>

...

### III. 1.2. Texto

Solano-Gómez Joshua Ariel<sup>1</sup>

Jiménez-Moleón María del Carmen<sup>1\*</sup>

Caballero-Viñas, José<sup>2</sup>

Lucero-Chávez, Mercedes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Interamericano de Tecnología y Ciencias del Agua, Universidad Autónoma del Estado de México.

<sup>2</sup>Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de México

\*Autora de correspondencia: mcjimenezm@uaemex.mx

#### **Resumen:**

Según la OMS, anualmente 600 millones de personas enferman y 420 000 mueren por el consumo de alimentos contaminados; de ellos, 125 000 son niños menores de 5 años. Una fracción de estas cifras, se puede relacionar con la habilidad bacteriana para sobrevivir ante ambientes estresantes, ingresando al estado viable pero no cultivable (VBNC, por sus siglas en inglés), en el que no son detectadas por métodos convencionales. Estos microorganismos afectan a los sectores productivos, provocando pérdidas económicas directas e indirectas, afectando a la salud de las personas expuestas. En este artículo se revisan los esfuerzos por obtener las implicaciones de la existencia de bacterias VBNC en distintas matrices y cómo esta presencia compromete su seguridad microbiológica.

**Palabras clave:** Seguridad Microbiológica, Contaminación Microbiológica, Salud Pública, Infección gastrointestinal, Bacterias Viables pero No Cultivables, VBNC.

#### **Abstract:**

According to the WHO, annually 600 million people get sick and 420 000 die from the consumption of contaminated food; of these, 125 000 are children under 5 years. A fraction of these figures can be related to the bacterial ability to survive stressful environments, entering the viable but nonculturable (VBNC) state, in which they are not detected by conventional methods. These microorganisms affect the productive sectors, causing direct and indirect economic losses, affecting the health of exposed people. This article reviews the efforts to obtain the implications of the existence of VBNC bacteria in different matrices and how their presence compromises their microbiological safety.



**Key words:** Microbiology Security, Microbiology Contamination, Public Health, Gastrointestinal Infection, Bacteria Viable but Nonculturable, VBNC.

### **Introducción:**

La pandemia por COVID-19, ha tenido como efecto colateral el desarrollo de una mayor conciencia sobre la prevención de enfermedades y la seguridad microbiológica en la salud pública. Respecto a la contaminación microbiológica, las infecciones bacterianas tienen relevancia porque estos microorganismos que se encuentran en todos los ambientes, donde cumplen importantes roles (Akoijam *et al.*, 2022). Sin embargo, algunas bacterias son patógenas y afectan a las poblaciones causando brotes de enfermedades, muertes y pérdidas económicas. Una de las vías más comunes de infección es a través del consumo de agua y alimentos contaminados los cuales ocasionaron que, en 2020, 600 millones de personas enfermasen lo que produjo la muerte de 420 000 de ellos, y de 125 000 niños menores de 5 años, según los datos publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2020).

Para evitar infecciones asociadas con la contaminación microbiológica, los alimentos, bebidas y el agua potable pasan por procesos de desinfección cuya función es eliminar o reducir los microorganismos patógenos. Sin embargo, a veces estas técnicas producen un ambiente estresante, al que las bacterias responden ingresando al estado viable pero no cultivable o VBNC (por sus siglas en inglés: *Viable But NonCulturable*) que es una técnica de supervivencia que permite la permanencia de las células en los productos, aunque hayan pasado por procesos de descontaminación y el control de calidad sobre su inocuidad.

Los métodos convencionales utilizados en todas las legislaciones nacionales para medir la contaminación microbiológica se basan en el recuento en placa de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y/o la determinación del Número Más Probable (NMP). Estos métodos se basan en la multiplicación de las bacterias presentes en la matriz y, dado que, la bacteria en este estado sigue viva (viable), pero perdió su capacidad de reproducirse, ese producto puede estar cumpliendo con las normativas aplicables y vigentes, pero la incapacidad del método de cuantificar su viabilidad, hace que se subestime la presencia de microorganismos (Jiménez-Moleón y Solano-Gómez, 2022).

La presencia de bacterias VBNC influye negativamente sobre los sectores económicos. Se han reportado afectaciones en la industria y en la agricultura, donde han generado pérdidas económicas directas, derivadas de la alteración en la calidad de los productos, e indirectas,

por la exposición de la población a productos contaminados, provocando un aumento en la incidencia de enfermedades (Jiménez-Moleón y Solano-Gómez, 2022).

Por tanto, en este artículo se presentan las bacterias VBNC y las matrices donde se han reportado hasta el momento, con la intención de generar una reflexión sobre las implicaciones económicas y de salud que representan. De manera que se impacte a la población, incentivando la adopción de prácticas seguras que eviten o minimicen las afectaciones provocadas por estas bacterias, así como en las autoridades, para promover la imposición del uso de técnicas complementarias a las actuales para la detección y cuantificación de los microorganismos en este estado, con lo que se pueda evitar la exposición, a través de los productos en contacto con el público. Ya que existen métodos de detección de bacterias viables disponibles y efectivos como los de microscopia de fluorescencia o métodos moleculares, una recopilación y explicación más detallada de este aspecto se puede encontrar en Jiménez-Moleón y Solano-Gómez (2022).

### **El estado Viable pero No Cultivable**

El estado VBNC fue descrito por primera vez en 1982 por Xu y colaboradores en *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*. Cuando la bacteria entra al estado VBNC, las células se vuelven pequeñas y redondas (Wei y Zhao, 2018), mantienen sus membranas en buen estado, aunque con variaciones en su composición (Muela *et al.*, 2008), retienen el ADN genómico o plasmídico, conservan su actividad respiratoria y metabólica (Oliver 2005) y es posible que mantengan o modifiquen su potencial de virulencia. Todo lo anterior les termina confiriendo mayor resistencia física, química y a antibióticos (Dong *et al.*, 2020).

Cabe destacar que el riesgo a la salud que implican estas bacterias está relacionado con su capacidad para recuperar su tasa metabólica (la habilidad de replicarse y formar colonias), cuando las condiciones ambientales mejoran, por ejemplo, al eliminar el factor estresante o entrar en contacto con estímulos ambientales. Este proceso se denomina resucitación y fue descrito por primera vez en *Salmonella enteritidis* por Roszak y colaboradores en 1984. Actualmente se han identificado un gran número de bacterias que ingresa al estado VBNC y algunas especies de hongos (Dong *et al.*, 2020). De hecho, se considera que la mayoría de las infecciones alimentarias no específicas, pueden estar relacionadas con la resucitación de las bacterias que entraron en el estado VBNC (Jiménez-Moleón y Solano-Gómez, 2022).

### **Bacterias VBNC en los sectores productivos**

El estado VBNC tiene implicaciones en todos los sectores, por ejemplo, causa pérdidas económicas al afectar cultivos agrícolas, en los que la producción se daña al grado que no pueda ser comercializada, por el ingreso al estado VBNC tras el uso de bactericidas a base de cobre, como en *Acidovorax citrulli* que causa la enfermedad de la mancha bacteriana de la fruta e infecta a las cucurbitáceas (como sandía y melón) (Kan *et al.*, 2019); *Clavibacter michiganensis* que causa el chancro bacteriano en el tomate (Jiang *et al.*, 2016); *Erwinia amylovora* que causa el fuego bacteriano, afecta frutas pomáceas y plantas ornamentales de la familia Rosaceae (Ordax *et al.*, 2006). También lo induce el sulfato de zinc en *Xylella fastidiosa*, que causa la enfermedad de Pierce de la vid, clorosis variegada en cítricos, quemaduras en las hojas del almendro y del arándano (Navarrete y De la Fuente, 2014).

En el área de calidad del agua autores como Guo, *et al.* (2019) y Zhang *et al.* (2018) han reportado que tras la desinfección de agua potable por luz UV se puede inducir el estado VBNC en *E. coli* y *Pseudomonas sp.*, Chen *et al.* (2018) reportaron el ingreso VBNC de *E. coli* tras la desinfección de agua potable por cloración. En el tratamiento de aguas residuales, Oliver *et al.* (2005) reportaron bacterias VBNC de *E. coli* y *Salmonella typhimurium* después de la desinfección por cloración. Así mismo, los lodos residuales pasan por un proceso de estabilización para que puedan ser reutilizados, aprovechando sus características, especialmente los nutrientes. Sin embargo, los procesos de estabilización y saneamiento más utilizados pueden producir la entrada a este estado, como ha sido publicado en procesos de digestión aerobia y anaerobia (Fu *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2013; Viau y Pecia, 2009) y composteo (Isobaev *et al.*, 2019).

Otras especies afectan en la industria de los alimentos como *Lactobacillus brevis* y *L. harbinensis* que deterioran la cerveza y producen sabores indeseables (Liu *et al.*, 2019 y Liu *et al.*, 2018). También, se han detectado bacterias VBNC en productos cárnicos frescos y procesados de res, incluyendo *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* y Enterobacterias; y en productos cárnicos de aves de corral, donde se han identificado *Staphylococcus aureus* (El-Aziz *et al.*, 2018). Estas bacterias causan intoxicación alimentaria e infecciones gastrointestinales con síntomas como: diarrea, dolor abdominal, náuseas, vómito y fiebre.

En otros casos, para determinar la importancia, extensión y los procesos convencionales de desinfección de alimentos que se puedan afectar por las bacterias VBNC y se comprometa su seguridad microbiológica durante el procesado, se ha investigado la inoculación de bacterias en alimentos y se les ha sometido a procesos de desinfección y conservación.

En 2002 Gunasekera y colaboradores inocularon  $2.5 \times 10^6$  mL<sup>-1</sup> de *E. coli* y  $5.8 \times 10^5$  mL<sup>-1</sup> de *Pseudomonas putida* en leche y la pasteurizaron a 63.5°C durante 30 minutos. Ambas especies redujeron su presencia en aproximadamente 4 unidades logarítmicas, medida como UFC; mientras que con el indicador de viabilidad se detectaron 2.5 unidades logarítmicas. Concluyendo que el 1% de *E. coli* y 6% de *P. putida* que aún permanecían viables retenían la habilidad de cultivo, y fueron detectadas por el método de cuantificación convencional, pero una parte de las células que perdieron la habilidad de cultivo y sólo se mantuvieron activas metabólicamente. Los microorganismos bajo estudio, de ser ingeridos, provocan diarrea, calambres abdominales y vómito (Heredia y García, 2018).

Se han inoculado espinacas con *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* Thompson y se desinfectaron con cloro para determinar el ingreso al estado VBNC. El 100% de *L. monocytogenes* en la superficie de la espinaca, ingresó al estado VBNC después de estar en contacto con 50 ppm de cloro por dos minutos y *S. Thompson* lo hizo tras este mismo tiempo de contacto, pero con 100 ppm de cloro (Highmore *et al.*, 2018). Estas bacterias causan las enfermedades Listeriosis y Salmonelosis, con síntomas de gastroenteritis febril que incluyen fiebre, dolor abdominal, náuseas, vómitos y diarrea (Heredia y García, 2018).

En otras investigaciones Dinu y Bach (2011), reportaron que se causa el ingreso al VBNC en *E. coli* O157:H7 inoculada en lechuga al exponerla a condiciones de baja temperatura y luz. Tras 14 días, vieron diferencias en los números de bacterias viables y cultivables, contabilizando 8 log<sub>10</sub> de bacterias viables frente a 6 log<sub>10</sub> de cultivables, lo que indica que se mantenían viables 100 veces más bacterias que las que fueron capaces de ser cultivadas y, por tanto, cuantificadas por métodos convencionales. Esta bacteria es la causante de la colitis hemorrágica y del síndrome urémico hemolítico con síntomas de fiebre, diarrea sanguinolenta, vómitos, anemia hemolítica y daño renal (Heredia y García, 2018).

En bebidas, los autores Anvarian *et al.* (2018) reportaron que al inocular *E. coli* en jugo de naranja natural y adicionado con diferentes niveles de azúcar, ácido ascórbico y/o ácidos orgánicos en simulación a las diferentes concentraciones que se pudieran encontrar según la variedad o la temporalidad del fruto del que se extrajo el jugo, entre otras. Los resultados mostraron que al incrementar la temperatura de refrigeración (4°C) a temperatura ambiente (22.5°C) disminuyó el número de bacterias viables y cultivables; las variaciones de azúcar y de la composición de los ácidos orgánicos tuvieron un efecto despreciable, pero suplementar el jugo con ácido ascórbico (vitamina C) y aminoácidos incrementó la viabilidad

y la posterior habilidad de cultivo; por lo que suplementar el jugo con estas sustancias podría comprometer su seguridad microbiológica en lugar de ser beneficioso.

### **Brotos de enfermedades causados por bacterias VBNC**

Las bacterias patógenas VBNC son un riesgo para la salud pública porque pueden causar brotes de enfermedades, pero a estas alturas lejos de ser una posibilidad, ya es una realidad. Los dos primeros brotes documentados ocurrieron en Japón, cuando, a través del proceso de conservación de alimentos por salado se indujo el estado VBNC. El primero ocurrió en 1998, cuando en cuatro lugares simultáneamente se reportaron 62 casos de infecciones por el consumo de huevas de salmón saladas contaminadas con *E. coli* enterohemorrágica O157:H7, bacteria que sobrevivió el método de conservación y a nueve meses de almacenamiento en congelación (Makino *et al.*, 2000). El segundo ocurrió en 46 prefecturas en 1999, cuando 1500 personas enfermaron por consumir calamar salado contaminado con *S. enterica* (Asakura *et al.*, 2002).

Después, en 2011, Aurass *et al.* (2011) documentaron en Alemania un brote, con 3000 casos, del síndrome urémico hemolítico y diarrea sanguinolenta causado por *E. coli* VBNC. Durante este evento no fue posible confirmar la fuente que dio origen al brote, pero hubo evidencias que apuntaban a los brotes y semillas de fenogreco contaminados, planta empleada para preparar ensaladas y otros platillos. Los autores pusieron en contacto el fenogreco con  $9 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> de la bacteria y lo expusieron a métodos comunes de lavado y desinfección como: inanición, exposición a sales, iones de cobre y diferentes tipos de agua de grifo, estos provocaron la pérdida de la habilidad de cultivo después de cinco días y tras retirar el factor estresante, las bacterias resucitaban y podían causar infecciones.

### **Análisis prospectivo**

La clave para evitar brotes de enfermedades gastrointestinales y otros tipos de infecciones, cuyo origen sea conocido o no, puede encontrarse en el conocimiento y la investigación de las bacterias VBNC. Además de que la integración de métodos adecuados para su detección puede abrir un nuevo enfoque de investigación y preservación de la calidad microbiológica.

Igualmente, se deben evaluar las técnicas que identifiquen los factores o procesos que lleven a las bacterias al ingreso de ese estado para identificar qué métodos de desinfección logran erradicar o reducir los microorganismos a tal grado que no impliquen un riesgo para la salud pública.

También, tener presente el proceso de resucitación ya que las bacterias pueden sobrevivir largos periodos en estado VBNC, resucitar y causar infecciones. Es posible que en los alimentos que fueron sujetos a procesos de desinfección considerados eficaces se encuentren microorganismos VBNC, o que incluso, que algún descuido durante la limpieza, preparación o almacenamiento exponga al público ante el riesgo de contraer alguna infección. Ante esto, los investigadores que trabajan con el estado VBNC han propuesto la necesidad de implementar cambios normativos para incluir la detección y análisis de la viabilidad de las bacterias presentes y no sólo de su habilidad de cultivo, ya que un control de calidad adecuado que implique la detección oportuna de los patógenos viables puede evitar la propagación de enfermedades (Makino *et al.*, 2000; Asakura *et al.*, 2002).

No debemos olvidar que estamos constantemente expuestos a microorganismos patógenos ante los cuales no estamos desprotegidos ya que contamos con el sistema inmune y al fortalecerlo manteniendo una buena dieta, practicando deportes y adoptando hábitos de higiene correctos, entre otros, es posible prevenir enfermedades. Finalmente, las personas que no sufren a menudo de enfermedades gastrointestinales posiblemente tengan los cuidados apropiados y quienes presenten infecciones con regularidad pueden adoptar estas medidas de prevención. Pero siempre será una buena medida que las normativas se complementen con el análisis de viabilidad para asegurar la calidad microbiológica deseada de los productos de venta al público.

#### **Agradecimientos:**

Agradecemos el apoyo del Instituto Interamericano de Tecnología y Ciencias del Agua de la Universidad Autónoma del Estado de México por permitirnos el uso de las instalaciones y proporcionarnos herramientas de investigación. Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante los estudios de maestría de Solano-Gómez con el número de CVU 968940.

#### **Referencias bibliográficas:**

Akoijam, N., Kalita, D. & Joshi, S. R. (2022) Bacteria and Their Industrial Importance. *Industrial Microbiology and Biotechnology*. 63-79. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-5214-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-16-5214-1_2)

Anvarian, A. H., Smith, M. P., & Overton, T. W. (2018). Use of flow cytometry and total viable count to determine the effects of orange juice composition on the physiology of

*Escherichia coli*. *Food science & nutrition*, 6(7), 1817-1825.

<https://doi.org/10.1002/fsn3.756>

Asakura, H., Makino, S. I., Takagi, T., Kuri, A., Kurazono, T., Watarai, M., & Shirahata, T. (2002). Passage in mice causes a change in the ability of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg to survive NaCl osmotic stress: resuscitation from the viable but non-culturable state. *FEMS Microbiology Letters*, 212 (1), 87-93. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11249.x>

Aurass, P., Prager, R., & Flieger, A. (2011). EHEC/EAEC O104: H4 strain linked with the 2011 German outbreak of haemolytic uremic syndrome enters into the viable but non-culturable state in response to various stresses and resuscitates upon stress relief. *Environmental microbiology*, 13(12), 3139-3148. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02604.x>

Dong, K., Pan, H., Yang, D., Rao, L., Zhao, L., Wang, Y., & Liao, X. (2020). Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19 (1), 149-183. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12513>

El-Aziz, N. K. A., Tartor, Y. H., El-Aziz Gharib, A. A., & Ammar, A. M. (2018). Propidium monoazide quantitative real-time polymerase chain reaction for enumeration of some viable but nonculturable foodborne bacteria in meat and meat products. *Foodborne pathogens and disease*, 15 (4), 226-234. <http://doi.org/10.1089/fpd.2017.2356>

Fu, B., Jiang, Q., Liu, H. B., & Liu, H. (2015). Quantification of viable but nonculturable *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. during sludge anaerobic digestion and their reactivation during cake storage. *Journal of Applied Microbiology*, 119 (4), 1138-1147. <https://doi.org/10.1111/jam.12887>

Gunasekera, T. S., Sørensen, A., Attfield, P. V., Sørensen, S. J., & Veal, D. A. (2002). Inducible gene expression by nonculturable bacteria in milk after pasteurization. *Applied and environmental microbiology*, 68 (4), 1988-1993. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1988-1993.2002>

Guo, L., Wan, K., Zhu, J., Ye, C., Chabi, K. & Yu, X. (2021). Detection and distribution of vbnc/viable pathogenic bacteria in full-scale drinking water treatment plants. *Journal of Hazardous Materials*, 406, 124335. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124335>

- Highmore, C. J., Warner, J. C., Rothwell, S. D., Wilks, S. A., & Keevil, C. W. (2018). Viable-but-nonculturable *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar Thompson induced by chlorine stress remain infectious. *MBio*, 9(2), e00540-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00540-18>
- Isobaev, P., Wichuk, K., McCartney, D., & Neumann, N. F. (2019). Sanitary Assurance at Biosolids Composting Facilities: Assessing the Efficiency of Temperature-Contact Time Criterion. *Compost Science & Utilization*, 27 (3), 178-192. <https://doi.org/10.1080/1065657X.2019.1641446>
- Jiang, N., L., Q. Y., Xu, X., Cao, Y. S., Walcott, R. R., Li, J. Q., & Luo, L. X. (2016). Induction of the viable but nonculturable state in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *in planta* resuscitation of the cells on tomato seedlings. *Plant Pathology*, 65 (5), 826-836. <https://doi.org/10.1111/ppa.12454>
- Jiang, Q., Fu, B., Chen, Y., Wang, Y., & Liu, H. (2013). Quantification of viable but nonculturable bacterial pathogens in anaerobic digested sludge. *Applied microbiology and biotechnology*, 97 (13), 6043-6050. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4408-2>
- Jiménez-Moleón, M. C. & Solano-Gómez J. A. (2022) Viable but non-cultivable bacteria and their implications for microbiological safety. *Open Journal of Environmental Biology*. 7 (1): 014-016. <https://www.peertechzpublications.com/articles/OJEB-7-128.php>
- Kan, Y., Jiang, N., Xu, X., Lyu, Q., Gopalakrishnan, V., Walcott, R., Burdman, S., Li, J., & Luo, L. (2019). Induction and resuscitation of the viable but non-culturable (VBNC) state in *Acidovorax citrulli*, the causal agent of bacterial fruit blotch of cucurbitaceous crops. *Frontiers in microbiology*, 10, 1081. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01081>
- Liu, J., Deng, Y., Soteyome, T., Li, Y., Su, J., Li, L., Li, B., Shirliff, M. E., Xu, Z. & Peters, B. M. (2018). Induction and recovery of the viable but nonculturable state of hop-resistance *Lactobacillus brevis*. *Frontiers in Microbiology*, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02076>
- Makino, S. I., Kii, T., Asakura, H., Shirahata, T., Ikeda, T., Takeshi, K., & Itoh, K. (2000). Does enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 enter the viable but nonculturable state in salted salmon roe?. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (12), 5536-5539. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5536-5539.2000>



- Muela, A., Seco, C., Camafeita, E., Arana, I., Orruño, M., López, J. A., & Barcina, I. (2008). Changes in *Escherichia coli* outer membrane subproteome under environmental conditions inducing the viable but nonculturable state. *FEMS microbiology ecology*, 64 (1), 28-36. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00453.x>
- Navarrete, F., & De La Fuente, L. (2014). Response of *Xylella fastidiosa* to zinc: decreased culturability, increased exopolysaccharide production, and formation of resilient biofilms under flow conditions. *Applied and environmental microbiology*, 80 (3), 1097-1107. <https://doi.org/10.1128/AEM.02998-13>
- Oliver, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of microbiology*, 43(spc1), 93-100. <https://www.koreascience.or.kr/article/JAKO200503018543485.page>
- Oliver, J. D., Dagher, M., & Linden, K. (2005). Induction of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* into the viable but nonculturable state following chlorination of wastewater. *Journal of water and health*, 3(3), 249-257. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.548.8394&rep=rep1&type=pdf>
- Organización Mundial de la Salud (2020) Inocuidad de los alimentos. Consulta en línea 25 de agosto de 2022 (<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>).
- Ordax, M., Marco-Noales, E., López, M. M., & Biosca, E. G. (2006). Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: induction of the viable-but-nonculturable state. *Applied and environmental microbiology*, 72(5), 3482-3488. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3482-3488.2006>
- Roszak, D. B., Grimes, D. J., & Colwell, R. R. (1984). Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Canadian journal of microbiology*, 30 (3): 334-338. <https://doi.org/10.1139/m84-049>
- Viau, E., & Peccia, J. (2009). Evaluation of the enterococci indicator in biosolids using culture-based and quantitative PCR assays. *Water research*, 43(19), 4878-4887. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.09.016>
- Wei, C., & Zhao, X. (2018). Induction of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157: H7 by low temperature and its resuscitation. *Frontiers in Microbiology*, 2728. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02728>

Xu, H. S., Roberts, N., Singleton, F. L., Attwell, R. W., Grimes, D. J., & Colwell, R. R. (1982). Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial ecology*, 8 (4), 313-323.

<https://doi.org/10.1007/BF02010671>

Zhang, S., Guo, L., Yang, K., Zhang, Y., Ye, C., Chen, S., Yu, X., Huang, W. & Cui, L. (2019). Induction of *Escherichia coli* into a VBNC state by continuous-flow UVC and subsequent changes in metabolic activity at the single cell level. *Frontiers in Microbiology*, 2243. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02243/full>

Zhang, X. H., Ahmad, W., Zhu, X. Y., Chen, J., & Austin, B. (2020). Viable but nonculturable bacteria and their resuscitation: implications for cultivating uncultured marine microorganisms. *Marine Life Science & Technology*, 3 (2), 189-203.

<https://doi.org/10.1007/s42995-020-00041-3>

Zhao, X., Zhong, J., Wei, C., Lin, C. W., & Ding, T. (2017). Current perspectives on viable but non-culturable state in foodborne pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 8, 580.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00580>

### **III.2 Tercer artículo especializado (en elaboración): Diseño, desarrollo y validación de un cuestionario para evaluar la percepción de riesgo por exposición a bacterias viables pero no cultivables (VBNC)**

#### **Diseño, desarrollo y validación de un cuestionario para medir percepción de riesgo por exposición a bacterias en estado viable pero no cultivable (VBNC)**

##### **Resumen**

Pendiente de contar con mayor avance en resultados.

##### **Palabras clave:**

##### **INTRODUCCIÓN:**

Regularmente las investigaciones sociales requieren la recolección de datos haciendo uso de encuestas que cumplan esa función y para ello, es preciso que el investigador seleccione con cuidado el instrumento apropiado. Este instrumento o herramienta es el cuestionario y a pesar de que hay algunos que ya están elaborados y a disposición pública para su uso o modificación, el investigador debe evaluar si alguno de los disponibles cubre los objetivos de su estudio y, en caso de que no sea así, debe proceder a diseñar un nuevo cuestionario.

El cuestionario se define como una herramienta o instrumento que puede incluir una serie de preguntas abiertas, cerradas o una combinación de ellas que midan cuantitativamente la información que se espera obtener. Es importante aclarar que difiere de la encuesta ya que, más bien, ese término hace referencia al método de recolección de datos cuando un encuestador aplica el cuestionario (Pozzo et al., 2018).

Se considera que existen dos tipos de cuestionarios según la forma en que se aplica: (1) uno de ellos es el autoadministrado, en el cual no hay influencia por parte del encuestador porque el individuo lee las preguntas por sí mismo y las responde, como ocurre en los cuestionarios que se aplican en línea y a través de redes sociales; y el otro tipo es el administrado por un entrevistador, en el cual existe una interacción en la que el entrevistador cuestiona y el entrevistado responde como ocurre con los cuestionarios que se aplican vía telefónica o frente a frente (Farook, 2018).

Para poder aplicar un cuestionario este debe pasar por un proceso de validación, donde se revisa el contenido del instrumento, a través de un panel de expertos quienes deben ser

seleccionados según su formación académica y experiencia profesional. Después de que los expertos expongan sus comentarios, el investigador debe hacer los cambios oportunos para llegar al documento validado como lo han hecho varios autores.

Existen diferentes procesos de validación y cada investigador los adapta según lo que resulte más conveniente para el proyecto dado que algunos autores envían su cuestionario solo una vez a un grupo de expertos, hay quienes lo envían dos veces al mismo panel y hay autores que envían la primera versión de su instrumento a un panel de expertos y la segunda versión a otro diferente, como Capone et al. (2021) quienes elaboraron un instrumento para medir la percepción de riesgo por COVID-19 y enviaron su primera versión con 12 ítems a especialistas en psicología social y salud, quienes sugirieron eliminar cuatro preguntas, la segunda versión con ocho ítems a especialistas en educación para la salud, psicología social y sociología considerando ambas opiniones se obtuvo un instrumento con cuatro ítems.

Kennedy et al. (2019) diseñaron y validaron un cuestionario para evaluar habilidades alimentarias. El proceso de validación incluyó un panel de expertos que hizo observaciones sobre el desarrollo y correcciones del cuestionario. El panel fue seleccionado según la relación de su experiencia profesional con el área de investigación, por ejemplo, recurrieron a chefs, nutriólogos, académicos etc... Finalmente consultaron a 17 expertos de los cuales 11 respondieron con la evaluación del cuestionario con 26 preguntas. Las adecuaciones los llevaron a un cuestionario validado con 39 ítems.

En 2021 Shen y colaboradores elaboraron una escala de percepción de riesgo dirigida a las emergencias de salud pública. Ellos consultaron a un panel de expertos especializados en psicología, salud pública y epidemiología, incluyendo tres hombres y tres mujeres con edades de entre 35 a 54 años con más de 10 años de experiencia, con nivel de estudios de maestría o superior. Posterior a la revisión se modificaron los ítems según sus sugerencias de modificaciones en la redacción y eliminación obteniendo un instrumento final de 9 ítems.

En 2021 Batista et al. crearon un cuestionario dirigido a niños y adolescentes de escasos recursos para evaluar los conocimientos de inocuidad de los alimentos, prácticas y percepción de riesgo. Para la validación de su instrumento seleccionaron un panel de 22 expertos a quienes enviaron información para comunicar y orientar sobre el tema y el proceso de evaluación, posteriormente les hicieron llegar su cuestionario y 16 de los expertos participaron en el análisis de la segunda versión. A partir de las observaciones de

pertinencia, claridad, sencillez, entre otras, se diseñó el cuestionario final que incluyó 11 ítems de conocimientos, 11 de prácticas y 5 de percepción de riesgo.

En la presente investigación el diseño del cuestionario fue dirigido a evaluar la percepción de riesgo por exposición a bacterias en estado viable pero no cultivable (VBNC por sus siglas en inglés). Las bacterias en estado viable pero no cultivable son un peligro latente para la salud pública, ya que son microorganismos que se protegen ante factores ambientales que resulten adversos para su supervivencia y difícilmente son detectados, puesto que pierden su habilidad de cultivo, que es la cualidad que se utiliza al momento de cuantificar o verificar su presencia. Por lo que se obtiene un falso negativo a contaminación microbiológica ya que las bacterias sí están presentes vivas (viables) pero no están cultivables y no se reproducen.,

La transición a ese estado supone un costo para las bacterias/microorganismos al disminuir su metabolismo y modificar su virulencia (Oliver, 2005 y Xu et al., 1982). Sin embargo, también les otorga beneficios como una mayor resistencia física y química y la capacidad para resucitar, término empleado para describir la vuelta a la normalidad de los procesos metabólicos, virulencia y de la habilidad de cultivo para estos microorganismos; esto ocurre cuando las bacterias se encuentran ante estímulos ambientales que les resulten favorables como cambios en la temperatura, la presencia de nutrientes o sustancias químicas, entre otros. Posterior a la resucitación les es posible dividirse, formar colonias y causar enfermedades (Dong et al., 2020).

Estas bacterias han sido relacionadas con brotes de enfermedades e implican un riesgo microbiológico para la salud pública (Aurass et al., 2011; Asakura et al., 2002 & Makino et al., 2000), por ello es importante conocer el nivel de conocimiento, cuál es la percepción de riesgo (tanto de las personas que laboran en áreas que conllevan un contacto directo y recurrente como en la en población general), ya que estos microorganismos habitualmente se encuentran en el ambiente y matrices que están en contacto con las personas, como alimentos y bebidas.

Dado que las personas están en constante contacto con microorganismos en este estado, es importante identificar el nivel de conocimiento, la percepción de riesgo ante la exposición a ellos y su disposición a adoptar o modificar los hábitos de prevención de la población. Por lo que, el objetivo de esta publicación es exponer el proceso seguido para diseñar un cuestionario que permitiese obtener la información pertinente ante un posible problema de

salud pública al que se le atribuyen la mayoría de las infecciones gastrointestinales no específicas.

## METODOLOGÍA

Durante el desarrollo de una investigación que precise del uso de un cuestionario para la obtención de datos a forma de opiniones se deben establecer objetivos generales y específicos que indiquen qué es lo que va a medir el instrumento, a quienes va a dirigirse y se debe justificar el porqué de su creación en caso de no usar un cuestionario preexistente o una adaptación (Yusoff et al., 2021).

El correcto diseño de un cuestionario requiere de un conjunto de pasos detallados a los cuales se debe prestar atención dado que esta herramienta definirá los resultados de la investigación (Figura 1).

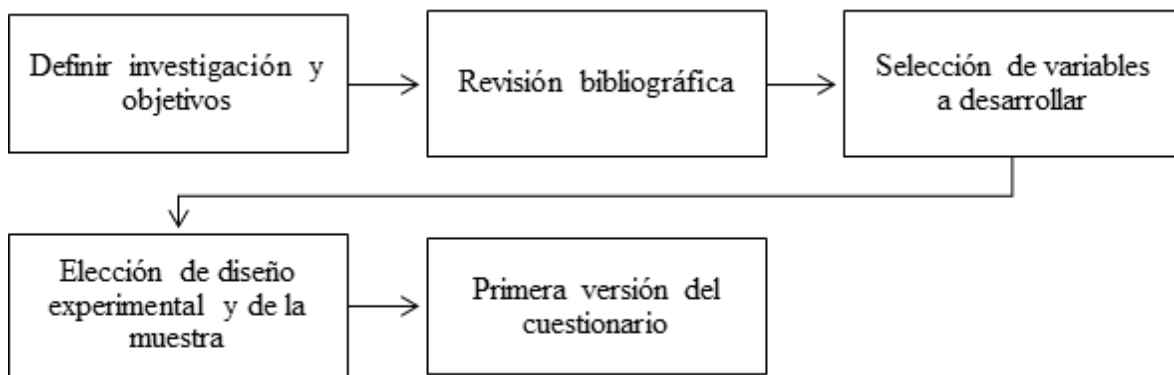


Figura 1. Síntesis de los pasos para el diseño de un cuestionario.

El diseño inicia con la revisión bibliográfica, proceso durante el cual se lleva a cabo una búsqueda minuciosa de investigaciones y publicaciones recientes que provengan de fuentes confiables y reconocidas, tales como libros, artículos científicos, de revisión y otros (Reethesh et al., 2019).

Cabe mencionar que conforme avanza este proceso el investigador mejora la perspectiva de la búsqueda y la evaluación de la pertinencia de la literatura, llevando a establecer el estado del arte, guiando la selección de las variables de importancia y exponiendo las limitaciones que han enfrentado otros investigadores. Una vez analizada la información que fue consultada y siguiendo los objetivos planteados en la investigación es posible definir o el contenido del cuestionario al seleccionar las variables que serán desarrolladas, la

elección del diseño experimental y la selección de la muestra al concretar el tamaño muestral y la población que será encuestada (Salamaca- Castro, 2021).

Es igual de importante seleccionar el método de muestreo que se aplicará, puede ser un muestreo probabilístico de tipo aleatorio simple, estratificado o por conglomerados o un muestreo no probabilístico por cuotas (también conocido como accidental), intencional o de conveniencia o bola de nieve (Acharya et al., 2013).

Una vez que se delimitan los puntos anteriores se puede iniciar la primera versión del instrumento. Al momento de redactar las preguntas se debe procurar el uso de un lenguaje entendible y claro considerando las características de población a quien se va a encuestar (nivel de estudios, formación académica, etc.), se deben emplear palabras simples, las preguntas deben ser concretas, en cada pregunta solo se debe tratar un tema a la vez, se debe evitar que la pregunta incentive al encuestado a seleccionar una respuesta en particular (Reethesh et al., 2019 y Krosnick, 2018) y se debe guardar un orden lógico en su secuencia (Jenn, 2006). Es importante aplicar estos mismos puntos en la redacción de las instrucciones y especificaciones.

Durante la creación del cuestionario es muy importante considerar que formato se empleara en las preguntas ya sean cerradas o abiertas según las necesidades de la investigación. Por un lado, las preguntas cerradas tienen las ventajas de requerir menor esfuerzo y tiempo por parte del encuestado y dan mayor facilidad para la comparación y análisis de las respuestas. Sin embargo, requieren una mayor preparación por parte del encuestador y limitan las respuestas en comparación de las preguntas abiertas, en las que se obtiene más información, aunque la desventaja es que las respuestas pueden ser ambiguas y son más difíciles de analizar (Hernández et al., 2014).

En caso de medir actitudes u opiniones uno de los métodos más conocidos es la escala tipo Likert ya que se usa frecuentemente por ser práctica, fiable y adaptable. En esta escala se indica el nivel de acuerdo o desacuerdo a una afirmación eligiendo entre tres, cinco o siete categorías (Hodge & Gillespiere, 2005).

Una vez que se ha terminado de diseñar el cuestionario y se obtiene la versión primera versión se procede al proceso de validación, que consiste en evaluar el contenido del cuestionario, midiendo que tan confiable es y que tan bien reúne los datos que abarca la investigación (Taherdoost, 2018).

Esta parte también pasa por varias etapas que (Figura 2).

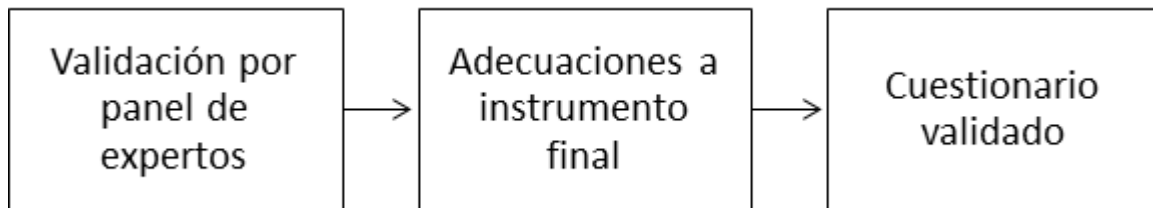


Figura 2. Síntesis de los pasos para la validación del cuestionario.

Durante este proceso se realiza una evaluación por parte de un panel de expertos en el que se selecciona a un grupo de individuos cuya formación académica y experiencia laboral sea áreas relacionadas a la investigación. Se debe resaltar que el número de expertos seleccionados quedan al juicio del investigador, y la decisión puede ser sustentada por la información encontrada en la revisión bibliográfica. Sin embargo, en la revisión bibliográfica se puede analizar el número de expertos consultados por otros investigadores para así delimitar la cifra que resulte más conveniente a los fines de la investigación.

Finalmente, tras atender las revisiones que surjan de los pasos anteriores es posible obtener un instrumento validado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como resultados de la fase teórica que constó de la revisión bibliográfica de recursos en línea se obtuvieron una serie artículos y capítulos de libros actuales que resultaron pertinentes para la investigación.

El enfoque de la revisión fue sobre publicaciones enfocadas en bacterias patógenas en estado VBNC, para conocer las modificaciones que sufren las células cuando pierden de la habilidad de cultivo como la disminución del metabolismo (Shleeva et al., 2004), las variaciones en el tamaño haciéndose más pequeñas (Wei & Zhao, 2018), el incremento en la resistencia física y química (Signoretto et al., 2000) y las variaciones en el potencial de virulencia (Dong et al., 2020); los factores que conducen al ingreso del estado VBNC como la exposición a altas o bajas temperaturas, altos o bajos niveles de pH, metales pesados, entre otros (Kan et al., 2019 & Ramamurthy et al., 2014), incluyendo los procesos de desinfección y conservación de los alimentos (Dong et al., 2020); y, finalmente, los estímulos que permiten la resucitación como químicos, proteínas activas, el aumento o disminución de la temperatura y otros (Zhao et al., 2017 & Zhang et al., 2021).



También se analizó el término percepción de riesgo entendiéndolo como la evaluación social de que ocurra un suceso y el daño que pueda causar (Cori et al., 2020 & Lechowska, 2018) y se relacionó con las bacterias en estado VBNC. Se consultaron estudios previos sobre la percepción de riesgo microbiológico que sirvieron como guía para determinar la estructura del cuestionario, los temas de interés o elementos desarrollados y la selección de cómo fueron medidas las respuestas teniendo como opciones preguntas cerradas o abiertas.

Tras la extensiva revisión bibliográfica, no se consideró que ninguna de las propuestas de instrumentos disponibles, consiguieran cubrir con los objetivos perseguidos en la investigación, ni incluso tras su adaptación (quizá por lo novedoso del tema analizado, - las bacterias en estado VBNC fueron descubiertas apenas en la década de los 80 y no son aún de un gran dominio público-), por lo que se procedió a generar un nuevo cuestionario. En él se propusieron preguntas para recolectar datos sociodemográficos; así como el nivel de “experiencia” ante matrices con deficiente calidad microbiológica, dado que Wachinger et al. (2013) mencionan que estar expuestos al peligro modifica la percepción del riesgo. Posteriormente, se formularon preguntas para evaluar en nivel de conocimientos; la percepción de riesgo); hábitos o prácticas y predisposición a cambiar de hábitos, una vez que se le presente información sobre la existencia y efectos de la presencia de bacterias en estado VBNC.

La propuesta fue que las respuestas se midieran con la escala Lickert de cinco puntos al igual que Barret y Feng (2021), Batista et al., (2021) y Brouwer et al., (2020). En este cuestionario las afirmaciones fueron evaluadas por los extremos de completamente de acuerdo al completamente en desacuerdo.

Con estas consideraciones se redactó la primera versión del cuestionario. Desarrollando los elementos que se mencionan anteriormente se elaboraron 59 preguntas.

Para la validación del cuestionario se seleccionó un panel de 15 expertos considerando su formación académica, conocimientos y experiencia relacionados con la seguridad microbiológica, incluyendo especialistas en ciencias del agua, biológicas y de la salud. De los 15 expertos consultados, hasta el momento se recibió respuesta de cuatro de ellos, por lo que se está a la espera de conseguir alguna aportación más para evaluar las observaciones y comentarios, y checar la pertinencia, claridad y congruencia de las

preguntas. Si considerar que hay que volver a redactar alguna de ellas, o cuáles deberían ser eliminadas o incluidas.

## REFERENCIAS

Acharya, A. S., Prakash, A., Saxena, P., & Nigam, A. (2013). Sampling: Why and how of it. *Indian Journal of Medical Specialties*, 4(2), 330-333.

[https://www.researchgate.net/profile/Anita-Acharya-2/publication/256446902\\_Sampling\\_Why\\_and\\_How\\_of\\_it\\_Anita\\_S\\_Acharya\\_Anupam\\_Prakash\\_Pikee\\_Saxena\\_Aruna\\_Nigam/links/0c960527c82d449788000000/Sampling-Why-and-How-of-it-Anita-S-Acharya-Anupam-Prakash-Pikee-Saxena-Aruna-Nigam.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Anita-Acharya-2/publication/256446902_Sampling_Why_and_How_of_it_Anita_S_Acharya_Anupam_Prakash_Pikee_Saxena_Aruna_Nigam/links/0c960527c82d449788000000/Sampling-Why-and-How-of-it-Anita-S-Acharya-Anupam-Prakash-Pikee-Saxena-Aruna-Nigam.pdf)

Capone, V., Donizzetti, A. R., & Park, M. S. A. (2021). Validation and Psychometric Evaluation of the COVID-19 Risk Perception Scale (CoRP): a New Brief Scale to Measure Individuals' Risk Perception. *International Journal of Mental Health and Addiction*, 1-14.

<https://link.springer.com/article/10.1007/s11469-021-00660-6>

Capone, V., Donizzetti, A. R., & Park, M. S. A. (2021). Validation and Psychometric Evaluation of the COVID-19 Risk Perception Scale (CoRP): a New Brief Scale to Measure Individuals' Risk Perception. *International Journal of Mental Health and Addiction*, 1-14.

Farooq, R. (2018). How to design and frame a questionnaire. In *Innovations in Measuring and Evaluating Scientific Information* (pp. 50-60). IGI Global.

[https://www.researchgate.net/profile/Rayeys-Farooq-2/publication/325538253\\_How\\_to\\_Design\\_and\\_Frame\\_a\\_Questionnaire/links/5b98b6f092851c4ba812204a/How-to-Design-and-Frame-a-Questionnaire.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Rayeys-Farooq-2/publication/325538253_How_to_Design_and_Frame_a_Questionnaire/links/5b98b6f092851c4ba812204a/How-to-Design-and-Frame-a-Questionnaire.pdf)

Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, P. (2014). *Metodología de la investigación* (pp. 220-221) McGraw-Hill.

Hodge, D. & Gillespie, D. (2005). Phrase Completion Scales. *Encyclopedia of Social Measurement*. 53- 62. [https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1300/J079v33n04\\_01](https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1300/J079v33n04_01)

Jenn, N. C. (2006). Designing a questionnaire. *Malaysian family physician: the official journal of the Academy of Family Physicians of Malaysia*, 1(1), 32. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4797036/>

Kennedy, L. G., Kichler, E. J., Seabrook, J. A., Matthews, J. I., & Dworatzek, P. D. (2019). Validity and reliability of a food skills questionnaire. *Journal of nutrition education and behavior*, 51(7), 857-864.

Krosnick, J. A. (2018). Questionnaire design. In *The Palgrave handbook of survey research* (pp. 439-455). Palgrave Macmillan, Cham.

Ortiz-Gonçalves, B., Santiago-Sáez, A., Albarrán Juan, E., Labajo González, E., & Perea-Pérez, B. (2018). Elaboración de un cuestionario sobre conocimientos y actitudes de la población madrileña frente al final de la vida. *Gaceta Sanitaria*, 32, 373-376. <https://www.scielosp.org/article/gs/2018.v32n4/373-376/es/>

Pozzo, M. I., Borgobello, A., & Pierella, M. P. (2018). Uso de cuestionarios en investigaciones sobre universidad: análisis de experiencias desde una perspectiva situada. *Revista Latinoamericana de Metodología de las Ciencias Sociales*, 8(2). [https://www.memoria.fahce.unlp.edu.ar/art\\_revistas/pr.9347/pr.9347.pdf](https://www.memoria.fahce.unlp.edu.ar/art_revistas/pr.9347/pr.9347.pdf)

Reethesh, S. R., Ranjan, P., Arora, C., Kaloiya, G. S., Vikram, N. K., Dwivedi, S. N., Jyotsna, V, P., & Soneja, M. (2019). Development and validation of a questionnaire assessing knowledge, attitude, and practices about obesity among obese individuals. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 23(1), 102. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6446687/>

Salamanca- Castro, A. B. (2021). 10 reglas de oro para la redacción de un artículo original. NURE investigación: Revista Científica de enfermería, (112), 1. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7961464>

Shen, Z., Zhong, Z., Xie, J., Ding, S., Li, S., & Li, C. (2021). Development and psychometric assessment of the public health emergency risk perception scale: Under the outbreak of COVID-19. International journal of nursing sciences, 8(1), 87-94. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352013220301836>

Taherdoost, H. (2018). Validity and Reliability of the Research Instrument; How to Test the Validation of a Questionnaire/Survey in a Research. SSRN Electronic Journal, 5 (3), 28–36. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02546799/document>

Yusoff, M. S. B., Arifin, W. N., & Hadie, S. N. H. (2021). ABC of Questionnaire Development and Validation for Survey Research. Education in Medicine Journal, 13(1). [https://eduimed.usm.my/EIMJ20211301/EIMJ20211301\\_10.pdf](https://eduimed.usm.my/EIMJ20211301/EIMJ20211301_10.pdf)