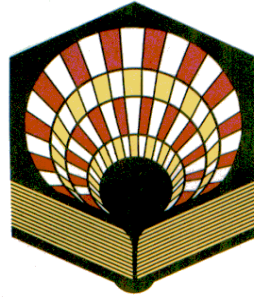


DEPARTAMENTO DE BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS
ALIMENTOS

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



TESIS DOCTORAL

TÍTULO:

Evaluación de las condiciones higiénico-sanitarias
y seguridad microbiológica de establecimientos de
restauración colectiva y de platos de ensalada y cárnicos
cocidos destinados a poblaciones de riesgo
de Andalucía

LIC. MAGDEVIS YANET RODRÍGUEZ CATURLA

DIRECTORES:

DR. GONZALO ZURERA COSANO

DR. ANTONIO VALERO DÍAZ

TITULO: *Evaluación de las condiciones higiénico-sanitarias y seguridad microbiológica de establecimientos de restauración colectiva y de platos de ensalada y cárnicos de Andalucía*

AUTOR: *MAGDEVIS YANET RODRÍGUEZ CATURLA*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

TÍTULO: “Evaluación de las condiciones higiénico-sanitarias y seguridad microbiológica de establecimientos de restauración colectiva y de platos de ensalada y cárnicos cocidos destinados a poblaciones de riesgo de Andalucía”

Tesis que presenta la Licenciada Magdevis Yanet Rodríguez Caturla
para optar por el grado de Doctor

La Doctoranda:

Firma

Magdevis Yanet Rodríguez Caturla

V°B°

Los Directores

Catedrático Dr. Gonzalo Zurera Cosano

Dr. Antonio Valero Díaz

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a una beca pre-doctoral de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID) y al Proyecto de Excelencia AGR-01879 concedido al Grupo HIBRO de la Universidad de Córdoba.

A mi hijo, mis padres y hermano

El deseo de conocimiento, como la sed de riqueza, aumenta a medida que se va adquiriendo.

Laurence Sterne

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración de una manera u otra de un amplio grupo de personas que merecen les dedique estas líneas.

Primero, mis más sinceros agradecimientos a mis directores de Tesis el Dr. Gonzalo Zurera Cosano y el Dr. Antonio Valero Díaz.

Al Dr. Gonzalo Zurera Cosano, por la oportunidad que me dio de unirme a este excelente grupo de investigación y acogerme de tan buen modo.

Al Dr. Antonio Valero Díaz, por su valiosa e incondicional ayuda, por su infinita paciencia, por la confianza que depositó en mí cuando llegué de Cuba con un incipiente conocimiento de microbiología de los alimentos y ninguno sobre el trabajo de laboratorio y mucho menos de microbiología predictiva; me imagino que cuando le hablaron de mí, no sabía en el buen lío que se estaba metiendo. Aún así siempre confío y yo le respondí con mucho empeño y estuvo ahí cuando lo necesité y eso se lo agradeceré toda mi vida.

Antonio: disculpa por las preguntas “tontas”, mi vocabulario de principiante y mis despistes.....

A la Dra. Rosa María García-Gimeno, por su comprensión y paciencia que de buena forma me ayudaron a seguir adelante en los momentos más difíciles.

A los Doctores, Francisco Rincón y Fernando Pérez-Rodríguez, mis agradecimientos por la ayuda incondicional que me prestaron cuando la necesité.

Como no, a la Dra. Elena Carrasco Jiménez, que desde el principio me acogió muy bien pero creo que la amistad comenzó a consolidarse con una anécdota bastante curiosa en el laboratorio (gajes del oficio) que indirectamente hizo que hoy acabáramos siendo muy buenas amigas. “Helen te agradezco por haber llorado y reído conmigo en todo este tiempo y sobre todo en este último año, por dedicarme todo tu tiempo cuando lo necesité, sin importarte que estaba consumiendo parte del

tuyo, por tus consejos, por trasmitirme tus conocimientos como solo tú sabes hacerlo, por tus charlas en el desayuno y en la comida y tus palabras para subirme el ánimo, por tus quedadas improvisadas, por acogerme como un familiar más (gracias a tu familia, por todos los gestos buenos que tuvieron conmigo), por tus lecciones de inglés, por tus aventones en las horas pico..... Por todo eso guardaré esta amistad como un tesoro; y que sepas que en Cuba tienes otra familia.

Agradezco a mis compañeros de grupo, a los que están y los que estuvieron, por todos los momentos vividos durante todos estos años, que me han aportado muy buenas experiencias en lo profesional y lo personal y por soportarme: Andrés “Andrew” mi compi de despacho (por su paciencia, por sus consejos, por hacerme reír en los momentos más tensos), Francielli Dalcanton, mi amiga brasileña (por sus gestos y brindarme todo su cariño y apoyo), Juani (por estar siempre ahí cuando te necesite y escucharme en mis momentos difíciles), Juan Luis (por haber sido mi brazo derecho en la última etapa experimental y soportarme), Denisse (te agradezco por ser tan original y sobrellevarme todo este tiempo), Rafa Ventura (por tu ayuda incondicional cada vez que tenía un problemón con el ordenador), Susana (por tus palabras de aliento), Pablo (porque aunque no estés, nunca te olvidas de los compañeros), Profesor Emiro Valbuena (por los buenos momentos, por tu jocosidad “venezolana”, por tu apoyo, por trasmitirme parte de tus conocimientos siempre que tuviste una oportunidad), Sergio (por tu absoluta disposición, paciencia y ayuda en el experimento con lechuga), Fouaz Fernane, Rosario.

A los demás compañeros del departamento por sus constantes preocupaciones cuando me veían triste o preocupada, y como no, por compartir conmigo también momentos muy alegres: Jean (eternamente agradecida por tu compañía y tener siempre un sí para mí), José Carlos, María, Rosa, Loli, José Manuel.

Agradezco a la Dra. Lourdes (...eres muy auténtica mi “Mary”), mis “vecinas” la Dra. Hortensia Galán y Pilar Ruíz, por sus consejos y sus constantes preocupaciones.

Mis agradecimientos a los especialistas del Departamento de Microbiología de la Conserjería de Salud Pública de Córdoba que me acogieron como una más del departamento y me brindaron toda su ayuda en la utilización del MiniVidas: al Dr. Fernando García Viejo, María y Pepi.

A mis amigos, Katy y José Manuel, Liván, Augusto y Mariló, por hacerme sentir como en familia y brindarme todo su apoyo.

Mis agradecimientos a António Da Silva Alexandre, por su perseverancia, su interés en mi superación profesional, por ser una persona previsor, que sin su ayuda no hubiera podido venir a España a realizar mis estudios de Doctorado.

A mi Mary (mi “Maricú”): ---Tan iguales y tan diferentes--- te agradezco por todos los buenos y malos momentos que has vivido conmigo, por seleccionarme como tu número VIP para saber de mí cada tarde, cómo había transcurrido mi día, cómo me sentía, qué sabía de mi familia, cómo estaba mi hijo. Por los momentos tan gratos que compartimos que me hacían desconectarme de muchas cosas, por pensar en mí para cualquier decisión personal, por hacerme sentir la hermana mayor....Te agradezco infinitamente tantos gestos buenos para conmigo y por estar ahí siempre, al igual que a tu familia. Espero que la distancia no nos distancie.

Al escribir los agradecimientos, me han suscitado una mezcla de sentimientos, lo mismo he llorado que me he reído y siento que eso es muy bueno y quiero que lo sepáis.

Mis agradecimientos a todos.....

Córdoba, 30 de Septiembre de 2012,

Janet

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	I
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN Y ANTECEDENTES	11
2.1. SECTOR DE LA RESTAURACIÓN COLECTIVA EN ESPAÑA.....	13
2.1.1. CARACTERIZACIÓN DEL SECTOR DE LA RESTAURACIÓN COLECTIVA	13
2.1.1.1. DEFINICIÓN Y TIPOS DE RESTAURACIÓN COLECTIVA	13
2.1.1.2. SITUACIÓN ACTUAL DEL SECTOR DE LA RESTAURACIÓN COLECTIVA EN ESPAÑA	14
2.1.1.3. CONSUMO FUERA DEL HOGAR.....	15
2.1.1.4. RESTAURACIÓN INSTITUCIONAL.....	16
2.1.1.5. PAPEL SOCIAL DE LA RESTAURACIÓN INSTITUCIONAL.....	19
2.2. FACTORES DE RIESGO DE CONTAMINACIÓN MICROBIANA EN ESTABLECIMIENTOS DE RESTAURACIÓN COLECTIVA.....	20
2.2.1. PRACTICAS DE HIGIENE DE LOS MANIPULADORES DE ALIMENTOS.....	20
2.2.2. DISPONIBILIDAD DE RECURSOS SANITARIOS	26
2.2.3. USO DE GUANTES.....	26
2.2.4. CONTAMINACIÓN CRUZADA.....	27
2.2.5. TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO.....	28
2.2.6. FORMACIÓN DE LOS MANIPULADORES.....	30
2.3. PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS Y VEGETALES DE IV GAMA.....	33
2.3.1. BENEFICIOS NUTRICIONALES DE LOS PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS.....	33
2.3.2. VEGETALES DE IV GAMA EN ESPAÑA. IMPORTANCIA DEL SECTOR	34
2.3.3. DESARROLLO COMERCIAL DE LA IV GAMA EN EL RESTO DEL MUNDO.....	37
2.3.4. TECNOLOGÍA DE FABRICACIÓN DE ENSALADAS VEGETALES DE IV GAMA	38
2.3.5. ACONDICIONAMIENTO DE LAS ENSALADAS VEGETALES DE IV GAMA EN ESTABLECIMIENTOS DE RESTAURACIÓN COLECTIVA.....	42
2.4. CARNES Y PRODUCTOS CÁRNICOS LISTOS PARA EL CONSUMO.....	45
2.4.1. BENEFICIOS NUTRICIONALES DE LAS CARNES Y PRODUCTOS CÁRNICOS.....	45
2.4.2. SECTOR DE LA INDUSTRIA CÁRNICA EN ESPAÑA	45
2.4.3. TECNOLOGÍA DE FABRICACIÓN DE PRODUCTOS CÁRNICOS COCIDOS RTE.....	49

2.4.4.	ACONDICIONAMIENTO DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS COCIDOS RTE EN ESTABLECIMIENTOS DE RESTAURACIÓN	52
2.5.	LEGISLACIÓN APLICABLE Y CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS.....	55
2.5.1.	REAL DECRETO 3484/2000 POR EL QUE SE ESTABLECEN LAS NORMAS DE HIGIENE PARA LA ELABORACIÓN, DISTRIBUCIÓN Y COMERCIO DE COMIDAS PREPARADAS	55
2.5.2.	REGLAMENTO (CE) 2073/2005 RELATIVO A LOS CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS APLICABLES A LOS PRODUCTOS ALIMENTICIOS	56
2.6.	CALIDAD HIGIÉNICO-SANITARIA Y SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS PLATOS PREPARADOS RTE	61
2.6.1.	PRINCIPALES GRUPOS MICROBIANOS QUE INFLUYEN SOBRE LA CALIDAD HIGIÉNICO-SANITARIA DE LOS ALIMENTOS	61
2.6.1.1.	<i>MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS</i>	62
2.6.1.2.	<i>BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS</i>	63
2.6.1.3.	<i>ENTEROBACTERIAS</i>	64
2.6.1.4.	<i>COLIFORMES TOTALES Y FECALES</i>	65
2.6.2.	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	66
2.6.3.	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	69
2.6.4.	MICROORGANISMOS PATÓGENOS	71
2.6.4.1.	<i>SALMONELLA</i>	72
2.6.4.2.	<i>BACILLUS CEREUS</i>	72
2.6.4.3.	<i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	73
2.6.4.4.	<i>CAMPYLOBACTER</i>	73
2.6.4.5.	<i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i>	74
2.6.5.	CALIDAD HIGIÉNICO-SANITARIA DE LOS PLATOS PREPARADOS RTE	74
2.6.5.1.	CALIDAD HIGIÉNICO-SANITARIA DE LOS PLATOS DE ENSALADA RTE.....	76
2.6.5.2.	CALIDAD HIGIÉNICO-SANITARIA DE LOS PLATOS DE CÁRNICOS COCIDOS RTE 77	
2.7.	MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA	83
2.7.1.	APLICACIONES DE LA MICROBIOLOGÍA	84
2.7.2.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	86
2.7.3.	GENERACIÓN DE DATOS	87
2.7.3.1.	MÉTODOS TRADICIONALES DE GENERACIÓN DE DATOS	88
2.7.3.2.	MÉTODOS RÁPIDOS DE GENERACIÓN DE DATOS.....	89
2.7.3.2.1.	TURBIDIMETRÍA.....	89

2.7.3.2.2. MÉTODO DE CITOMETRÍA DE FLUJO	92
2.7.3.2.3. MÉTODO DE MICROSCOPIA Y ANÁLISIS DE IMAGEN	92
2.7.3.2.4. MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS: IMPEDANCIA Y CONDUCTANCIA.....	93
2.7.4. MODELOS MATEMÁTICOS.....	93
2.7.4.1. MODELOS PRIMARIOS	94
2.7.4.1.1. MODELOS CINÉTICOS DE CRECIMIENTO.....	95
2.7.4.1.1.1. MODELO DE BARANYI	97
2.7.4.1.1.2. MODELO DE HILLS	98
2.7.4.1.1.3. MODELO DE BUCHANAN.....	98
2.7.4.1.1.4. MODELO DE MCKELLAR	99
2.7.4.1.2. MODELOS DE SUPERVIVENCIA E INACTIVACIÓN MICROBIANA.....	100
2.7.4.1.2.1. MODELO LINEAL.....	100
2.7.4.1.2.2. MODELO DE HOMBRO Y COLA/ MODELO DE WEIBULL.....	101
2.7.4.2. MODELOS SECUNDARIOS	103
2.7.4.2.1. MODELOS POLINOMIALES.....	104
2.7.4.2.2. MODELOS DE RAÍZ CUADRADA	105
2.7.4.2.3. MODELO DE PARÁMETRO CARDINAL Y CONCEPTO GAMMA.....	106
2.7.4.2.4. MODELOS DE PROBABILIDAD	107
2.7.4.3. MODELOS TERCARIOS	110
2.7.4.3.1. PATHOGEN MODELING PROGRAM (PMP).....	110
2.7.4.3.2. COMBASE.....	111
2.7.4.3.3. SYM'PREVIUS.....	113
2.7.4.3.4. SEAFOOD SPOILAGE AND SAFETY PREDICTOR (SSSP).....	113
2.7.4.3.5. MICROBIAL RESPONSES VIEWER (MRV).....	114
2.7.4.3.6. MICROHIBRO.....	115
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	117
4. RESULTADOS.....	123
PUBLICACIÓN 1:	127
PUBLICACIÓN 1: EVALUACIÓN DE LAS PRÁCTICAS DE HIGIENE Y SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA DE ENSALADAS VEGETALES LISTAS PARA EL CONSUMO EN COMEDORES ESCOLARES EN ESPAÑA.....	129
EVALUATION OF HYGIENE PRACTICES AND MICROBIOLOGICAL STATUS OF READY-TO-EAT VEGETABLE SALADS IN SPANISH SCHOOL CANTEENS	129

PUBLICACIÓN 2	145
PUBLICATION 2: SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS LISTOS PARA EL CONSUMO SERVIDOS EN RESIDENCIAS GERIÁTRICAS EN ANDALUCÍA	147
EVALUATION OF FOOD HANDLER PRACTICES AND MICROBIOLOGICAL STATUS OF READY-TO-EAT FOODS IN LONG-TERM CARE FACILITIES IN ANDALUSIA REGION OF SPAIN	147
PUBLICACIÓN 3	161
PUBLICATION 3: CONDICIONES HIGIÉNICAS Y SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS REFRIGERADOS LISTOS PARA EL CONSUMO SERVIDOS EN HOSPITALES DEL SUR DE ESPAÑA	163
HYGIENIC CONDITIONS AND MICROBIOLOGICAL STATUS OF CHILLED READY-TO-EAT PRODUCTS SERVED IN SOUTHERN SPANISH HOSPITALS	163
PUBLICACIÓN 4	179
PUBLICATION 4: ESTUDIOS DE PROBABILIDAD Y TIEMPO DE CRECIMIENTO DE SEROTIPOS PATÓGENOS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> MEDIANTE TÉCNICAS TURBIDIMÉTRICAS.....	181
STUDYING THE GROWTH BOUNDARY AND SUBSEQUENT TIME TO GROWTH OF PATHOGENIC <i>ESCHERICHIA COLI</i> SEROTYPES BY TURBIDITY MEASUREMENTS	181
PUBLICACIÓN 5	197
PUBLICATION 5: DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA BASADA EN EL RIESGO PARA LA ESTIMACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA Y CRECIMIENTO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> EN LECHUGA ICEBERG SERVIDA EN ESTABLECIMIENTOS DE RESTAURACIÓN COLECTIVA BAJO UN LIMITADO ALMACENAMIENTO.....	199
DEVELOPMENT OF A RISK-BASED METHODOLOGY FOR ESTIMATING SURVIVAL AND GROWTH OF ENTEROPATHOGENIC <i>ESCHERICHIA COLI</i> ON ICEBERG-LETTUCE EXPOSED AT SHORT-TERM STORAGE IN FOODSERVICE CENTERS.....	199
PUBLICACIÓN 6	213
PUBLICATION 6: EFECTO DE LAS CONDICIONES DE PRE-INCUBACIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> EN FIAMBRE DE PECHUGA DE POLLO CORTADO EN LONCHAS.....	215
EFFECT OF PRE-INCUBATION CONDITIONS ON GROWTH AND SURVIVAL OF <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> IN SLICED COOKED CHICKEN BREAST	215
5. CONCLUSIONES	231
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	237

RESUMEN

RESUMEN

Los vegetales de IV Gama y productos cárnicos cocidos listos para el consumo son alimentos básicos en los hogares y en los establecimientos de restauración colectiva; y a menudo se incluyen en la dieta destinada a niños, ancianos, enfermos, etc., por su facilidad de preparación y valor nutricional. Sin embargo, son alimentos que no requieren de tratamiento térmico para su consumo, por lo que son muy vulnerables a las contaminaciones microbianas originadas fundamentalmente por prácticas inadecuadas de higiene y de manipulación tras el procesado. La contaminación microbiana producida por *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* con frecuencia se originan en ambientes de restauración colectiva. Por ello, resulta conveniente el fortalecimiento de las medidas de prevención y los sistemas de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico en estos centros, con la finalidad de garantizar la inocuidad de los alimentos y preservar la salud humana. Así, en un marco de Evaluación del Riesgo, la Microbiología Predictiva puede constituir una herramienta muy valiosa para una mejor gestión de las medidas de seguridad alimentaria.

La presente Tesis Doctoral tiene como Objetivo General evaluar las condiciones higiénico-sanitarias y la seguridad microbiológica, de los establecimientos de restauración colectiva de comedores escolares, centros geriátricos y hospitales, así como de platos mínimamente procesados y listos para el consumo (ensaladas vegetales y productos cárnicos cocidos) que son servidos en dichos establecimientos, y van dirigidos a una población consumidora más susceptible a los peligros microbiológicos y de enfermar por razones de edad y estado fisiológico. Además, pretende cuantificar el comportamiento de los microorganismos patógenos más representativos en estos alimentos, mediante el uso de herramientas de Microbiología Predictiva y Evaluación del Riesgo Microbiológico.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral han demostrado que los servicios de restauración de los comedores escolares, centros geriátricos y hospitales estudiados, presentan ciertas deficiencias comúnmente relacionadas con los hábitos

de higiene durante la manipulación de los alimentos, y la limpieza y desinfección de equipos y superficies de trabajo.

Por otra parte, se confirma la importancia de los modelos predictivos en la cuantificación del comportamiento microbiano bajo determinadas condiciones ambientales; donde la Temperatura fue el factor determinante en el desarrollo de los microorganismos estudiados. Los modelos predictivos de Probabilidad de crecimiento permitieron determinar que *E. coli* puede ser inhibido a 8°C a niveles bajos de pH (<5,5) y a_w (<0,990). Así, las Temperaturas de almacenamiento de 12 o 16°C pueden causar su crecimiento a condiciones de pH más limitantes (5,0) y a_w superiores a 0,970.

Los estudios de inoculación en alimentos demostraron que bajo las condiciones habituales de almacenamiento de alimentos en los establecimientos de restauración colectiva, *E. coli* presentó un riesgo bajo de producir toxiinfección alimentaria, ya que el incremento estimado fue inferior a 1 log ufc/g. Este hecho se confirmó mediante los resultados obtenidos acerca de la cuantificación de la variabilidad del incremento de *E. coli* en lechuga iceberg, que indicaron que en el 92% de los casos no existió crecimiento.

Para el caso *S. aureus* enterotoxigénico, los resultados mostraron que la pre-incubación de la cepa en caldo, bajo diferentes condiciones ambientales de Temperatura/pH/ a_w , influyó en el comportamiento posterior en fiambre de pechuga de pollo cortado en lonchas, almacenadas a 10 y 20°C. La pre-incubación de la cepa en caldo a niveles bajos de a_w (15°C/pH 6,5/ a_w 0,960 y 37°C/pH 5,5/ a_w 0,960) incrementó su capacidad de supervivencia en el cárnico almacenado a 10°C. Por otro lado, el almacenamiento del cárnico a 20°C propició el crecimiento de la cepa *S. aureus* estresada y la producción de enterotoxina estafilocócica A (SEA). La pre-incubación de la cepa bajo condiciones limitantes para el crecimiento (pH 5,5 y a_w 0,960) produjo una fase de adaptación más larga y un crecimiento más lento. Por el contrario, la pre-incubación en condiciones óptimas (37°C/pH 6,5/ a_w 0,997) produjo

una mejor adaptación y un crecimiento más rápido y pudo dar lugar a una mayor producción de SEA.

La presente Tesis Doctoral sirve de apoyo a las autoridades sanitarias y a las empresas alimentarias en la toma de decisiones enfocadas al mantenimiento de la seguridad alimentaria.

ABSTRACT

Fresh cut vegetables and cooked meat products are basic foods in households and foodservice establishments and often they are included in the diet aimed to very young, elderly and immunocompromised people by their ease of preparation and high nutritional value. However, these foods do not require heat treatments for consumption after processing, which make them more vulnerable to microbial contamination mainly caused by poor hygiene and handling practices. Frequently, the microbial food contamination produced by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* arise in foodservices environments. Therefore, is convenient to strengthen preventive measures and HACCP systems in these centres in order to ensure the food safety and to preserve the human health. Thus, the predictive microbiology could be a valuable tool for better management of food safety measures within a framework of risk assessment.

The major objectives of this dissertation were to evaluate the hygienic and sanitary conditions and microbiological safety of foodservices of school canteens, long-term care facilities and hospitals, and minimally processed and ready-to-eat foods (vegetables salads and cooked meat products) that served in these collective canteens aimed for more susceptible population groups to microbiological hazards and foodborne illness due to age and physiological status. Furthermore, the Thesis aims to quantify the behaviour of representative pathogens in these foods, using the Predictive Microbiology tools and Risk Assessment.

The results obtained in this Thesis demonstrate that foodservices of school canteens, long-term care facilities and hospitals have certain deficiencies commonly related to hygiene habits during food handling and cleaning and disinfection of equipments and work surfaces.

Moreover, the importance of predictive models to quantify the microbial behavior under certain environment conditions is confirmed; where the temperature was the

determining factor in the development of the microorganisms studied. Boundary models allowed to determine that *E. coli* can be inhibited at 8°C at low pH levels (<5,5) and a_w (<0,960). Thus, the storage temperatures of 12°C or 16°C can lead to growth at more limiting conditions of pH (5,0) and a_w values exceeding 0,970.

The food challenge studies, demonstrated that under usual conditions of food storage in catering establishments, *E. coli* presented a low risk to produce food poisoning because the estimated increase was less than 1 log cfu/g. This fact was confirmed by means of the results obtained about the quantifying of increase variability of *E. coli* in iceberg lettuce, which indicated there was no growth in 92% of cases.

On the other hand, the results showed that pre-incubation of enterotoxigenic *S. aureus* strain in broth, under different environment conditions of Temperatures/pH/ a_w , affects the subsequent behavior in sliced cooked chicken breast stored at 10 and 20°C. Pre-incubation of strain in broth at low levels of a_w (15°C/pH 6,5/ a_w 0,960 y 37°C/pH 5,5/ a_w 0,960) increased its capacity to survive in meat stored at 10°C. While, that storage of meat at 20°C led to growth of stressed *S. aureus* strain and the enterotoxin A production (SEA). The pre-incubation under limiting conditions for growth (pH 5,5 and a_w 0,960) caused a longer adaptation phase and slower growth of the strain. On the contrary, the pre-incubation at optimal conditions (37°C/pH 6,5/ a_w 0,997) produced a better adaptation and a faster growth in meat and would lead to a higher SEA production.

This PhD Thesis serves as support to health authorities and food industries in the development of decision-making processes aimed at the maintenance of food safety.

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>ABS</i>	Absorbancia
<i>AEM</i>	Microorganismos Aerobios Mesófilos
<i>AESAN</i>	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
<i>AFHORLA</i>	Asociación Española de Frutas y Hortalizas Lavadas, Listas para el consumo
<i>ANICE</i>	Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España
<i>APCC</i>	Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos
<i>ARM</i>	Análisis del Riesgo Microbiológico
<i>ATCC</i>	American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo)
<i>BAL</i>	Bacterias Ácido Lácticas
<i>BHI</i>	Brain Heart Infusion (Caldo Infusión Cerebro Corazón)
<i>c</i>	Casos correctamente clasificados (%) (Dato estadístico de bondad de ajuste de modelo de Probabilidad de crecimiento)
<i>C/NC</i>	Probabilidad de Crecimiento/No Crecimiento
<i>CDC</i>	Centers for Disease Control and Prevention (Centros para el control y la Prevención de Enfermedades, Estados Unidos)
<i>CECT</i>	Colección Española de Cultivos Tipo
<i>CF</i>	Coliformes fecales
<i>CFSAN</i>	Center for Food Safety and Applied Nutrition (Centro de Seguridad Alimentaria y Nutrición Aplicada; Estados Unidos)
<i>CONFECARNE</i>	Confederación de Organizaciones Empresariales del Sector Cárnico de España
<i>CT</i>	Coliformes totales
<i>DIRCE</i>	Directorio Central de Empresas
<i>OD</i>	Optical Density (Densidad Óptica)
<i>ECDC</i>	European Centre for Disease Prevention and Control (Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades)
<i>EGRM</i>	Evaluación Cuantitativa de Riesgo Microbiológico
<i>EFFAT</i>	European Federation of trade unions in the Food, Agriculture and Tourism (Federación Europea de Sindicatos de Alimentos, Agricultura y Turismo)
<i>EFSA</i>	European Food Safety Authority (Agencia Europea de Seguridad Alimentaria)

FAO	Food and Agriculture Organisation of the United Nations (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)
FDA	Food and Drug Administration (Agencia de Alimentos y Medicamentos; Estados Unidos)
FEARDS	Federación Española de Asociaciones Dedicadas a las Restauración Social
FECAO	Federación Empresarial Canaria de Ocio y Restaurantes
FEHR	Federación Española de Hostelería
FEPEX	Federación Española de Asociaciones de Productores y Exportadores de Frutas, Hortalizas, Flores y Plantas
FERCO	European Federation of Contract Catering Organisations (Federación Europea de Restauración Colectiva)
<i>FN</i>	Falsos negativos (%) (Índice de bondad de ajuste de modelo de Probabilidad de crecimiento)
<i>FP</i>	Falsos positivos (%) (Índice de bondad de ajuste de modelo de Probabilidad de crecimiento)
FSA	Food Standart Agency (Agencia de Estándares de Alimentos; Reino Unido)
FSANZ	Food Standart Agency New Zealand (Agencia de Estándares de Alimentos, Nueva Zelanda)
HPA	Health Protection Agency (Agencia de Protección para la Salud)
ICMSF	International Comission on Microbiological Specification in Foods (Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas en Alimentos)
IFR	Institute of Food Research, UK (Instituto de Investigación de Alimentos, Reino Unido)
IL	Inoculum level (nivel de inóculo, log ufc/ml)
INE	Instituto Nacional de Estadística
ISO	International Organisation for Standardization (Organización Internacional para la Estandarización)
MAGRAMA	Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
MP	Microbiología Predictiva
<i>MSE</i>	Mean Square Error (Error Cuadrático Medio)
NAOS	Estrategia para la Nutrición, Actividad Física y Prevención de la Obesidad
ng	nanogramo

NCTC	National Collection of Types Cultures (Colección Nacional de Cultivos Tipo; Reino Unido)
N_{init}	Concentración de inóculo inicial
OCM	Organización Común de Mercados Agrícolas
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
P	Probabilidad de crecimiento
p	Probabilidad de significación estadística
PCA	Plate Count Agar (Agar de recuento en placa)
PCC	Punto Crítico de Control
PERSEO	Programa piloto Escolar de Referencia para la Salud y el Ejercicio, contra la Obesidad
r	Coefficiente de correlación de Pearson
RTE	Listo para el consumo
SEA	Staphylococcal enterotoxin A (enterotoxina staphylococica)
T	Temperatura (°C)
t	tiempo (h)
TBX	Tryptone Bile-X Glucoronide (Agar Bilis Triptona)
TSB	Tryptone Soja Broth (Caldo de Triptona Soya)
ufc/g ó ml	Unidades formadoras de colonias/gramo ó mililitro
USDA	United States Department of Agriculture (Departamento de Agricultura de Estados Unidos)
USDA-ARS	United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service Departamento de Agricultura de Estados Unidos-Servicio de Investigación Agrícola
VTEC	Verotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> verocitoxigénico)
a_w	Activity water (Actividad de agua)
μ_{abs}	Tasa de absorbancia, h^{-1} (Parámetro de crecimiento de Absorbancia)
λ_{abs}	Tiempo de latencia, h (Parámetro de crecimiento de Absorbancia)
μl	microlitro
μm	micrometro
μ_{max}	Tasa máxima de crecimiento, h^{-1}

lag o λ	Tiempo de adaptación microbiana o de latencia (h)
log_{diff}	Diferencia logarítmica
R^2	Coefficiente de determinación
t_d	Tiempo de detección (h)
T_{eff}	Temperatura Estática Efectiva (°C)
t_{inc}	Tiempo de incremento (h)

1. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La presente Tesis se enmarca dentro del proyecto de excelencia AGR-01879, titulado “*Análisis de Riesgo Microbiológico de alimentos listos para el consumo en poblaciones de alto riesgo en Andalucía*”, desarrollado por el grupo de investigación AGR-170 Higiene Bromatológica (HIBRO) del Plan Andaluz de Investigación, adscrito a la Universidad de Córdoba. La temática de la Tesis que se presenta y en general la del proyecto mencionado, se han concebido y desarrollado como continuidad de la larga trayectoria investigadora que posee dicho grupo en el ámbito de la microbiología predictiva y la Evaluación del Riesgo Microbiológico desde hace más de dos décadas.

La realización del presente trabajo de Tesis parte sobre la base del surgimiento de nuevas tendencias en materia de higiene de los alimentos que proponen un esquema de Análisis del Riesgo Microbiológico desde la producción primaria hasta la entrega al consumidor cuyo objeto es el de mejorar la seguridad alimentaria, de acuerdo con los Reglamentos (CE) 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 28 de Enero de 2002 *por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria* y 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 *relativo a la higiene de los productos alimenticios*. Los resultados expuestos en esta Tesis son fruto de la realización de una serie de trabajos científicos que se presentan como compendio de Publicaciones; y las conclusiones derivadas son de gran utilidad para la aplicación de metodologías más efectivas de Evaluación del Riesgo Microbiológico, acordes con las actuales normativas europeas e internacionales.

Como bien se conoce, las toxiinfecciones alimentarias representan un grave problema para la salud pública a nivel mundial; y en este sentido la restauración colectiva y sobre todo la institucional, juegan un papel decisivo en la preservación de la inocuidad de los alimentos. Respecto a esto, la presente Tesis Doctoral desarrolla

varias temáticas correlacionadas entre sí, enfocadas al aseguramiento de unas adecuadas condiciones higiénico-sanitarias y la seguridad microbiológica de los platos preparados listos para el consumo, destinados principalmente a las colectividades más vulnerables a estas enfermedades (como los niños, ancianos, enfermos, etc), servidos en los establecimientos de restauración de comedores escolares, centros geriátricos y hospitales. Los platos preparados objetos de estudio fueron las ensaladas vegetales y productos cárnicos cocidos por ser alimentos muy propensos a las contaminaciones microbianas asociadas a la manipulación. Asimismo, se consideraron a dos de los microorganismos indicadores de higiene mayormente involucrados en la contaminación de estos alimentos como son *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

En los últimos años, los serotipos patogénicos de *E. coli* se han caracterizado por su gran repercusión sobre la salud humana y afectar considerablemente al sector poblacional más susceptible. Bajo estas premisas, se decidió estudiar la capacidad de crecimiento y supervivencia de cuatro serotipos patogénicos de *E. coli* bajo diferentes condiciones medioambientales de pH, a_w , Temperatura y niveles de contaminación. Posteriormente, se desarrollaron una serie de modelos predictivos de Probabilidad y crecimiento sobre la cepa más resistente a través de la utilización de técnicas turbidimétricas.

A menudo, las toxiinfecciones alimentarias producidas por *E. coli* se relacionan por el consumo de vegetales contaminados. Particularmente, la lechuga constituye uno de los principales vehículos de propagación del microorganismo y ello justifica que haya sido uno de los alimentos elegidos en la presente Tesis. Así pues, se estudió el crecimiento de una cepa Enteropatógena de *E. coli* en lechuga iceberg de IV Gama, bajo una serie de condiciones representativas de almacenamiento, elaboración y distribución, obtenidas en los distintos establecimientos de restauración estudiados. A través del desarrollo y la aplicación de modelos predictivos y de metodologías alternativas y novedosas de Evaluación del Riesgo, se cuantificó el incremento potencial de la cepa en el alimento antes de su consumo. Al utilizar una cepa de *E.*

coli no_O157, este trabajo también posee un valor añadido ya que en la actualidad no existen muchos estudios que aporten información detallada sobre el crecimiento de cepas Enteropatógenas de *E. coli* y otras no_O157 en matrices alimentarias.

Staphylococcus aureus es otro de los microorganismos a considerar en los establecimientos de restauración colectiva, ya que las toxiinfecciones alimentarias están comúnmente asociadas a las prácticas inadecuadas de higiene durante la manipulación de los alimentos listos para el consumo. Además, se le atribuye una gran capacidad de adaptación a diferentes condiciones medioambientales, lo que explica que pueda crecer en una amplia variedad de alimentos incluidos los productos cárnicos cocidos listos para el consumo. Sin embargo, su patogenicidad se debe a la producción de enterotoxinas termoestables cuando la población alcanza un nivel considerable en el alimento, que incluso pueden persistir una vez se haya eliminado el microorganismo. En la presente Tesis Doctoral, se eligió una cepa de *S. aureus* enterotoxigénico para investigar la influencia de las condiciones de pre-incubación de la cepa en caldo, en su posterior comportamiento y producción de enterotoxinas estafilocócicas A (SEA) en fiambre de pechuga de pollo cortado en lonchas, almacenadas a 10 y 20°C. Con los datos obtenidos, se desarrollaron modelos predictivos de crecimiento y supervivencia para cuantificar esta respuesta.

La presente Tesis Doctoral se presenta como compendio de Publicaciones de acuerdo con la Normativa Reguladora de los estudios de doctorado en la Universidad de Córdoba, propuesta por la Comisión de Másteres y Doctorado de 14 de Diciembre de 2011 y aprobada por el Consejo de Gobierno de 21 de Diciembre de 2011, conforme al Artículo 24 del Capítulo II sobre La Tesis Doctoral, del Título II Desarrollo de los estudios de doctorado bajo el marco legal del Real Decreto 1393/2007, de 29 de octubre.

De esta forma, se compone de un RESUMEN en castellano e inglés, una LISTA DE ABREVIATURAS que incluye las utilizadas en las Publicaciones y seis secciones: (1) INTRODUCCIÓN, (2) REVISIÓN Y ANTECEDENTES, (3) HIPÓTESIS Y

OBJETIVOS, (4) RESULTADOS, (5) CONCLUSIONES y (6) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Sección 1: INTRODUCCIÓN, justifica la unidad temática de la presente Tesis y detalla el orden esquemático de la misma.

Sección 2. REVISIÓN Y ANTECEDENTES, consta de una revisión extensa dividida en siete subsecciones correlativas:

La subsección 2.1: Se refiere a la Restauración colectiva, y aborda sobre el desarrollo del sector en España, el consumo de alimentos fuera del hogar y sobre la restauración colectiva institucional y su papel social y económico.

La subsección 2.2: Agrupa y describe los principales Factores de riesgo asociados a la contaminación microbiana de platos preparados en establecimientos de restauración colectiva, y puntualiza sobre el marco legal vigente.

Las subsecciones 2.3 y 2.4: Referentes a los Productos hortofrutícolas y vegetales de IV gama y Carnes y productos cárnicos listos para el consumo (RTE), respectivamente. Hacen referencia a los beneficios de estos alimentos para la salud humana; el auge y la importancia del sector en España; describen y ejemplifican la tecnología de fabricación de ambos productos; y finalmente describen el acondicionamiento de los platos de ensaladas vegetales y productos cárnicos cocidos en los establecimientos de restauración colectiva, enfatizando en los factores de riesgo más comunes durante estas etapas.

La subsección 2.5: Referente a la Clasificación legislativa y criterios microbiológicos. Agrupa las legislaciones vigentes relativas a la restauración colectiva y a los criterios microbiológicos afines a los alimentos listos para el consumo. Asimismo, se citan algunas Guías orientativas elaboradas por organismos oficiales internacionales y se explica una de las más reconocidas. Esta subsección no incluye los apartados legislativos ya expuestos en otras subsecciones.

La subsección 2.6: Concerniente a la Calidad higiénico-sanitaria y seguridad microbiológica de los platos preparados listos para el consumo. Se describen los principales grupos microbianos (indicadores y patógenos) que influyen en la calidad y seguridad de los alimentos RTE y se aporta una revisión más detallada acerca de los microorganismos objeto de estudio de esta Tesis. Además, se citan varios estudios científicos relativos a la calidad de los platos preparados en establecimientos de restauración colectiva, puntualizando en aquellos elaborados a base de vegetales y productos cárnicos cocidos. Posteriormente, se exponen algunos brotes de toxiinfecciones alimentarias relacionados con el consumo de estos alimentos.

La subsección 2.7: Relativa a la Microbiología Predictiva (MP). Comprende las aplicaciones prácticas de la MP, los tipos de diseños experimentales, los distintos métodos de generación de datos, la clasificación y tipos de modelos predictivos, enfatizando en los modelos utilizados en esta Tesis. Finalmente, incorpora una exposición de los modelos Terciarios más utilizados en la actualidad, incluyendo la herramienta informática MicroHibro creada recientemente por nuestro Grupo de investigación.

Sección 3: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS, como su nombre lo indica, esta sección expone la Hipótesis de partida de la presente Tesis, así como los Objetivos generales y específicos propuestos para cada publicación.

Sección 4: RESULTADOS, se subdivide en Publicaciones desde la 1 hasta la 6, en correspondencia con el número de Publicaciones científicas generadas. Al comienzo de cada una de las Publicaciones se presenta un extenso resumen en castellano en el que se detallan los Objetivos, Material y métodos y los Resultados, del estudio. Las tablas y/o figuras citadas en los resúmenes se refieren a las incluidas en las publicaciones correspondientes. La sección se subdivide de la siguiente forma:

Las Publicaciones 1, 2, y 3: Se corresponden con los estudios realizados en los establecimientos de restauración colectiva de comedores escolares, centros geriátricos y hospitales. En ellos se evalúan las condiciones de higiene y seguridad

microbiológica de los platos preparados RTE (ensaladas vegetales y cárnicos cocidos). En estos trabajos, la metodología de estudio empleada fue muy similar (relativa al uso de los cuestionarios, al análisis microbiológico de los platos preparados, de las superficies de trabajo y del aire, y al análisis estadístico), es por ello que para evitar reiteraciones, en el resumen de la Publicación 1 se exponen íntegramente el Material y métodos empleados y en el resto de Publicaciones (2 y 3) solamente se detallan los aspectos específicos para cada caso. Los estudios realizados en estos establecimientos se complementaron con el registro de los datos de tiempo/Temperatura (t/T) de refrigeración de los alimentos, desde la recepción hasta el servicio al consumidor. Los resultados evidenciaron que los microorganismos más representativos en los platos de ensaladas vegetales y cárnicos cocidos fueron *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente; por ello en las Publicaciones 4–6 se continúa con el estudio del comportamiento de ambos microorganismos bajo las condiciones representativas obtenidas en los establecimientos de restauración colectiva; y en los que se aplicaron herramientas de Microbiología Predictiva y Evaluación del Riesgo.

La Publicación 4: Describe el estudio del comportamiento de cuatro cepas patógenas de *E. coli* (O55:H6, O59:H21, O158:H23 y O157:H7) en función de determinados factores medioambientales a través de mediciones turbidimétricas. Para ello se diseñaron varias condiciones en medio de cultivo en función del pH (7,0 y 5,0) y a_w (0,995), bajo una Temperatura de incubación de 8, 12 y 16°C y un nivel de contaminación inicial de 4 y 2 log ufc/ml. Se desarrollaron modelos predictivos de crecimiento para estimar los principales parámetros cinéticos como fase de latencia (λ_{abs}) y tasa de absorbancia (μ_{abs}); y se seleccionó la cepa más resistente para desarrollar una serie de modelos predictivos de Probabilidad de crecimiento. Los modelos de Probabilidad de crecimiento definieron la interfaz de crecimiento/no crecimiento de *E. coli* O158:H23 (cepa seleccionada) en función del pH (desde 7,0–5,0) y a_w (desde 0,995–0,950), a diferentes Temperaturas (8, 12 y 16°C) y niveles de contaminación inicial (4; 3 y 2 log ufc/ml). Finalmente, se describió el comportamiento cinético de la cepa mediante la cuantificación de los tiempos de

detección. La información obtenida resulta de gran interés para las industrias alimentarias y los gestores de seguridad alimentaria ya que la estimación del riesgo *E. coli* en productos mínimamente procesados y la combinación adecuada de los factores ambientales pueden garantizar la completa inhibición del crecimiento del microorganismo. Cabe destacar que el citado estudio ha servido para completar el Trabajo Fin de Máster.

La Publicación 5: Integra la información generada en la Publicación anterior para su aplicación en un ámbito de Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiológico de *E. coli* en el alimento. En este Capítulo, se aplicó una metodología alternativa para estimar el incremento logarítmico (\log_{diff}) de *E. coli* en el alimento sin hacer uso de los métodos convencionales utilizados para la cuantificación del crecimiento microbiano (lag y μ_{max}). Para ello se estudió \log_{diff} de la cepa de *E. coli* seleccionada en el estudio anterior (O158:H23) simulando diferentes niveles de contaminación (4,5; 3,5 y 2,5 log ufc/g) en lechuga iceberg mínimamente procesada, bajo diferentes condiciones de almacenamiento. Se desarrollaron y aplicaron modelos predictivos de Regresión Lineal para estimar \log_{diff} bajo determinados valores de Temperatura (8, 12, 16, 20 y 24°C). Posteriormente, se emplearon los métodos de simulación MonteCarlo para estimar la variabilidad del crecimiento potencial, de la cepa bajo cinco perfiles dinámicos de t/T relativos a las etapas de almacenamiento, procesado y distribución, obtenidos de los establecimientos de restauración colectiva estudiados en las Publicaciones 1–3

La Publicación 6: Expone la influencia de determinadas condiciones de pre-incubación en caldo de una cepa de *S. aureus* enterotoxigénica, sobre su respuesta de crecimiento posterior en fiambre de pechuga de pollo cortado en lonchas, almacenadas a 10 y 20°C. En el estudio se diseñaron distintas condiciones de pre-incubación (Temperatura/pH/ a_w) y se desarrollaron modelos predictivos para estimar los principales parámetros cinéticos de crecimiento y supervivencia. Inicialmente se evaluó el crecimiento de la cepa de *S. aureus* bajo diferentes condiciones de pre-incubación en caldo de cultivo (10°C/pH 6,5/ a_w 0,997; 15°C/pH 6,5/ a_w 0,997;

15°C/pH 5,5/ a_w 0,997; 15°C/pH 6,5/ a_w 0,960; 37°C/pH 6,5/ a_w 0,997 y 37°C/pH 5,5/ a_w 0,960); y posteriormente, el cultivo se inoculó en el cárnico para evaluar su comportamiento y producci3n de SEA. Los resultados de este estudio pueden resultar un apoyo científico a las industrias alimentarias para la adopci3n de nuevas estrategias de gesti3n y de medidas preventivas que permitan mitigar el crecimiento y producci3n de SEA en productos cárnicos cocidos.

Secci3n 5: CONCLUSIONES, se exponen las conclusiones derivadas de los estudios realizados a lo largo de la Tesis, desde una perspectiva de seguridad alimentaria y de salud pública.

Secci3n 6: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS, reúne todas las referencias citadas en la Secci3n 2.

La presente Tesis Doctoral constituye una fuente de informaci3n relevante para las autoridades sanitarias, gestores de la seguridad alimentaria y las empresas alimentarias; a la vez que sirve de apoyo científico para la toma de decisiones en un ambiente de restauraci3n destinada a colectivos de mayor susceptibilidad a las deficiencias en materia de seguridad alimentaria. Además, la metodología empleada puede significar una base para el desarrollo de otros estudios científicos.

2. REVISIÓN Y ANTECEDENTES

2.1. SECTOR DE LA RESTAURACIÓN COLECTIVA EN ESPAÑA

2.1.1. CARACTERIZACIÓN DEL SECTOR DE LA RESTAURACIÓN COLECTIVA

2.1.1.1. DEFINICIÓN Y TIPOS DE RESTAURACIÓN COLECTIVA

La restauración colectiva, se define como «*aquella que se elabora para un número determinado de comensales superior a los que comprende un grupo familiar*» (Restauración en servicios hospitalarios, 2008) y es muy conocida en el ámbito de la restauración como “alimentación colectiva” o *foodservices* (denominación internacional). Este sector tiene un gran peso social y económico como parte de la gran industria de la Hostelería y el Turismo española (Romero, 2008); y cuenta en su conjunto con un amplio grupo de empresas destinadas a la elaboración, venta, distribución y servicio de comidas y bebidas (restaurantes, cafeterías, bares, catering, etc.); a la vez que provee de empleo a casi un millón de personas.

El sector de la restauración colectiva se divide en dos grandes grupos: el sector de Restauración Comercial (1) y el sector de la Restauración Social o Institucional (2) y actualmente incorpora nuevos conceptos de restauración, atendiendo a la población a la que sirven, la forma de trabajo, la tecnología que emplean o los tipos de productos que utilizan, etc (Tabla 1):

TABLA 1. Tipos de restauración colectiva.

	Restauración Convencional	Restaurantes, Mesones, Cafeterías, Tascas, Cantinas, Bares, Casas de comida, Tabernas, Chiringuitos.
1	Restauración Complementaria	Comedores de hoteles, banquetes, discotecas, servicio aéreo, ferroviario y marítimo, restaurantes de carretera, de centros comerciales, de ocio, ferias, de aeropuertos y estaciones de autobuses.
	Neorestauración	Restaurantes temáticos, Autoservicios, Buffets, hamburgueserías, pizzerías, Croissanterías, Bocadillerías, Drug-stores, Cervecerías, Automáticas (Vending).
2	Comedores de Empresas, Ejército, Hospitales, Prisiones, Comedores, Comunidades religiosas, Palacios de Congresos, Acontecimientos deportivos.	

Fuente: Martín Cedeño y Angel Caracuel García (Tomado de Restauración en servicios hospitalarios, 2008)

Condiciones higiénico-sanitarias de establecimientos de restauración colectiva y seguridad microbiológica de platos de ensalada y cárnicos cocidos dirigidos a poblaciones de riesgo

2.1.1.2. SITUACIÓN ACTUAL DEL SECTOR DE LA RESTAURACIÓN COLECTIVA EN ESPAÑA

Desde hace algunos años, el sector de la restauración colectiva ha venido experimentando un auge tecnológico en correspondencia con los cambios en los hábitos de consumo de la población, devenidos por numerosos factores como los nuevos estilos de vida, la evolución demográfica, el nivel económico-social, etc., que han aumentado las preferencias de los consumidores por alimentos sanos, seguros y de fácil y rápida preparación. Además, ha significado un pilar muy sólido para la economía española; según los datos aportados por la Federación Española de Hostelería (FEHR) correspondientes al año 2010, el sector contribuyó en un 7% al Producto Interno Bruto (PIB) del país.

Respecto al número de establecimientos dedicados a la restauración también se observó un incremento notable. El Instituto Nacional de Estadística (INE) y el Directorio Nacional de Empresas (DIRCE) refieren una importante evolución del sector en el cuatrienio 2006-2009 en el que contabilizaron, un total de 267.462 empresas de restauración y 287.545 locales (entre restaurantes, establecimientos de bebidas y comedores colectivos/locales de comidas preparadas), en el último año. De las comunidades autónomas, Andalucía se destaca como una de las comunidades autónomas más consolidadas en cuanto al desarrollo de la restauración colectiva, junto a otras tres comunidades (Cataluña, Valencia y Madrid) y cuenta actualmente con 8,274 restaurantes, 1,545 cafeterías, 34,459 bares, 2,500 comedores colectivos y 243.178 plazas de hoteles (MERCASA, 2011).

La producción nacional concebida por el sector, se cifró en 24,7 millones de euros para el colectivo de restaurantes y puestos de comida rápida, representando el 1,9% de la producción total española, las colectividades se destacaron con un incremento de un 9% con 10 millones de euros y el colectivo de establecimientos de bebidas (como: bares, cafés, cafeterías, etc.) aportó cerca de 56,4 millones de euros, alcanzando en torno al 3,5% de la producción (MERCASA, 2011).

2.1.1.3. CONSUMO FUERA DEL HOGAR

Consecuentemente al auge evidenciado por el sector de la restauración colectiva, el consumo fuera del hogar (o consumo extradoméstico) se ha convertido en una costumbre muy arraigada por la población española, ya sea por necesidad o por ocio. Los establecimientos de comida rápida se destacan como los de mayor preferencia para los consumidores. Los datos aportados por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA, 2011), señalan que los españoles realizan aproximadamente 6,6 millones de visitas a los centros de restauración, cada año. De hecho, España se destaca como uno de los primeros países europeos en realizar un mayor consumo de alimentos fuera del hogar, junto con Alemania, Francia, Reino Unido e Italia; y se prevé un aumento de esta práctica en los próximos años (Díaz-Bidart, 2009).

A modo de información, podemos decir que en el año 2011, los establecimientos de restauración colectiva gastaron en torno a 20,7 millones de euros atribuidos a 8,3 millones de kg de alimentos, por concepto de bebidas y comida. Asimismo, existió una mayor preferencia por productos como la cerveza, los cárnicos, los pescados y mariscos, las bebidas refrescantes, etc. (Figura 1) (MAGRAMA, 2011):

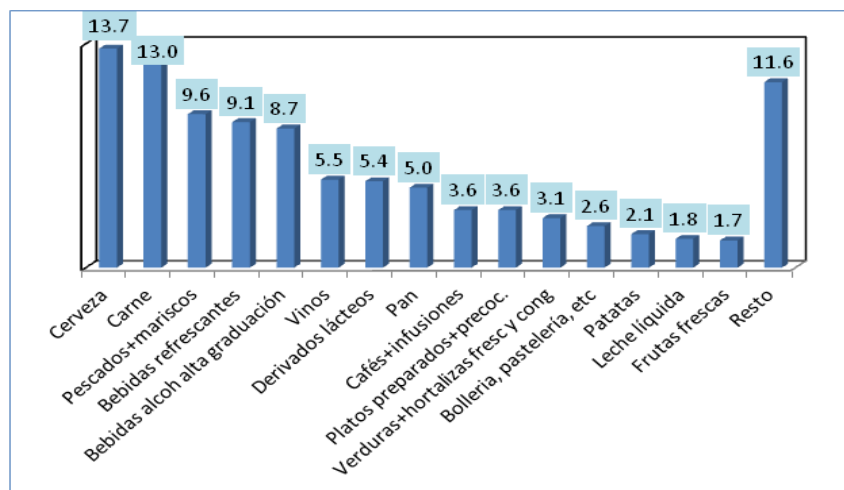


Figura 1. Consumo fuera del hogar por familias de productos (%) MAGRAMA (2011).

Indiscutiblemente, el consumo fuera del hogar es un hecho vinculado a la vida moderna que causa cierta preocupación entre los profesionales de la salud y la

alimentación, por las posibles consecuencias que puede traer consigo para la salud humana. Aspectos tan importantes como el volumen de establecimientos y la heterogeneidad de las ofertas alimenticias justifican la estricta regulación de las actividades del sector, de cara a reducir los riesgos de enfermedades de origen alimentario. El marco legal del sector de la restauración colectiva está determinado por el Real Decreto 3484/2000, de 29 de diciembre, *por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas*.

El objetivo del presente Real Decreto es definir y establecer normas relativas a la higiene durante la elaboración, envasado, almacenamiento, transporte, distribución, manipulación, venta, suministro y servicio de comidas preparadas, en vista a minimizar los riesgos de origen alimentario que puedan estar relacionados con las prácticas incorrectas de higiene y de manipulación. Este Real Decreto es aplicable a todas las empresas de carácter público o privado, social o comercial, permanentes o temporales que lleven a cabo cualquiera de las actividades mencionadas anteriormente. El Real Decreto, del que actualmente están derogados los apartados 11 y 12 del artículo 6 y el anexo de Normas microbiológicas de comidas preparadas, establece no obstante una serie de requisitos relativos al almacenamiento, conservación, transporte y venta de comidas preparadas en los establecimientos de restauración colectiva que aún se toman como referencia por parte de muchas empresas del sector.

2.1.1.4. RESTAURACIÓN INSTITUCIONAL

La restauración institucional posee un papel fundamental para con la salud pública. Ésta se diferencia del sector de la restauración comercial en que brinda servicios a aquellos consumidores que tienen muy pocas o ninguna posibilidad de elegir otra forma de consumo, con la particularidad que generalmente estos consumidores son más propensos de padecer enfermedades de origen alimentario como es el caso de los niños, los ancianos, los enfermos, o las personas inmunodeprimidas, que por sus

características fisiológicas requieren de una alimentación de mayor calidad. Es importante destacar que en España existen muy pocos estudios científicos que evalúen la actividad de restauración que desempeñan estos establecimientos y su repercusión en la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos. Sobre esta base, la presente Tesis desarrolló un estudio pormenorizado de las condiciones higiénico-sanitarias de los establecimientos de restauración colectiva de comedores escolares, centros geriátricos y hospitales (Publicaciones 1, 2 y 3).

Los datos actuales apuntan a un aumento creciente del consumo de alimentos en este sector, y en el año 2009 supuso un gasto total en torno a los 2,599 millones de euros. En la actualidad, el consumo de alimentos en los establecimientos institucionales alcanza un 15% comparado con el que se realiza en los restaurantes (23%) y los bares y cafeterías (37%) (MAGRAMA, 2011).

En efecto, este es un sector que representa una alternativa para cubrir las necesidades básicas de alimentación de un colectivo de individuos muy importante. En España, la Federación Española de Asociaciones Dedicadas a las Restauración Social (FEADRS) representa a las grandes y medianas empresas del sector de la restauración institucional y colectiva del territorio. Entre las empresas de restauración institucional se destacan Eurest colectividades S.A; Serunió S.A; Sodexho España S.A; Aramark servicios de catering, S.L, entre otras, que destinan sus producciones fundamentalmente a centros hospitalarios, residencias geriátricas, comedores y centros de estudios.

El hecho de preparar y servir grandes volúmenes de alimentos en un tiempo relativamente corto, implica la utilización de nuevas tecnologías de conservación y/o la optimización de las tecnologías ya existentes, de cara a garantizar la calidad higiénico-sanitaria y vida útil de los alimentos.

Los estudios referentes a los sistemas de elaboración, conservación y transporte de comidas preparadas citan a la cadena fría refrigerada, la cadena fría congelada, la cadena en caliente o la cocción al vacío (Arévalo 2009):

- ✓ La cadena fría refrigerada: Consiste en abatir los alimentos, una vez elaborados, desde los 65°C hasta los 10°C en un tiempo no superior a los 90min, para luego ser almacenados en una cámara que los mantendrá a entre 0-3°C. Antes de su consumo los alimentos se regenerarán para ponerlos a la Temperatura adecuada.
- ✓ La cadena fría congelada: Permite la elaboración de los alimentos con una mayor antelación. Éstos se introducen en un abatidor de Temperatura teniendo en cuenta los mismos procedimientos mencionados anteriormente y su posterior conservación en frío a -18°C hasta el momento de su consumo, instante en el que deben regenerarse hasta su Temperatura adecuada de consumo (65°C).
- ✓ La cadena en caliente: Consiste en la conservación de los alimentos elaborados a Temperaturas no inferiores a los 65°C, y que deben ser consumidos en un tiempo máximo de 12h.
- ✓ Cocción al vacío: Aquí, se elabora el alimento a bajas Temperaturas y durante un tiempo prolongado. El alimento se envasa posteriormente con material impermeable y que no se altere con las altas Temperaturas. Antes de cocerlo se le extrae el aire y se sella. Tras la cocción el producto se enfría de manera rápida y se refrigera, para luego ser regenerado (65°C) antes del consumo.

También se hace mención a técnicas más tradicionales para la conservación de los alimentos como la pasteurización industrial o la aplicación de sustancias químicas (salazones, ahumados, adobos, escabeche, encurtidos, etc.). Así como la aplicación de otras tecnologías de conservación con el objeto de reducir el grado de manipulación de los alimentos en las cocinas como las altas presiones hidrostáticas, los pulsos luminosos, la deshidratación, la irradiación, la conservación en atmósfera

modificada, entre otras (Leitsner y Gould, 2002; Nissen y col., 2002; Devlieghere y col., 2004; Arévalo, 2009).

2.1.1.5. PAPEL SOCIAL DE LA RESTAURACIÓN INSTITUCIONAL

La restauración institucional, en estos momentos lleva a cabo una activa participación en la Estrategia para la Nutrición, Actividad Física y Prevención de la Obesidad (NAOS) (www.naos.aesan.msssi.gob.es/) y el Proyecto PERSEO (Programa piloto escolar de referencia para la salud y el ejercicio, contra la obesidad) (www.perseo.aesan.msssi.gob.es/), establecidos a nivel estatal desde el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad a través de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN).

La Estrategia NAOS se puso en marcha en el 2005. Se creó con el objetivo de sensibilizar a la población del problema que la obesidad representa para la salud, y de impulsar todas las iniciativas que contribuyan a lograr que los ciudadanos, y especialmente los niños/as y los jóvenes, adopten hábitos de vida saludables, principalmente a través de una alimentación saludable y de la práctica regular de actividad física. A partir de esta Estrategia se ha impulsado la aprobación de la *Ley de Seguridad Alimentaria y Nutrición* y se han publicado, entre otros, documentos destinados a las escuelas. Entre ellos mencionar el *Documento de consenso sobre la alimentación en centros educativos* cuyo objetivo es avanzar en el compromiso de promover una dieta equilibrada, asegurando un entorno alimentario adecuado.

El Proyecto PERSEO se estableció en el 2006, para promover, desde el ámbito escolar, los hábitos de vida saludables desde edades muy tempranas. Éste interviene simultáneamente sobre el comedor y el entorno escolar para facilitar la elección de opciones más sanas, implicando además a las familias. La Guía de comedores escolares (www.educacion.gob.es) representa uno de los manuales editados a partir de este programa.

2.2. FACTORES DE RIESGO DE CONTAMINACIÓN MICROBIANA EN ESTABLECIMIENTOS DE RESTAURACIÓN COLECTIVA

2.2.1. PRACTICAS DE HIGIENE DE LOS MANIPULADORES DE ALIMENTOS

En las últimas décadas ha aumentado el conocimiento y por ende la preocupación acerca de la seguridad de los alimentos destinados al consumo humano. Las toxiinfecciones alimentarias representan un serio problema para la salud pública mundial y la población más vulnerable (los niños, ancianos, embarazadas y enfermos) cuenta entre la más afectada.

Los datos de la Organización Mundial de la Salud aseveran que alrededor de 2,2 millones de personas enferman diariamente en el mundo por más de 200 enfermedades alimentarias y cerca de las dos terceras partes de los brotes que se producen se originan en los propios hogares y en los establecimientos de restauración colectiva. No obstante, el riesgo de enfermar por causas alimentarias tras el consumo de comidas preparadas fuera del hogar es considerablemente superior, teniendo en cuenta que en los establecimientos de restauración se preparan mayores volúmenes de comidas y más variadas y están más expuestos a diversos factores que influyen en la calidad sanitaria de los alimentos (Hedberg y col., 2006).

En los procesos de producción, almacenamiento y distribución de comidas preparadas, el papel de los manipuladores de alimentos se antoja fundamental con el objeto de garantizar la aptitud e inocuidad de los alimentos, apoyados fundamentalmente en procedimientos adecuados de higiene y en la implementación de medidas correctas de autocontrol. El manipulador de alimentos es *«toda aquella persona que por su actividad laboral, tienen contacto directo con los alimentos durante su preparación, fabricación, transformación, elaboración, envasado, almacenamiento, transporte, distribución, venta, suministro y servicio»* (El Real

Decreto 202/2000, de 11 de febrero *por el que se establecen las normas relativas a los manipuladores de alimentos*, derogado por el actual Real Decreto 109/2010).

A continuación se citan las legislaciones vigentes aplicadas a los manipuladores de alimentos:

- ✓ El Reglamento (CE) 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, *relativo a la higiene de los productos alimenticios*.
- ✓ El Reglamento (CE) 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, *sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar animal*.

En un ambiente de restauración, los procedimientos de higiene pueden ser mejorables ya que parte de las toxiinfecciones alimentarias ocurren como consecuencia de los factores de riesgo asociados a la manipulación de los alimentos, relativos a la insuficiente higiene del personal manipulador, inapropiados procedimientos de cocción, contaminación cruzada o inadecuado almacenamiento de los alimentos (Michaels y col., 2004a).

Los manipuladores actúan en algunas ocasiones como vehículos de propagación de microorganismos indicadores o patógenos de forma directa e indirecta a través de las manos, hacia otros alimentos y superficies de contacto con los alimentos y con otros manipuladores. En los Estados Unidos, las prácticas de higiene de los manipuladores constituye uno de los cinco factores de riesgo más importantes de toxiinfecciones alimentarias y aproximadamente el 89% de los brotes se producen principalmente por la inadecuada higiene de las manos (Guzewich y Ross, 1999).

En determinadas circunstancias, las manos pueden representar el mayor vehículo de microorganismos de origen fecal y respiratorio (Burt y col., 2003; Moore y col., 2003). Se ha podido demostrar que los microorganismos como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella*, son capaces de sobrevivir en las

manos si las medidas de higiene no son lo suficientemente apropiadas (Scott y Bloomfield, 1990; Jiang y Doyle, 1999; Kusumaningrum y col., 2002). Diversos estudios describen brotes de toxiinfecciones alimentarias asociados a los establecimientos de restauración colectiva (Smith y Dahl, 1996; Lynch y col., 2003; FDA, 2004), dichos estudios indican que las medidas higiénico-sanitarias pueden ser insuficientes en ciertas ocasiones de cara al consumidor final. Al mismo tiempo enfatizan en los establecimientos de suministro de alimentos destinados a sectores de la población más susceptibles.

Ayçiçek y col. (2004), evaluaron las medidas higiénico-sanitarias mantenidas por los manipuladores en un recinto hospitalario. Tras el estudio determinaron que éstas fueron insuficientes al ser evidenciados recuentos significativos de *S. aureus* y *E. coli*, tanto en las manos con guantes como en manos desnudas, durante la manipulación de los alimentos, en las que predominó *S. aureus* en un 70% de los aislamientos. En el estudio también se aislaron otros microorganismos como *Bacillus difteroides*, *Bacillus sp* y *Staphylococcus coagulasa negativos*. Por su parte, Lues y Van Tonder (2007) intentaron relacionar la higiene de las manos con el nivel de contaminación de los delantales de los manipuladores. Para ello, inspeccionaron varios establecimientos de restauración de Sudáfrica dedicados a la venta al detalle de cárnicos listos para el consumo y analizaron 50 muestras procedentes de las manos y 35 de los delantales, respectivamente. El estudio comprobó recuentos de *Aerobios mesófilos (AEM)* (98% y 8%), *coliformes totales (CT)* (40% y 26%), *E. coli* (se halló contaminación en las manos de un manipulador), *Enterobacteriaceae* (44% y 16%) y *S. aureus* (88% y 40%). Sin embargo no encontraron una correlación significativa entre los resultados, por lo que descartaron la posible contaminación cruzada. Aunque sí consideraron que la inadecuada higiene de las manos pudo constituir un posible factor de riesgo en la contaminación microbiológica de los alimentos, ya que el 32% de las manos analizadas superaban los límites establecidos para *CT*. Los *coliformes fecales (CF)* también predominaron en más de la mitad de las muestras procedentes de las manos (55,6%) de los manipuladores de alimentos de varios

comedores escolares de Brasil (Santana y col., 2009). Las principales causas que influyeron en estos resultados fueron la falta del reconocimiento médico anual (51,9%), la falta de formación periódica de los manipuladores (74,1%) y las inadecuadas prácticas de higiene (100%) (Couto-Campos y col., 2009). Los virus causantes de gastroenteritis y hepatitis A en humanos son otros de los microorganismos capaces de sobrevivir en las manos de los manipuladores cuando éstos no practican una higiene frecuente y adecuada (Appleton, 2000; Bidawid y col., 2000; Hedberg y col., 2006). En este caso, los riesgos de contaminación se asocian a la manipulación de los alimentos por manipuladores enfermos o portadores asintomáticos (65%) y al contacto directo de las manos contaminadas con los alimentos (35%), que al mismo tiempo favorecen la contaminación cruzada de los alimentos y las superficies de trabajo (Mokhtari y Jaykus, 2009).

Si bien el lavado de las manos constituye un método rápido y sencillo, también es considerado por muchos autores como la manera más conveniente y eficaz de reducir los patógenos presentes en ellas (Todd y col., 2010), por lo que es conveniente su práctica adecuada para disminuir los riesgos de contaminación cruzada (Rippel, 2002).

Los principios del lavado de las manos son universales, sin embargo la reducción eficaz de los microorganismos depende de las siguientes consideraciones (Todd y col., 2010):

- ✓ Tipo y nivel de contaminación orgánica y microbiana.
- ✓ El uso de agua potable corriente.
- ✓ El tiempo de lavado (15-30 s).
- ✓ El tipo de jabón y cantidad usada.
- ✓ El grado de exposición al proceso de lavado de los dedos, las palmas, el dorso, las muñecas, región subungueal y uñas.
- ✓ La frecuencia y vigorosidad de frotamiento de los dedos y las palmas de las manos durante el enjuague.

En vista a la importancia que tienen los hábitos de higiene, las actitudes y comportamientos de los manipuladores en la preservación de la seguridad alimentaria, se han empleado diversas metodologías de acuerdo a las normativas legales para la orientación de los manipuladores en materia de higiene. Al respecto, mencionar algunas guías elaboradas a nivel regional como el Manual para los manipuladores de alimentos elaborado por la Conserjería de Salud de Castilla y León, el Manual de Formación Básica para manipuladores de alimentos creado por la Federación Empresarial Canaria de Ocio y Restaurantes (FECAO), el Manual para la formación de manipuladores de alimentos de la Conserjería de Sanidad del Gobierno de Cantabria, el documento Manipulación de Alimentos (Manual Común) de la Conserjería de Empleo y Desarrollo Tecnológico de la Junta de Andalucía; a nivel internacional, el Manual Cinco claves para la inocuidad de los alimentos de la OMS, el Manual de capacitación para manipulación de alimentos de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) o el Código Alimentario de la FDA (Food Code, 2009), etc.

Sin embargo, algunos estudios advierten de posibles deficiencias en la higiene de las manos por parte de los manipuladores de alimentos. Por ejemplo, Green y col. (2007) realizaron un estudio para identificar los factores relacionados con las prácticas de higiene de los manipuladores de alimentos. Para ello, se apoyaron en un estudio observacional que evaluó el lavado de las manos y el uso de guantes por parte de 321 manipuladores. Los resultados demostraron que el lavado de las manos y el uso de guantes, fue más frecuente durante las actividades de preparación de los alimentos, que durante la manipulación de los equipos sucios y el contacto directo con algunas partes del cuerpo. Además comprobaron que el uso de guantes supuso una disminución en la frecuencia de lavados de las manos. Clayton y Griffith (2004) analizaron los hábitos de 115 manipuladores de 29 establecimientos, durante la preparación de los alimentos y las medidas de higiene adoptadas. Para ello, utilizaron una técnica observacional de análisis de notación. Los resultados indicaron que solo el 9% de los manipuladores se lavaron las manos tras tocarse el cabello o la cara y el

25% lo hizo posteriormente a la manipulación de equipos contaminados. Lubrán y col. (2010) examinaron la frecuencia de contacto de las manos de los manipuladores de alimentos con los objetos y alimentos listos para el consumo antes de la venta, el lavado de las manos y cambio de guantes durante la preparación de los alimentos, así como las medidas de higiene de los equipos, utensilios y superficies de trabajo. El estudio se llevó a cabo en 9 establecimientos de venta al detalle de alimentos listos para el consumo y determinó un porcentaje elevado (60–80%) de manipuladores que no se lavaron las manos durante la manipulación de los alimentos al mismo tiempo que mantuvieron contacto con otras superficies. Por su parte, Fawzi y col. (2009) evaluaron los hábitos de higiene de las manos de los manipuladores de 15 tiendas de venta de alimentos. Del total de manipuladores (29), sólo el 48,3% usó jabón para lavarse las manos y se frotaron adecuadamente incluyendo el lavado entre los dedos, las puntas de los dedos y las muñecas. Además detectaron que la mayoría de los manipuladores que se lavaron las manos en menos de 10 s (41,4%) tuvieron niveles de contaminación ligeramente más altos de *AEM* y *S. aureus*, que los manipuladores que utilizaron más tiempo para el lavado. A este efecto, los estudios realizados por Todd y col. (2010) y Chapman y col. (2010), resaltan la importancia de la fricción, la frecuencia del lavado y el lavado correcto de las manos en la eliminación de microorganismos.

Por su parte, el secado de las manos también constituye una etapa muy importante dentro del lavado de las manos. Algunos autores consideran que es la última etapa más crítica del lavado y que necesita ser implementado correctamente para asegurar una higiene adecuada y reducir así los posibles riesgos de contaminación cruzada (Guzewich y Ross, 1999; Michaels y col., 2001). Según Michaels y col. (2000) un eficaz secado de las manos puede reducir la población microbiana hasta en un 90%. Como prácticas inadecuadas de secado se señalan, la humedad residual de las manos (Patrick y col., 1997), el secado de las manos con paños de tela o con secadores de aire poco eficientes que alargan el tiempo de secado (Todd y col., 2010; Snelling y col., 2011), el frotamiento de las manos durante el secado que favorece la

contaminación de la piel luego del lavado (Yamamoto y col., 2005). En un estudio observacional realizado por Clayton y Griffith (2004), comprobaron que la efectividad del lavado de las manos se vio afectada por un porcentaje alto de inadecuadas prácticas de secado (61%).

2.2.2. DISPONIBILIDAD DE RECURSOS SANITARIOS

Obviamente, la disponibilidad de recursos y el funcionamiento de los equipamientos sanitarios (lavamanos, agua caliente y potable, jabón, etc.) en los centros de restauración, también constituyen otra de las causas que pueden influir negativamente en las prácticas de higiene personal de los manipuladores (Clayton y col., 2002; Dippold y col., 2003; Green y Selman, 2005; Todd y col., 2010). Garayoa y col. (2011) realizaron un estudio en 20 empresas de catering de toda España, para evaluar la implementación de los sistemas de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC) y los conocimientos sobre higiene y seguridad alimentaria así como las actitudes y las prácticas de los manipuladores de alimentos. Entre las dificultades halladas destacaron el incorrecto funcionamiento de los lavamanos en el 95% de los establecimientos visitados, y de las duchas, así como la disponibilidad de agua caliente en los baños y área de cambio de ropa (50%). Por su parte, Allwood y col. (2004) evaluaron 123 establecimientos de venta de alimentos al detalle en Minnesota, con el objeto de investigar los conocimientos de los manipuladores y las prácticas de higiene de las manos, así como la disponibilidad de recursos para el lavado de las manos. Los resultados indicaron que las principales limitaciones se vincularon con la ausencia de cepillos para lavarse las uñas (38%) e insuficiencia de lavamanos (24%) y concluyeron que solo los establecimientos completamente equipados (55%) contaban con un personal supervisor debidamente capacitado.

2.2.3. USO DE GUANTES

Sin embargo, el lavado de las manos no siempre garantiza la completa eliminación de los microorganismos presentes. De este modo, que se hace necesario el uso de guantes para prevenir el contacto directo de las manos con los alimentos y con las

superficies de trabajo como una medida de seguridad alimentaria de cara a minimizar los riesgos de contaminación cruzada en la industria alimentaria. La cuestión más importante es que en ocasiones el uso de guantes puede crear un falso sentido de la higiene entre los manipuladores (Lynch y col., 2005; Green y col., 2007; Todd y col., 2010) y poner en riesgo la seguridad de los alimentos.

Cabe destacar que los problemas más comunes están vinculados al cambio irregular y uso incorrecto de los mismos (Snyder, 1999; Liu y Su, 2006). En los Estados Unidos, ésta es una de las principales causas que favorecen a la aparición de toxiinfecciones alimentarias (McCarthy y col., 2006). En un estudio realizado por Pérez-Rodríguez y col. (2006) determinaron que el uso de un mismo par de guantes para la manipulación de diferentes alimentos aumenta los riesgos de transferencia de patógenos. En este caso comprobaron un mayor riesgo de transferencia de *L. monocytogenes*, desde la carne de pollo cruda contaminada hacia las lonchas de carne cocida.; ocurriendo lo contrario tras el cambio de guantes. A ello se le suma la integridad de los guantes como otro problema a tener en cuenta para evitar posibles contaminaciones cruzadas (Albin y col., 1992). Algunos autores aseguran que el lavado de las manos antes y después del cambio de guantes es muy conveniente para reducir la contaminación microbiana presente (Paulson, 1996; Martínez-Tomé y col., 2000; Michaels y col., 2004b).

2.2.4. CONTAMINACIÓN CRUZADA

Como se ha mencionado anteriormente la contaminación cruzada constituye una de las principales causas de toxiinfecciones alimentarias en todo el mundo. Según un informe de la OMS estuvo relacionada con el 25% de los brotes acontecidos en el año 1992 (Sheen y Hwang, 2010). Los fenómenos de contaminación cruzada se originan como consecuencia de la aplicación de prácticas inadecuadas de higiene, al contacto con equipos y utensilios contaminados, por el contacto directo de las manos con los alimentos preparados, por el almacenamiento inadecuado de los alimentos, por el

mal procesado de los alimentos, por el contacto directo de los alimentos con el aire o ambientes contaminados, etc. (Todd y col., 2009).

Particularmente los alimentos listos para el consumo son muy propensos a las contaminación cruzada durante su manipulación (Vorst, y col., 2006a y b; Aarnisalo, 2007; Pérez-Rodríguez y col., 2007, 2010; Sheen y Hwang, 2010). Algunos estudios se refieren al contacto directo de los cárnicos listos para el consumo con las superficies de trabajo (Naidoo y Lindsay, 2010) y con los utensilios de corte contaminados (Pérez-Rodríguez y col., 2007; Fernane y col., 2010) y enfatizan en su importancia como fuentes de transmisión de patógenos entéricos, *L. monocytogenes*, o *S. aureus*, entre otros (Keskinen y col., 2008; Malheiros y col., 2010). Por su parte, Abdul-Raouf y col. (1993) hacen referencia a la contaminación cruzada de los vegetales mínimamente procesados con otros ingredientes durante la etapa de preparación de las ensaladas; y puntualizan en la mezcla de vegetales con productos cárnicos como posible causa de contaminación por *E. coli* O157:H7.

2.2.5. TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO

La Temperatura es el factor más importante que condiciona el crecimiento microbiano en alimentos. La mayoría de los microorganismos se desarrollan a Temperaturas entre 5–60°C (llamada zona de peligro), siendo la Temperatura óptima de crecimiento a 37°C. Con lo cual, el mantenimiento de la cadena de frío y el correcto tratamiento térmico y conservación en caliente de los alimentos constituyen las medidas esenciales para el mantenimiento de la seguridad alimentaria, donde los manipuladores desempeñan un papel fundamental durante toda la cadena de producción (Bharathi y col., 2001; Beuchat, 2002; Membre y col., 2005; Carrasco y col., 2008).

La Tabla 2 expone las Temperaturas recomendables de almacenamiento/transporte y congelación de las materias primas y productos elaborados, propuestas por el Gobierno de Aragón, en la guía de Orientaciones para la aplicación del autocontrol en los establecimientos de comidas preparadas:

TABLA 2. Temperaturas de conservación de productos alimenticios

Producto alimenticio	Temperaturas	
	Almacenamiento/Transporte	Congelación
Carne	≤ 7°C	≤ -18°C
Despojo	≤ 3°C	≤ -18°C
Carne de ave	≤ 4°C	≤ -18°C
Carnes picadas y separadas mecánicamente	≤ 2°C	≤ -18°C
Preparados de carne	≤ 4°C	≤ -18°C
Jamón, paleta, cocidos, fiambres	0°C a 5°C	≤ -18°C
Comidas preparadas con período de duración inferior a 24°C	≤ 8°C	
Comidas preparadas con período de duración superior a 24°C	≤ 4°C	
Comidas preparadas congeladas	Mantenimiento a ≤ - 18°C	
Comidas calientes	Mantenimiento a ≥ 65°C	
Frutas y hortalizas congeladas	Mantenimiento ≤ - 18°C	

Fuente: Datos tomados de la Dirección de Salud Pública del Gobierno de Aragón (2006).

El mantenimiento de los alimentos a inadecuados intervalos de tiempos/Temperatura de almacenamiento, con frecuencia constituyen uno de los factores de riesgo más comunes (Roberts y col., 2008; FDA, 2010). Los estudios realizados en comedores colectivos indican que es muy frecuente la exposición de los alimentos refrigerados a abusos de Temperatura durante periodos prolongados de tiempo, desde la preparación hasta la distribución de los mismos (Gallay, 2002; Rosset y col., 2004; Réglier-Poupet y col., 2005; Arévalo, 2009). Otras posibles deficiencias están relacionadas con control de las Temperaturas de almacenamiento de los alimentos crudos y procesados listos para el consumo, el desconocimiento de los manipuladores acerca de las Temperaturas de cocinado y refrigeración adecuadas para prevenir el crecimiento y supervivencia de los microorganismos (Baş y col 2006; Garayoa y col., 2011; Jianu y Chis, 2012), el inadecuado enfriamiento y recalentamiento de los alimentos y la preparación varias horas antes de su consumo (Weingold y col., 1994); o los procedimientos de refrigeración conjunta de los alimentos crudos y cocidos (Gomes-Neves, 2007).

2.2.6. FORMACIÓN DE LOS MANIPULADORES

La formación de los manipuladores constituye una importante línea de defensa en la prevención de la mayoría de las toxiinfecciones alimentarias (Martínez-Tomé y col., 2000; Gibson y col., 2002; Sun y Ockerman, 2005) que se pueden producir como consecuencia a los factores de riesgos citados anteriormente; a la vez que constituye una estrategia de gestión de seguridad alimentaria que ofrece beneficios a largo plazo para las industrias alimentarias (Smith, 1994).

Desde hace algún tiempo, los cuestionarios o “checklists” han representando una herramienta eficaz para especificar el nivel de conocimientos y las aptitudes de los manipuladores y supervisores, en materia de seguridad alimentaria (Angelillo y col., 2000, 2001; Clayton y col., 2002; Veiros y col., 2007, 2009; Soares y col., 2012). De hecho, existen estudios que detallan metodologías más sofisticadas con el objeto de obtener una mayor cantidad y fiabilidad de información (Clayton y col., 2004) de cara a mejorar la educación de los manipuladores.

Este tipo de herramientas han servido para que numerosos autores propusieran cambios objetivos en las metodologías de formación de los manipuladores. Por ejemplo, Hislop y Shawn (2009) propusieron reforzar la formación de los manipuladores menos experimentados de las empresas alimentarias y ratificar los conocimientos de los más experimentados en un período no superior a 10 años. Por otra parte, Gomes-Neves y col. (2011) sugirieron que la formación se realice acorde al nivel intelectual de los manipuladores para que puedan adquirir los conocimientos esenciales y garantizar un mejor desempeño y motivación del personal. Igualmente, Garayoa y col. (2011) expusieron la necesidad de implicar a los manipuladores en los sistemas de APPCC con el fin de corregir sus actitudes y comportamientos durante el trabajo. Asimismo, Furnari y col. (2002) propusieron la capacitación periódica como un método eficaz para elevar el nivel de conciencia de los manipuladores.

La formación de los manipuladores de alimentos en materia de higiene alimentaria es un requisito legal de carácter obligatorio para el sector agroalimentario. Con el objeto de mejorar la formación del personal manipulador, el 19 de febrero de 2010 se publicó a nivel nacional el Real Decreto 109/2010, de 5 de febrero, *por el que se modifican diversos reales decretos en materia sanitaria*, entre ellos deroga expresamente al RD 202/2000. Los cambios normativos no afectan, sin embargo, a la responsabilidad que tienen las empresas alimentarias de poner en el mercado alimentos seguros y como parte de las garantías que deben ofrecer, incluye la formación de los manipuladores acorde con su puesto de trabajo, tal y como se estipula en el Reglamento (CE) 852/2004.

Así, el Reglamento (CE) 852/2004 en su Capítulo XII sobre Formación, Anexo II establece:

Los operadores de las empresas alimentarias deberán garantizar:

- ✓ La supervisión y la instrucción o formación de los manipuladores de productos alimenticios en cuestiones de higiene alimentaria, de acuerdo con su actividad laboral.
- ✓ Que quienes tengan a su cargo el desarrollo y mantenimiento del procedimiento mencionado en el apartado 1 del artículo 5 del presente Reglamento o la aplicación de las guías pertinentes hayan recibido una formación adecuada en lo tocante a la aplicación de los principios del APPCC.
- ✓ El cumplimiento de todos los requisitos de la legislación nacional relativa a los programas de formación para los trabajadores de determinados sectores alimentarios.

En vista a lo estipulado en el presente reglamento y a los cambios en las normativas, el Ministerio de Sanidad y Política Social y la AESAN, aportan también un *Documento de Orientación sobre la Formación de los manipuladores de alimentos* (www.aesan.msc.es), que explica ampliamente cada una de las obligaciones anteriores.

Recientemente, la Federación Europea de Sindicatos de Alimentos, Agricultura y Turismo (EFFAT) y la Federación Europea de Restauración Colectiva (FERCO) pusieron en marcha el proyecto “Formación para todos”. El proyecto se apoya en el desarrollo de una herramienta informática de formación básica destinada a los manipuladores de primer nivel del sector de la restauración colectiva de toda Europa. Esta herramienta se encuentra disponible en internet de modo gratuito (www.contract-catering-guide.org/food-hygiene-training-for-all) y su objetivo es cualificar a los trabajadores de la restauración colectiva y ofrecer además la oportunidad de formación a los trabajadores de aquellas empresas de restauración que no cuenten con los recursos suficientes para invertir en capacitación.

2.3. PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS Y VEGETALES DE IV GAMA

2.3.1. BENEFICIOS NUTRICIONALES DE LOS PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS

El consumo de frutas y hortalizas frescas se ha convertido en una seña de identidad de la dieta mediterránea. En los últimos años, su demanda se ha extendido a un gran número de países, demostrando que evidentemente constituyen un conjunto de productos básicos dentro de la alimentación humana.

Los vegetales de hoja verde se caracterizan por su alto contenido en fibra, vitaminas, minerales, compuestos fitoquímicos y por sus propiedades hipocalóricas y su inclusión en la dieta ayuda a disminuir los riesgos de enfermedades en adultos (cardiovasculares, diabetes, cáncer), a mejorar el sistema inmunitario y a reducir los índices de sobrepeso y obesidad. Según la OMS y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), el consumo mínimo recomendable de frutas y vegetales debe ser de 400g/día.

Haciendo un breve paréntesis, es importante señalar que los cambios en los hábitos de consumo de la población han contribuido al aumento del número de casos por sobrepeso y obesidad, donde los niños son los más propensos a estas enfermedades. Actualmente, en la Unión Europea existen alrededor de 22 millones de niños con sobrepeso y de ellos más de 5 millones son obesos. Precisamente, el 23,6% de la población española más joven padece sobrepeso u obesidad (Bartrina y col., 2007).

En vista a minimizar las repercusiones atribuibles a ambas enfermedades, en España, la estrategia NAOS y el Proyecto PERSEO han servido de plataformas para fomentar una dieta sana y equilibrada y rescatar los hábitos alimenticios principalmente de los niños y jóvenes. Para ello han contado con el apoyo de la AESAN, el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, el sector de la restauración, así como con la colaboración de las comunidades autónomas de Andalucía, Canarias, Castilla y León,

Extremadura, Galicia, Murcia y Ceuta. Ambos proyectos cuentan con el respaldo europeo de los Reglamentos (CE) 1234/2007 y 288/2009 que en su conjunto promueven y establecen una organización común de mercado agrícola (OCM) para responder al plan de consumo de frutas y hortalizas en los centros escolares. Todo ello, motiva a un mayor compromiso para con los ciudadanos, en el aseguramiento de alimentos saludables e inocuos que garanticen una mejor calidad de vida.

2.3.2. VEGETALES DE IV GAMA EN ESPAÑA. IMPORTANCIA DEL SECTOR

Sin embargo, los nuevos estilos de vida han conllevado a que el consumidor demande productos de fácil y rápida preparación o listos para el consumo (RTE), por lo que en ocasiones la forma tradicional de preparación de frutas y vegetales frescos no satisface las expectativas de la población; de hecho, en la actualidad existe un consumo incrementado de frutas y vegetales RTE (Buck y col., 2003).

Los alimentos RTE son *«alimentos destinados por el productor o el fabricante al consumo humano directo sin necesidad de cocinado u otro tipo de transformación eficaz para eliminar o reducir a un nivel aceptable los microorganismos peligrosos»* (Reglamento (CE) 2073/2005 de la Comisión de 15 de Noviembre de 2005 *relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios*). En este sentido, el mínimo procesado de las frutas y vegetales se ha convertido en un mercado ampliamente demandado por los consumidores.

Los alimentos mínimamente procesados o de IV Gama como se les conoce comercialmente (Artés y col., 2009) son aquellos *«productos vegetales, frutas y hortalizas frescos sin tratamiento térmico, preparados, lavados y envasados que han podido ser objeto de troceado, corte o cualquier otra operación relativa a la integridad física del producto (cualquier procedimiento físico que entrañe una modificación de las características fisiológicas y microbiológicas del producto) listo para consumir o cocinar y son destinados al consumo humano»* (Asociación Española de Frutas y Hortalizas Lavadas y Listas para su Empleo, AFHORLA). Asimismo,

Wiley (1994) añade que *«las frutas y hortalizas mínimamente procesadas son aquellas preparadas siguiendo uno o varias operaciones apropiadas, tales como el pelado, cortado en lonchas, troceado, etc. dado un tratamiento de conservación parcial pero que puede incluir el uso moderado de calor, conservantes o irradiación»*.

Históricamente, la tecnología de la IV Gama se originó en los Estados Unidos en los años 70, precisamente para satisfacer las necesidades de los restaurantes de comida rápida y de los establecimientos de venta de ensaladas. En principio, la materia prima más utilizada fue la lechuga iceberg, con un tiempo de conservación no superior a los 4 días. Posteriormente la producción de vegetales de IV Gama se extendió a otros países, como Francia, Alemania, Holanda y Suiza. En España, la tecnología de IV Gama se introdujo en los años 80 y Navarra fue la comunidad pionera en comercializar este tipo de producto, hasta extenderse a otras comunidades hortofrutícolas como Murcia, Comunidad Valenciana, Andalucía y Cataluña (Carbonell, 1990).

En estos momentos, el sector de vegetales de IV Gama se encuentra en pleno auge y se perfila como uno de los mercados más prometedores de la alimentación. Tanto es así, que los datos aportados por AFHORLA indican un volumen de negocio en torno a los 200 millones de euros. A mediados del año 2010 se llegaron a comercializar 47,2 mil Tm de frutas y hortalizas, de las cuales, 46,4 mil Tm se correspondieron sólo a hortalizas. La comercialización por sectores experimentó una subida respecto al año 2009, donde el sector de la distribución demandó el 82% de la producción total (lo que representó un 9% más) y el 18% se dirigió al sector de la restauración colectiva que percibió también un incremento de un 3,5% (AFHORLA, 2010). Así, en el 2011, el consumo medio de frutas y hortalizas transformadas fue de 13,4 kg/per cápita/año (MAGRAMA, 2011). En la siguiente Tabla 3 se muestran los datos referentes a la evolución del consumo de frutas y hortalizas transformadas en los últimos dos años. Como se puede observar en los hogares es donde se realiza un mayor consumo de estos productos, sin dejar de destacar la evolución percibida en el sector de la restauración institucional.

TABLA 3. Evolución del consumo total de Frutas y Hortalizas transformadas en los hogares y en el sector de la restauración colectiva (Tm).

Frutas y Hortalizas transformadas				
Sector	Hogares	H/R*	Instituciones	Total
2010	165.3	21,0	5,6	191.9
2011	163.8	33,3	14,1	211.1
	(-0,9)	(+58,3%)	(+150,6)	(+10,0%)

*H/R: Hoteles/Restaurantes. Tomado de Consumo Alimentario en España Año 2011 (MAGRAMA) y elaboración propia.

En el mercado español, las ensaladas de hortalizas constituyen el principal impulsor de la industria de la IV Gama. La producción de ensalada de IV Gama se basa fundamentalmente en lechuga (60%), el 17% de las ensaladas se componen de mezclas de lechuga y otras hortalizas para ensaladas (incluyendo col lombarda, zanahoria rallada, canónigos, escarolas, etc.), el 7% de espinacas, el 3% de acelga y zanahoria rallada, el 1% de cebolla, pimiento, puerro, mezcla para sopas, brotes, apio, coles de bruselas y brasicas (coliflor, brócoli y romanescu) y un 2% de otras hortalizas entre las que se destacan las de pequeño tamaño y de sabor intenso conocidas como mini (zanahorias, rabanitos, tomate cherry, etc.)(Artés y col., 2004) (Figura 3).

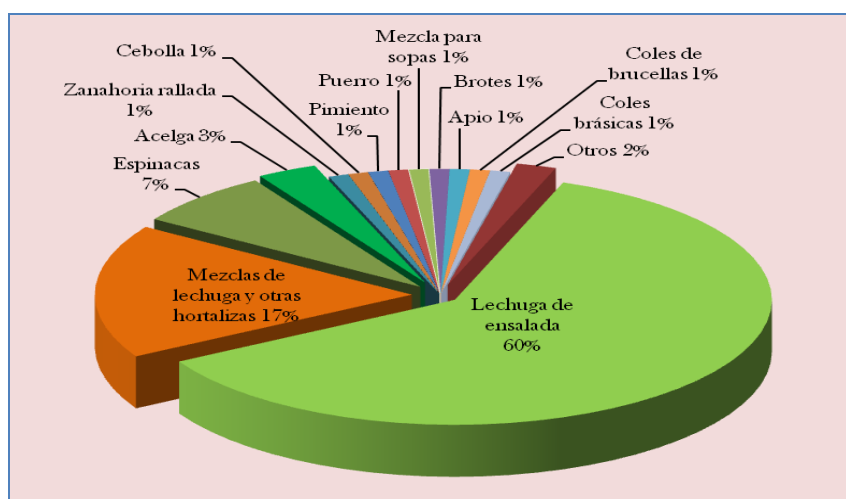


Figura 3. Producción de hortalizas de IV Gama en España (%)

2.3.3. DESARROLLO COMERCIAL DE LA IV GAMA EN EL RESTO DEL MUNDO

A nivel internacional, los países desarrollados han logrado los mayores avances tecnológicos y una mayor expansión comercial de productos de IV Gama. A continuación se describe brevemente la comercialización de estos productos en diferentes regiones del mundo:

En los Estados Unidos por ejemplo, los estudios de mercado indican que las principales razones de demanda de frutas y verduras acondicionadas se deben a la conveniencia, la preocupación por la salud y las preferencias de los consumidores por productos naturales. En los últimos años, el consumo per cápita ha presentado tasas de crecimiento dinámicas hasta alcanzar los 30kg/año. A nivel industrial, los productos más explotados y con mayor estabilidad comercial han sido los vegetales frescos cortados como las ensaladas de col, lechuga, brócoli, etc.; con variadas presentaciones desde raciones individuales envasadas (de 100-150g) hasta la venta a granel (de 1-10kg) para establecimientos de restauración. Son muy conocidos los “snack trays” (combinación de verduras como el apio, rabanito, zanahoria baby, con una salsa de acompañamiento u otros condimentos); los “party trays” (son platos diseñados para ocasiones especiales, por lo que tienen formatos más grandes y presentaciones más cuidadas); los “meals” (platos preparados a base de verduras, salsa y pechuga de pollo que presentan una vida comercial en torno a las 2 semanas).

En Europa, el Reino Unido es el principal consumidor de productos de IV Gama (12kg/per cápita/año). Posee una mayor cuota de crecimiento y su mercado comercializa una amplia variedad de productos, donde las raíces o brotes ocupan en torno al 40% de su mercado. Por su parte Francia, posee un consumo per cápita 3 veces superior al de España; y al igual que el resto de países de Europa, la ensalada es el producto estrella. Los lineales de IV Gama en los supermercados franceses van obteniendo mejores resultados con el transcurso de los años, experimentado una subida en los volúmenes de ventas de ensaladas, legumbres, o “crudités” (son platos

tradicionales compuestos por hortalizas crudas). En Alemania, las “chilled food” (ensaladas preparadas y macedonias de frutas listas para el consumo) son también unas de las categorías que está experimentando un gran auge en el mercado. Entre las ensaladas se destacan las ensaladas preparadas y envasadas generalmente en bolsa o en tarrinas de plástico conocidas como “feinkostsalaten” que son elaboradas con distintos tipos de productos (carnes, patatas, arenques, etc.) y que por lo general se presentan aliñadas y listas para comer sin necesidad de ninguna preparación posterior. Este tipo de ensalada generó alrededor de 500 millones de euros en el 2006.

En Japón, las ensaladas mediterráneas con productos ecológicos tienen una considerable aceptación. En este tipo de ensalada se suelen combinar varios alimentos como la lechuga, tomates cherry, maíz, pepino en rodajas, atún y huevo duro.

2.3.4. TECNOLOGÍA DE FABRICACIÓN DE ENSALADAS VEGETALES DE IV GAMA

El proceso de la fabricación de frutas y hortalizas de IV Gama comienza en el campo con el cultivo de la materia prima (AFHORLA, 2011). Ya en el ámbito industrial, se someten a una serie de operaciones específicas unitarias suaves que garantizan el mantenimiento de la frescura y la calidad del producto final; seguido de un envasado que puede o no ser bajo atmósfera modificada o activa, para posteriormente proceder a su almacenamiento, transportación, y comercialización en condiciones adecuadas de refrigeración. La aplicación de las buenas prácticas de manufactura y las buenas prácticas de manejo post-cosecha, en combinación con adecuados métodos de envasado y de conservación, constituyen en un conjunto de medidas que contribuyen a garantizar la seguridad alimentaria de estos productos (Clark, 2002; Ginestrea y col., 2005; Chilled Food Association, 2007). Asimismo, el seguimiento de las prácticas de higiene desde el procesado hasta la venta al consumidor como se estipula en el Codex Alimentarius, concretamente en el Código de Prácticas

Generales de Higiene (CAC/RCP 1-1969) y el Código de Prácticas de Higiene para Frutas y Hortalizas Frescas (CAC/RCP 53-2003), se antoja fundamental para garantizar su salubridad de cara al consumidor final.

Recientemente, FEPEX ha emitido la segunda versión de las Guías de Buenas Prácticas de Producción de Productos de IV Gama (2010). Esta guía establece orientaciones sobre la base de determinados requisitos para asegurar la calidad de cada fase del procesado y por tanto la calidad del producto final. Para ello, incluye varios aspectos relacionados con el control de las materias primas, la higiene de las instalaciones, los equipos, el personal manipulador así como los requisitos durante el transporte. Asimismo, expone los criterios microbiológicos en correspondencia con el Reglamento (CE) 2073/2005 y establece la necesidad de disponer de un sistema de autocontrol para la salubridad de los productos, basado en la metodología de APPCC.

A modo de ejemplo, la Figura 4 representa el diagrama de flujo de un proceso de fabricación de ensaladas mínimamente procesadas, propuesto por Cano (2001):

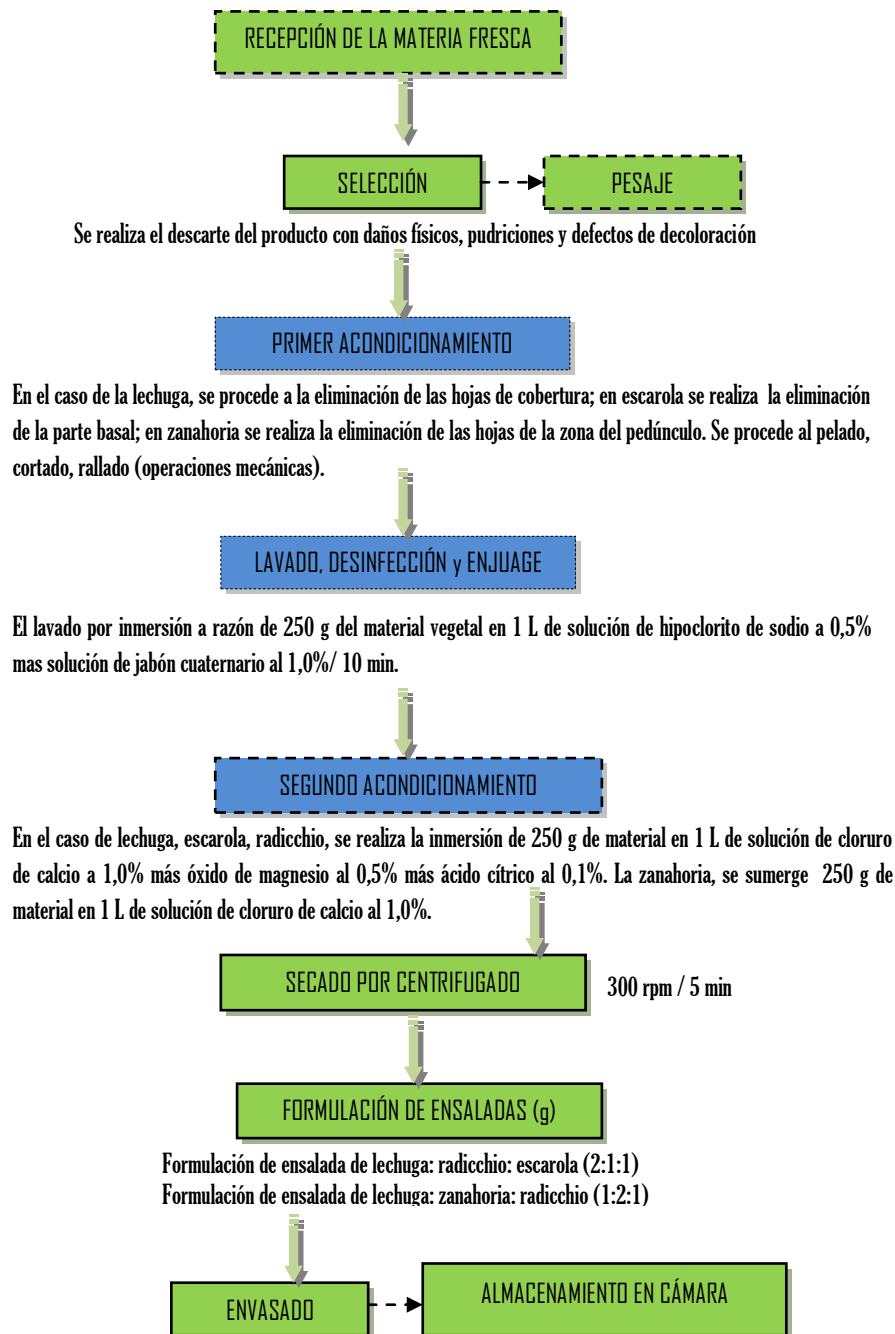


Figura 4. Diagrama de flujo de obtención de ensaladas de IV Gama ("Mediterránea y Cheff") (Tomado de Méndez, 2008).

Las ensaladas vegetales se consideran alimentos altamente perecederos, ya que son productos físicamente alterados a partir de su forma original y tienen un riesgo elevado de contaminación por patógenos emergentes durante el procesado (Ohlsson, 1994; Soliva y Martín, 2003; Tapia y col., 2005).

Durante el procesado, la calidad del agua de lavado, la higiene (incluyendo la higiene de los operarios, de los equipos y las áreas de trabajo) y el mantenimiento del

producto a Temperaturas de refrigeración juegan un papel fundamental en la preservación de la inocuidad del producto. La contaminación microbiana puede ocurrir en cualquier etapa, no obstante el lavado es una de las etapas más importantes porque de ella depende la reducción de la carga microbiana que acompaña a la materia prima (Gil y col., 2009). Algunos estudios científicos han demostrado que en ocasiones los métodos industriales de lavado e higienización de los vegetales mínimamente procesados no son lo suficientemente eficaces en la eliminación total de patógenos cuando están presentes en el alimento (Abadias y col., 2011). Algunos desinfectantes como el agua clorada, el dióxido de cloro, el peróxido de hidrógeno o los ácidos orgánicos son reconocidos por producir un efecto mínimo sobre la población microbiana causando una reducción <2 log ufc/g. Ello significa que los tratamientos a los que se somete el producto durante el procesado también condicionan de forma significativa su seguridad (Koseki e Isobe, 2007).

Por otra parte, las operaciones mecánicas a la que se someten los vegetales, como el pelado, cortado, rallado, troceado etc., producen daños físicos y tisulares que destruyen la barrera natural de protección del producto. Esto favorece la pérdida de nutrientes que constituyen el medio y las condiciones óptimas para la supervivencia y desarrollo tanto de microorganismos patógenos (*E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella*) (Abdul-Raouf y col., 1993; Gleeson y O' Beirne, 2005; Tapia y col., 2005; Delaquis y col., 2007; McEvoy y col., 2008) como alterantes (Soares y Geraldine, 2007). A este efecto, se suman los métodos de corte (como el tipo de cuchilla o la dirección del corte) que influyen considerablemente en la exposición de grandes áreas de tejido interno, lo que propicia una mayor susceptibilidad al deterioro microbiano durante su vida útil (Zhou y col., 1992; O' Beirne, 1995; Barry-Ryan y O' Byrne, 1998).

En este sentido, la aplicación de nuevas tecnologías de conservación permiten mantener las características sensoriales y al mismo tiempo reducir la contaminación microbiana en todas y cada una de las etapas de la cadena de producción, procesado y distribución (Gil y col., 2005). Las investigaciones destacan la efectividad de la

combinación del procesado mínimo con diferentes metodologías de conservación. Los estudios recientes enfatizan en la utilización de desinfectantes como los ácidos orgánicos naturales (cítrico, acético, málico, propiónico y láctico) o los de potencial oxidación-reducción (hipoclorito de sodio, dióxido de cloro, fosfato trisódico o peróxido de hidrógeno y el ozono) (Beuchat, 2000, Beuchat y col., 2004; Ölmez y Kretschmar, 2009; Raybaudi-Massilia y col., 2009); el uso del agua electrolizada ligeramente ácida Issa-Zacharia y col. (2011); el uso de bacteriocinas (Randazzo y col., 2009); de aceites esenciales como bioconservantes (Karagözlü y col., 2011; Ponce y col., 2011); de radiaciones ionizantes (Goularte y col., 2004; Jeong y col., 2010, radiaciones ultravioletas C (UV-C) (Lamikanra y Bett-Garber (2005), pulsos luminosos (Marquenie, 2002); nuevas metodologías de atmósfera modificada (Amanatidou y col., 2009) entre otras.

2.3.5. ACONDICIONAMIENTO DE LAS ENSALADAS VEGETALES DE IV GAMA EN ESTABLECIMIENTOS DE RESTAURACIÓN COLECTIVA

La lechuga de IV Gama es uno de los vegetales de mayor demanda en los establecimientos de venta y en los de restauración colectiva. Su servicio suele ser habitual en los comedores, hospitales, universidades, centros geriátricos, etc., por sus aportaciones nutricionales para con la salud. Sin embargo, como ya se ha explicado anteriormente estos alimentos son muy propensos a las contaminaciones microbianas, probablemente en mayor medida durante el proceso de preparación de las ensaladas, por lo que es muy importante que cada etapa que conforma dicho proceso esté encaminada a garantizar la inocuidad del producto final.

Durante el proceso de preparación de ensaladas, las prácticas de higiene de los manipuladores, la contaminación cruzada y el mantenimiento de la cadena de frío, representan los factores de riesgos más importantes (Little y Gillespie, 2008). Numerosos estudios microbiológicos describen el grado de contaminación de las ensaladas vegetales por microorganismos aerobios mesófilos (*AEM*), indicadores de

higiene inadecuada o de contaminación fecal (algunas especies de enterobacterias, *CF*, *CT*) y por algunos patógenos emergentes responsables de considerables brotes de toxiinfecciones alimentarias (Gillian y col., 1999; Castro y col., 2006; Little y Gillespie 2008; Santos y col., 2012).

A continuación se detalla el diagrama de flujo general de un proceso de preparación de ensalada de lechuga en correspondencia con los procedimientos observados en los establecimientos de restauración colectiva estudiados en la presente Tesis Doctoral:

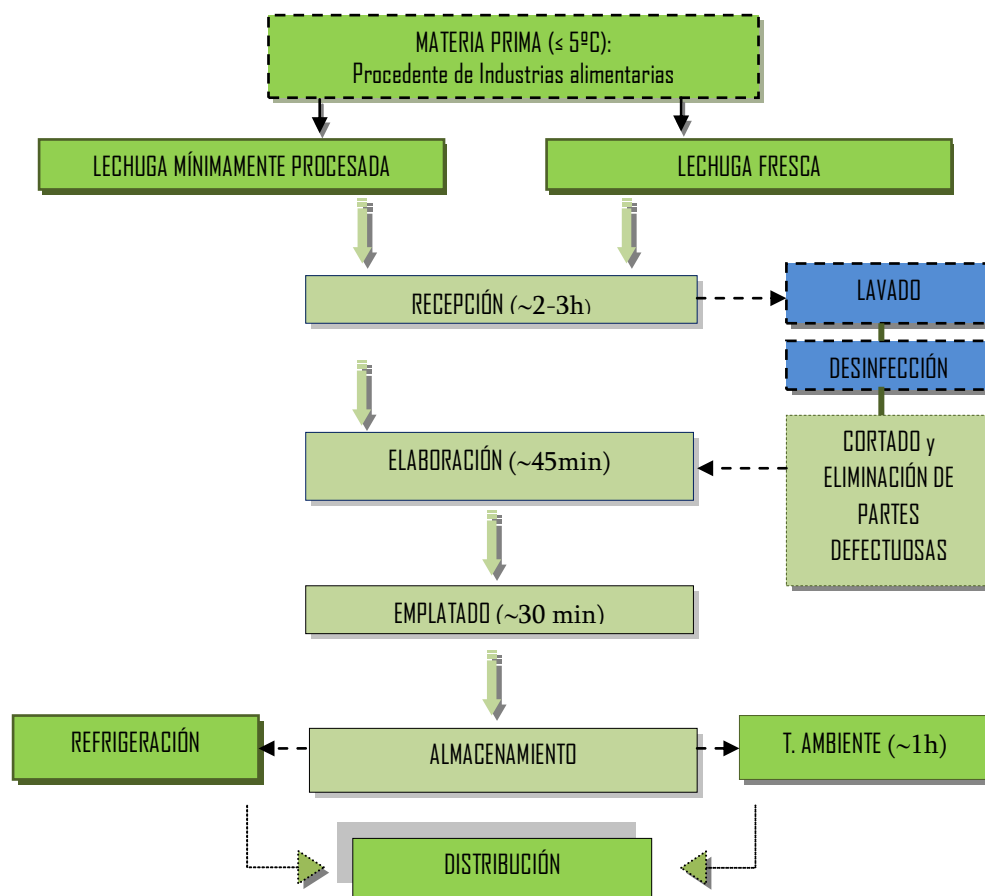


Figura 5. Diagrama de flujo del proceso de preparación de ensalada de lechuga en establecimientos institucionales (comedores escolares, centros geriátricos y hospitales) (Elaboración propia).

Recordemos que las ensaladas vegetales RTE se consumen crudas por ello es aconsejable mantenerlas bajo Temperaturas de refrigeración ($\leq 5^{\circ}\text{C}$) para evitar su deterioro (Franz y col., 2010; Tian y col., 2012). Sin embargo, durante las etapas de preparación y distribución es muy frecuente la exposición de estos alimentos a

variaciones de Temperaturas. Franz y col. (2010) realizaron un estudio en bares de ensaladas y comprobaron oscilaciones de Temperatura entre 0–13°C en un tiempo máximo de 2h, lo cual provocó un incremento poblacional de patógenos como *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 y *Salmonella*. Al respecto, Koseki e Isobe (2005) puntualizaron que el control adecuado de la Temperatura durante la toda la cadena de producción de alimentos, constituye una medida de seguridad alimentaria que condiciona el desarrollo de aquellos patógenos que hayan logrado sobrevivir a las bajas Temperaturas, a los tratamientos de desinfección o estén vinculados con las prácticas de manipulación.

2.4. CARNES Y PRODUCTOS CÁRNICOS LISTOS PARA EL CONSUMO

2.4.1. BENEFICIOS NUTRICIONALES DE LAS CARNES Y PRODUCTOS CÁRNICOS

Por carne se entiende «*la parte muscular comestible de los animales de abasto sacrificados y faenados en condiciones higiénicas. Se incluyen las porciones de grasa, hueso, cartílago, piel, tendones, aponeurosis, nervios y vasos linfáticos y sanguíneos que normalmente acompañan al tejido muscular y que no se separan de él en los procesos de manipulación, preparación y transformación*» (Horcada y Polvillo, 2010).

Tanto las carnes y como los productos cárnicos elaborados, constituyen un gran alimento para la nutrición humana y su inclusión en la dieta diaria es muy aconsejable por su gran riqueza en nutrientes, fundamentalmente en proteínas de alto valor biológico ((16-25%) y un 40% de aminoácidos esenciales), en sustancias nitrogenadas no proteicas (aminoácidos libres, péptidos, creatina, nucleótidos, etc.), en grasa (1-30%), en vitaminas (Tiamina, Niacina, Retinol y vitaminas B6 y B12 principalmente) y minerales (Hierro, Zinc de alta biodisponibilidad, Fósforo, Magnesio, Selenio, Cobalto, Cromo y Níquel) (Chizzolini y col., 1999; Biesalski, 2005).

2.4.2. SECTOR DE LA INDUSTRIA CÁRNICA EN ESPAÑA

La producción de carne en España ha aumentado considerablemente desde hace algo más de dos décadas superando el 100%; desde los 2,6 millones de Tm que producía inicialmente en 1980 a los 5,6 millones que alcanzó producir en el 2008, según un informe de la FAO. En el año 2008, España aportó el 13% de la producción cárnica europea (43,2 millones de Tm) que se tradujo en un incremento del 14% respecto a años anteriores; y junto con Alemania y Francia representó uno de los tres primeros países productores de carne en Europa. La importancia de la creciente producción de carne en el contexto europeo se refleja en la Figura 6. Entre los años 1980 y 2008, se

percibió un intenso incremento de la producción de carne en España aumentando hasta en un 110,7% en comparación con la Unión Europea (20,4%). En lo que respecta a la producción de carne a nivel mundial, España se sitúa en octavo lugar (279,9 millones de Tm) aportando el 2% a la producción total, aunque lejos todavía de los principales productores de carne como China, Estados Unidos o Brasil, (Soler-Horcadas, 2010).

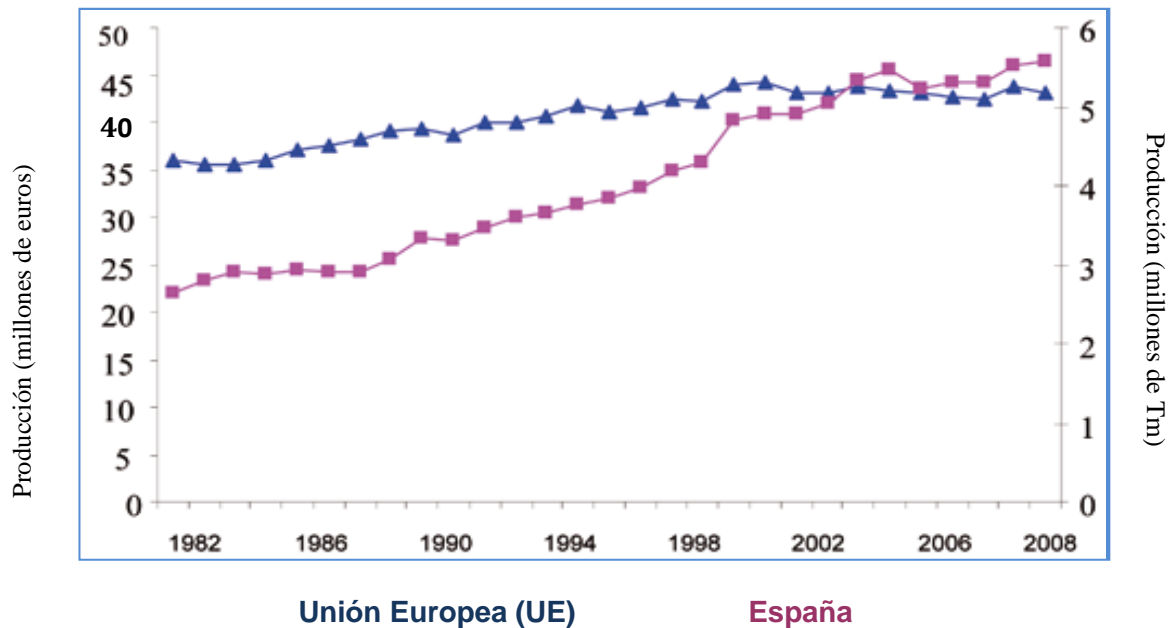


Figura 6. Evolución de la producción de carne en España y la UE 1980-2008 (Tomado de Soler y Horcadas, 2010).

Actualmente la industria cárnica española, es uno de los cinco pilares industriales más importantes a nivel nacional. La producción de carne fresca tiene una gran relevancia ya que genera aproximadamente el 21% del total de la facturación (96,5 millones de euros) que supone prácticamente el 2% del PIB nacional. Para ello cuenta con 700 mataderos, 2,400 salas de despiece y cerca de 5,170 establecimientos dedicados a la elaboración de productos cárnicos. Entre las principales productoras de carne se encuentran las comunidades de Cataluña, Castilla y León y Andalucía, que concentran en torno al 58% de la producción total. En cuanto a la producción por especie, la carne porcina se consolidó con un 61% (3,5 millones de Tm) de la producción total en el 2011 y el mercado español se ratificó mundialmente como el cuarto mayor productor, superado por China, Estados Unidos y Alemania; le

siguieron la producción de carne de aves (24%) fundamentalmente la carne de pollo; la carne de vacuno (11%) y de ovino (2,3%). Es importante destacar que el sector cárnico español asegura el empleo a casi 83 mil personas. (Cruz, 2012). La Tabla 5, muestra la evolución que ha mantenido la producción de carne a nivel nacional en los últimos cuatro años:

TABLA 5. Evolución de la producción de carne por especies en España (período 2008-2011) (miles de Tm)

Carnes	2008	2009	2010	2011	Crecimiento 11/10
Porcino	3,484.4	3,290.6	3,368.9	3,479.5	3,3%
Aves	1,375.3	1,316.7	1,349.4	1,386.4	2,7%
Vacuno	658.3	598.4	602.5	604.7	0,4%
Ovino	156.9	124.4	131.2	131.7	0,3%
Conejos	68,7	61,2	63,5	67,4	6,2%
Caprino	9,3	8,8	10,6	10,4	-2,3%
Equinos	6,2	6,4	7,1	10,9	53,3%
TOTAL	5,749.1	5,406.5	5,533.3	5,690.9	2,8%

Fuente: MAGRAMA (Tomado de Cruz ,2012).

Los productos cárnicos elaborados también han experimentado un importante auge. Según la Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España (ANICE), el propósito de un mayor mercado de productos elaborados es el de encaminar la producción sobre la base de un mejor precio, conveniencia, comodidad, mejores presentaciones y nuevos productos con perfiles nutricionales más ligeros, etc.

Como carne elaborada se entiende aquellos «*Productos resultantes de la elaboración de la carne cruda o de la ulterior elaboración de dichos productos elaborados de manera que, cuando se corta, en la superficie cortada se observa que el producto ya no tiene las características de la carne fresca*» (Código de prácticas de higiene para la carne (CAC/RCP 58/2005)). En la actualidad, España es uno de los mayores productores de cárnicos elaborados en Europa, junto a Alemania, Italia y Francia y en el año 2010, su producción se cifró en torno a 1,3 millones de Tm que supuso un

incremento del 1,6% (Cruz, 2012). A continuación la Tabla 6 detalla la evolución del mercado español durante el período 2008-2010.

TABLA 6. Evolución de la producción de cárnicos elaborados en España (período 2008-2010) (miles de Tm)

Cárnicos elaborados	2008	2009	2010	Crecimiento 10/09
Jamones y Paletas curados	271.9	245.0	251.0	2,4%
Embutidos curados	197.0	185.2	188.0	1,5%
Jamón y paleta cocidos	183.5	175,0	174,0	-0,6%
Otros tratados por el calor	382.4	385.0	393.0	2,1%
Adobados y frescos	185.4	180.4	182.5	1,2%
Platos preparados	84,2	80,6	82,0	1,7%
TOTAL	1,304.5	1,251.0	1,270.5	1,6%

Fuente: Confederación de Organizaciones Empresariales del sector cárnico en España (CONFECARNE) (Tomado de Cruz, 2012).

De forma global, el consumo de carne estuvo cerca de los 2,9 millones de Tm al que se le atribuyó un gasto en torno a los 18 millones de euros. El mayor consumo de carne se realizó en los hogares (2,4 millones de kg y representó el 82,6%) comparado con el que se produjo en la restauración comercial (13,7%) e institucional (3,6%) (Tabla 7). El consumo per cápita anual estuvo cerca de los 52,7 kg; sin embargo éste varió por grupo de productos y se percibió una mayor demanda de los consumidores por productos frescos y elaborados, cuyo consumo alcanzó el 23% con un gasto superior a los 5 millones de euros (MAGRAMA, 2011).

TABLA 7. Consumo de carne y productos cárnicos elaborados (2011) (miles de Kg / millones de euros)

	Hogar		Restauración comercial		Restauración colectiva		TOTAL	
	Consumo	Gasto	Consumo	Gasto	Consumo	Gasto	Consumo	Gasto
Carnes								
Fresca	1,775.6	10,441.7	200.4	1,127.9	60,5	271.1	2,036.6	11,840.6
Congelada	80,2	399.1	103.5	435.6	18,4	74,9	202.2	909.6
Elaborada	560.4	4,675.9	102.5	681.8	26,1	148.3	689.1	5,506.0
TOTAL	2,416.3	15,516.6	401.41	2,245.3	105.1	494.4	2,917.7	18,250.2

Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) (Tomado de Martín-Cerdeño, 2011)

Condiciones higiénico-sanitarias de establecimientos de restauración colectiva y seguridad microbiológica de platos de ensalada y cárnicos cocidos dirigidos a poblaciones de riesgo

2.4.3. TECNOLOGÍA DE FABRICACIÓN DE PRODUCTOS CÁRNICOS COCIDOS RTE

Las carnes frescas son alimentos altamente perecederos por su alto contenido de nutrientes. Presentan niveles de actividad de agua (a_w) superiores a 0,980 y de pH entre 5,0–6,0, que constituyen las condiciones idóneas para el desarrollo de microorganismos patógenos como *Salmonella* sp, *Campylobacter jejuni/coli*, *Yersinia enterocolítica*, *E. coli* verotoxigénico y *L. monocytogenes*, entre otros (Campbell-Platt, 1995; Nörrung y Buncic, 2008).

El procesado cárnico tiene la ventaja que permite mejorar la conservación del alimento y desarrollar sabores y productos diferentes con un determinado valor agregado y aprovechar y elaborar aquellas partes del animal que son difíciles de comercializar y consumir en estado fresco. Además; de crear las condiciones químicas (pH, a_w) y ambientales (Temperaturas) necesarias para eliminar o inhibir un amplio número de microorganismos patógenos como alterantes.

Los productos cárnicos se clasifican en dependencia del tratamiento que reciben como: frescos, crudos–adobados, crudos–curados, tratados por el calor, salazones cárnicas, platos preparados cárnicos y otros derivados cárnicos. Particularmente, los productos cárnicos tratados por calor se definen como «*todos los productos preparados esencialmente con carnes y/o despojos comestibles de una o varias de las especies animales de abasto, aves y caza autorizadas, que se han sometido en su fabricación a la acción del calor para alcanzar en su punto crítico una Temperatura suficiente y lograr así la coagulación total o parcial de sus proteínas cárnicas y, opcionalmente, su ahumado y/o maduración*» (Orden, de 5 de Noviembre de 1981). Entre los cárnicos cocidos encontramos productos como el paté, fiambres, salchichas tipo Frankfurt, chopped, mortadela o el jamón cocido (Marcos, 2007). En los últimos años, estos productos han experimentando una creciente demanda atribuida a sus beneficios para con la salud, por su alto contenido proteico e hipocalórico y su

facilidad de preparación. La Figura 7 describe el diagrama de flujo de un proceso de fabricación de un producto cárnico cocido.

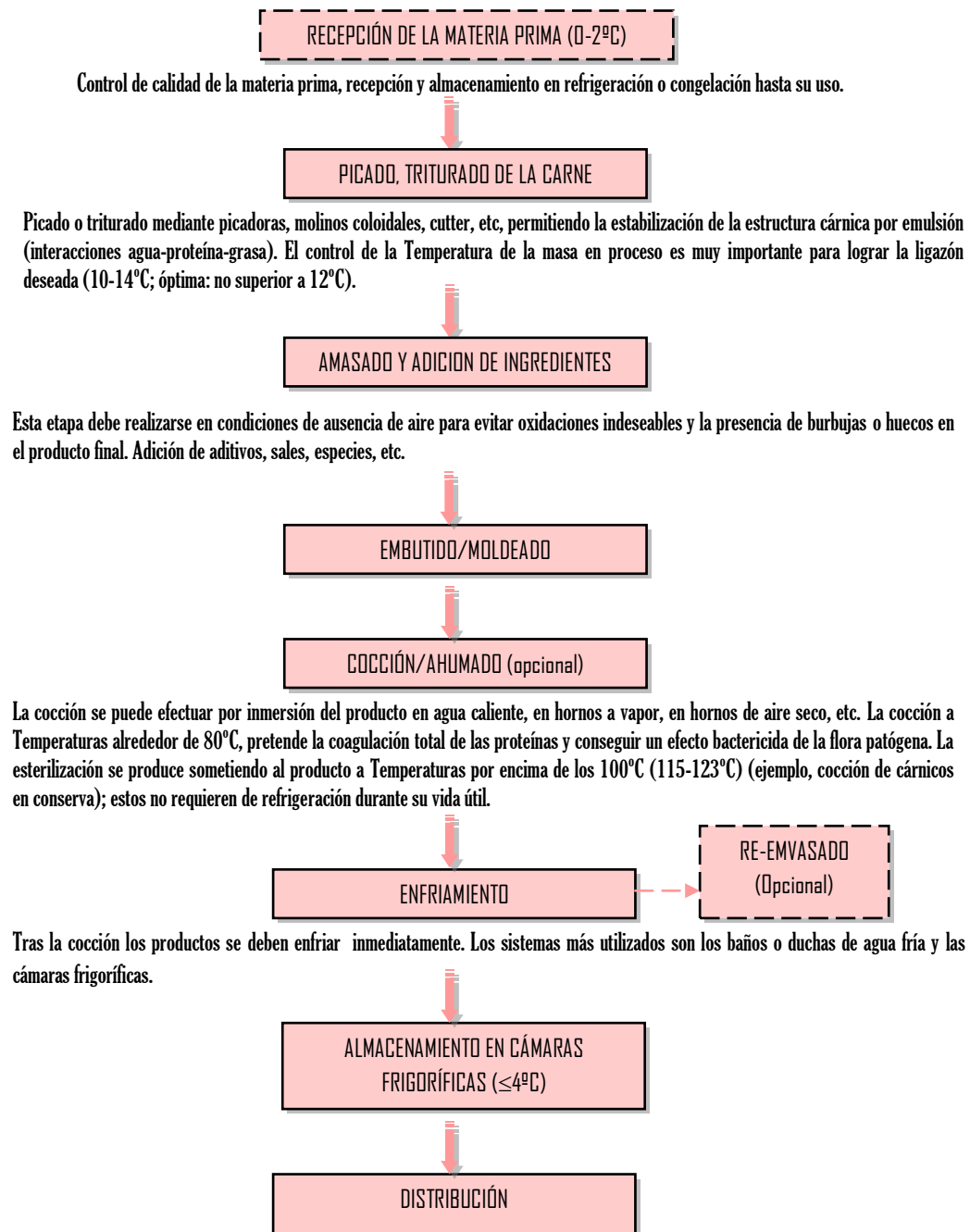


Figura 7. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de cárnicos cocidos. Tomado de la Guía de mejores técnicas disponibles en España del sector cárnico (2005) y elaboración propia.

Durante el procesado, la contaminación del producto puede ocurrir en cualquier etapa. La contaminación cruzada representa uno de los factores de riesgo más comunes, desde el contacto con alimentos crudos hasta con equipos y superficies de

trabajo contaminadas, así como por tratamientos de cocción ineficaces (Barco-Alcalá, 2001; Jessen y Lammert, 2003; Marcos, 2007).

Los tratamientos térmicos tienen por objeto la destrucción de la mayor parte de las formas vegetativas, capaces de alterar los alimentos o de interferir en el desarrollo de fermentaciones deseables. Durante el procesado, la problemática está en que se produzca un tratamiento de cocción insuficiente lo cual supone un peligro para los consumidores. La esterilización de los cárnicos se alcanza con la aplicación de Temperaturas superiores a 100°C que permiten la eliminación total de la flora presente; mientras que la pasteurización se produce bajo Temperaturas entre 60–80°C donde se consigue la eliminación de la flora patógena, pero queda una flora residual que debe ser controlada con el mantenimiento del producto a Temperaturas de refrigeración durante su vida útil (entre 0–5°C) (Marcos, 2007; Rodríguez y Simón, 2008). Rodríguez-Montoya (2003) afirma que el tratamiento a 65°C/15 es el procedimiento utilizado para inhibir el crecimiento microbiano en productos cárnicos en general. No obstante, asegura que el tratamiento a 65°C/ 40min podría ser un método eficaz para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* en productos cárnicos como el jamón; así como las Temperaturas de 57,2°C/ 37min para evitar la presencia de *Salmonella*.

Luego del tratamiento son citadas algunas problemáticas como las germinaciones y el desarrollo de esporas de *Bacillus* y *Clostridium* como resultado de un tratamiento térmico insuficiente; la posible contaminación por toxinas termoestables de *S. aureus* o el desarrollo de cepas termorresistentes de *Lactobacillus* que causan alteraciones físicas del producto (Rodríguez-Montoya, 2003).

La etapa de re-ensado supone la manipulación adicional del producto y como consecuencia la recontaminación puede ocurrir por la aplicación de prácticas de higiene inadecuadas. Durante esta etapa es aconsejable el mantenimiento del producto a Temperaturas de refrigeración; y es muy frecuente el uso de tratamientos de estabilización microbiológica (tratamiento térmico, altas presiones, agentes

químicos antibacterianos) que contrarresten las posibles contaminaciones por patógenos (Guía de mejoras técnicas disponibles en España del sector cárnico, 2005).

Por otra parte, el uso de las tecnologías no térmicas constituye una alternativa a los tratamientos de conservación tradicionales. Diversos estudios describen la acción antimicrobiana de las altas presiones hidrostáticas (Shigehisa y col., 1991; Garriga y col., 2002; Ömer y col., 2010); el uso de antimicrobianos naturales como el lactato sódico y potásico (Shelef y Potluri, 1995; Eckert y col., 1997; Devlieghere y col., 2000; Rodríguez y col., 2005) y la acción sinérgica del lactato y el diacetato sódico para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* en cárnicos (Mbandi y Shelef, 2002); el uso de bacteriocinas por su efecto sobre *Listeria* y otras bacterias Gram positivas como *Enterococcus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium*, *S. aureus*, entre otros (Casaus, 1997) y su aplicación en envases activos para reducir los riesgos de contaminación superficial en cárnicos listos para el consumo (Scannell y col., 2000; Han, 2005 y Deegan y col., 2006); el uso de envases antimicrobianos biodegradables en embutidos tipo bologna, jamón cocido y pastrami (Oauttara y col., 2000); el uso del agua oxidante electrolizada (Fabrizio y Cutter, 2005) para reducir *L. monocytogenes* en superficies de salchichas Frankfurt y jamones; de las radiaciones ionizantes para cárnicos cocidos envasados (Gil-Díaz, 2009); de radiaciones UV en lonchas de jamón RTE, para la inactivación de *L. monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* y *Campylobacter jejuni* (Chun y col., 2009); o la combinación de varias tecnologías (Garriga y col., 2002; Aymerich y col., 2005; Chung y col., 2005; Jofré y col., 2008), entre otras.

2.4.4. ACONDICIONAMIENTO DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS COCIDOS RTE EN ESTABLECIMIENTOS DE RESTAURACIÓN

Los productos cárnicos cocidos RTE son alimentos muy demandados por el sector de la restauración por su facilidad y rapidez de preparación. A continuación la Figura 8 representa el diagrama de flujo de un proceso de preparación de cárnicos cocidos RTE en un establecimiento de restauración:

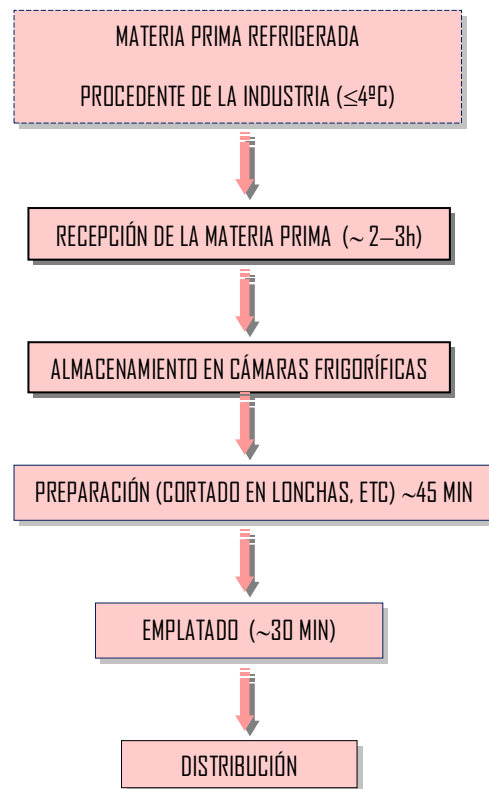


Figura 8. Diagrama de flujo del proceso de preparación de productos cárnicos cocidos listos para el consumo (Elaboración propia)

Durante esta fase de preparación, la contaminación cruzada es uno de los factores de riesgo más habituales. Este suceso puede ocurrir como consecuencia a las manipulaciones adicionales a las que se somete el producto; ya sea por su retirada del envase original, por las operaciones mecánicas (como el cortado en lonchas) o su re-emplatado para su distribución. El mantenimiento de la higiene garantiza la calidad del producto final y en caso contrario se puede producir la exposición del producto cárnico cocido a fenómenos de recontaminación por patógenos procedentes de ambientes, utensilios, superficies, manipuladores, y otros alimentos, contaminados (Cabeza y col., 2010). Numerosos estudios advierten que los cárnicos cocidos RTE son muy propensos a la recontaminación por patógenos tras las operaciones de cortado, cortado en lonchas, troceado etc., a través del contacto con equipos y utensilios de corte contaminados (Vorst y col., 2006a y b; Pérez-Rodríguez y col., 2007; Sheen y Hwang, 2010; Papadopoulou y col., 2012).

Asimismo, el mantenimiento del producto preparado bajo condiciones de refrigeración previas al consumo, constituye otra de las medidas de seguridad alimentaria de cara a minimizar los riesgos de proliferación de posibles microorganismos patógenos.

2.5. LEGISLACIÓN APLICABLE Y CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS

2.5.1. REAL DECRETO 3484/2000 POR EL QUE SE ESTABLECEN LAS NORMAS DE HIGIENE PARA LA ELABORACIÓN, DISTRIBUCIÓN Y COMERCIO DE COMIDAS PREPARADAS

El Real Decreto 3484/2000, representa la legislación española de aplicación para los platos de comidas preparadas principalmente en el sector de la restauración colectiva, cuyo objeto es el de prevenir los riesgos asociados a las prácticas inadecuadas durante la manipulación de los alimentos, que puedan influir negativamente en su inocuidad.

Bajo el ámbito de la restauración colectiva, el presente Real Decreto define como comida preparada a la *«elaboración culinaria resultado de la preparación en crudo o del cocinado o del precocinado, de uno o varios productos alimenticios de origen animal o vegetal, con o sin la adición de otras sustancias autorizadas y, en su caso, condimentada. Podrá presentarse envasada o no y dispuesta para su consumo, bien directamente, o bien tras un calentamiento o tratamiento culinario adicional»*; dirigidas a las colectividades, dígase el *«conjunto de consumidores con unas características similares que demandan un servicio de comidas preparadas, tales como escuela, empresa, hospital, residencia y medio de transporte»*.

Actualmente, España no posee una legislación que establezca los criterios microbiológicos específicos para platos de ensaladas vegetales. Inicialmente, el presente Real Decreto contaba con los apartados 11 y 12 (Capítulo 6) que establecían los criterios microbiológicos para diferentes clasificaciones de comidas preparadas entre las que se incluían las comidas preparadas envasadas a base de vegetales crudos (conocido como grupo D). Como bien se conoce, ambos apartados fueron derogados por el actual Real Decreto 135/2010; no obstante no se descarta la posibilidad que algunas empresas agroalimentarias aún los utilicen como referencia para el control

de la calidad higiénico-sanitaria de sus productos. Por eso consideramos oportuno mencionarlos en la siguiente Tabla 9:

TABLA 9. Criterios microbiológicos estipulados por el RD 3484/2000 aplicables a las ensaladas de IV Gama (derogados por el Real Decreto 135/2010)

Microorganismos Indicadores	Día de fabricación		Día de caducidad	
Recuento total de <i>AEM</i>	n=5 m=10 ⁵	c=2 M=10 ⁶	n=5 m=10 ⁶	c=2 M=10 ⁷
Testigo de falta de higiene				
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)			n=5 m=10 ¹	c=2 M=10 ²
Patógenos				
<i>Salmonella</i>			n=5 Ausencia en 25 g	c=0
<i>L. monocytogenes</i>			n=5 m=10 ¹	c=2 M=10 ²

2.5.2. REGLAMENTO (CE) 2073/2005 RELATIVO A LOS CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS APLICABLES A LOS PRODUCTOS ALIMENTICIOS

El Reglamento (CE) 2073/2005 establece los criterios microbiológicos relacionados a la aceptabilidad higiénica de algunos productos alimenticios, y procesos de producción a nivel comunitario. El siguiente recuadro detalla los criterios afines con los productos cárnicos y frutas y hortalizas RTE (Tabla 10):

TABLA 10. Criterios microbiológicos aplicables a los alimentos listos para el consumo (Reglamento (CE) 2073/2005)

Criterios de seguridad alimentaria				
Categoría de alimento	Microorganismo, toxinas y metabolitos	Plan de Muestreo y Límites	Fase en la que se aplica el criterio	Método Analítico de referencia
Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales:	<i>Listeria monocytogenes</i>	n=5 c=0 100 ufc/g ⁽¹⁾	Producto comercializado durante su vida útil	EN/ISO 11290-2
		n=5 c=0 Ausencia en 25g ⁽²⁾	Antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido	EN/ISO 11290-1
Frutas y Hortalizas troceadas (listas para el consumo)	<i>Salmonella</i>	n=5 c=0 Ausencia en 25 g	Producto comercializado durante su vida útil	EN/ISO 6579
Criterio de higiene de los procesos				
Frutas y Hortalizas troceadas (listas para el consumo)	<i>E. coli</i>	n=5 c=2 m=100 ufc/g M=1000 ufc/g	Proceso de elaboración ⁽³⁾	ISO 16649-1 o 2

Donde: **n** = número de unidades que componen la muestra; **c** = número de unidades de la muestra con valores superiores a m o comprendidos entre m y M; **m** = valor umbral del nº de bacterias. El resultado se considerará satisfactorio si todas las unidades que componen la muestra tienen un nº de bacterias menor o igual a m; **M** = valor límite del nº de bacterias. El resultado se considerará no satisfactorio si una o más unidades de la muestra tienen un nº de bacterias igual o superior a M.

⁽¹⁾ Este criterio se aplica si el fabricante puede demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante su vida útil. El explotador podrá fijar límites intermedios durante el proceso que deberían ser lo suficientemente bajos para garantizar que no se supere el límite de 100 ufc/g al final de la vida útil.

⁽²⁾ Este criterio se aplica a los productos antes de que hayan abandonado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria cuando este no pueda demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante su vida útil.

⁽³⁾ En caso de resultados insatisfactorios, la acción correctora consistirá en mejorar la higiene de la producción y la selección de las materias primas.

GUÍAS ORIENTATIVAS

Las guías orientativas son otras de las herramientas creadas con el propósito de instruir acerca de la calidad higiénica y sanitaria de los alimentos. Estas directrices no tienen prioridad sobre los criterios microbiológicos establecidos a nivel internacional o nacional, pero se elaboran como complemento de las normas legales vigentes y se caracterizan por proporcionar indicaciones más detalladas respecto a la seguridad microbiológica de los alimentos. A nivel europeo e internacional, se reconocen numerosos documentos orientativos, entre las que podemos mencionar:

- ✓ Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods placed on the market. (Health Protection Agency, UK (HPA, 2009)
- ✓ Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat foods sampled at the point of sale.(Communicable Disease Public Health, 2000)
- ✓ Microbiological guidelines for ready-to-eat-foods. (Center for food Safety; Hong Kong, 2007)
- ✓ Guidelines for interpretation of results of microbiological analysis of some ready-to eat-foods sampled at point of sale. (Food Safety Authority of Ireland, 2001).
- ✓ Guidelines for the microbiological examination of ready-to-eat foods (Food Standards Australia-New Zealand (FSANZ, 2001).
- ✓ Microbiological quality guide for ready-to-eat foods. A guide to interpreting microbiological results. (NSW Food Authority, 2009).

A modo de ejemplo utilizaremos las propuestas establecidas en the Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods placed on the market. De forma general la guía enfatiza en la importancia de la seguridad alimentaria y en la utilización de los criterios microbiológicos como respaldo a las buenas prácticas de higiene y los sistemas de APPCC.

La siguiente Tabla 11 detalla los límites microbiológicos establecidos para *Staphylococcus aureus* en alimentos RTE. La guía sugiere que los microorganismos como las *Enterobacterias*, *E. coli* y *Listeria* sp (no *L. monocytogenes*) deben ser considerados indicadores de higiene de determinados alimentos RTE, no obstante indica que los límites orientados para *Enterobacterias* no deben ser aplicados a frutas frescas, ensaladas vegetales u otros tipos de alimentos que los contengan como ingredientes, ya que constituyen la flora normal de estos alimentos.

TABLA 11. Límites microbiológicos e interpretación de *S. aureus* en alimentos RTE

Peligro	Resultado (ufc/g)	Categoría de riesgo microbiológico	Interpretación	Causa probable
<i>S. aureus</i> y otros <i>Staphylococcus</i> coagulasa-positivo	>10 ⁴	Alto	Insatisfactorio ⁽¹⁾	Inadecuada manipulación y control de la Temperatura
	desde 20 a ≤10 ⁴	Moderado	Límite ⁽²⁾	Inadecuada manipulación y control de la Temperatura
	<20	Bajo	satisfactorio	---

⁽¹⁾ En caso de resultados insatisfactorios los alimentos se consideran potencialmente peligrosos y por tanto no son aptos para el consumo. Acciones sugeridas: Revisar inmediatamente la manipulación de alimentos, así como el control del tiempo y la Temperatura. Investigar las muestras de alimentos, del ambiente de preparación de los alimentos y los manipuladores de alimentos.

⁽²⁾ Acciones sugeridas: Revisar la manipulación y el control del procesado, especialmente si existe posibilidad de crecimiento de *Staphylococcus* durante la manipulación. Considerar la investigación de toma de muestra de alimentos, del ambiente de preparación de los alimentos y los manipuladores de alimentos.

Para el caso de *E. coli*, expone los siguientes límites microbiológicos (Tabla 12):

TABLA 12. Límites microbiológicos e interpretación de *E. coli* en alimentos RTE.

Resultados	Interpretación	Causas probables
>10 ² ufc/g	Insatisfactorio ⁽¹⁾	Donde las causas probables de mayor contaminación están dadas por la falta de higiene en caso de alimentos cocidos, contaminación cruzada a partir de alimentos crudos especialmente los cárnicos, por los manipuladores de alimentos o superficies de contacto con los alimentos, así como por el control inadecuado del tiempo y la Temperatura.
desde 20 a ≤10 ² ufc/g	Límite ⁽²⁾	
<20 ufc/g	Satisfactorios	

⁽¹⁾ Acciones sugeridas: Revisar los procedimientos de cocción, y todos los procesos de higiene incluyendo la limpieza. Investigar muestras de alimentos y monitorización ambiental de los ambientes de preparación de alimentos.

⁽²⁾ Acciones sugeridas: Revisar los procedimientos de cocción, y todos los procesos de higiene incluyendo la limpieza. Considerar el muestreo de alimentos y monitorización ambiental de los ambientes de preparación de alimentos. Las acciones deben ser proporcionales a los niveles de contaminación.

Asimismo, puntualizan que los límites microbiológicos para *AEM* deben ser evaluados en alimentos de vida útil extendida que requieran de refrigeración y estén envasados en atmosfera modificada o al vacío. En este caso tenemos a algunos cárnicos, así como las frutas y vegetales de IV Gama, etc. (Tabla 13):

TABLA 13. Límites microbiológicos establecidos para *AEM* en alimentos RTE

Resultados (ufc/g)		
Satisfactorio	Límite	Insatisfactorio
$<10^6$	$10^6 - <10^8$	$\geq 10^8$ ⁽¹⁾

⁽¹⁾Se debe determinar el microorganismo predominante. Es insatisfactorio, si es $>10^6$ ufc/g para hongos; $>10^7$ ufc/g para Bacillus Gram negativos o *Bacillus* spp; $>10^8$ ufc/g para bacterias ácido lácticas

2.6. CALIDAD HIGIÉNICO-SANITARIA Y SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS PLATOS PREPARADOS RTE

2.6.1. PRINCIPALES GRUPOS MICROBIANOS QUE INFLUYEN SOBRE LA CALIDAD HIGIÉNICO-SANITARIA DE LOS ALIMENTOS

Como se ha puntualizado anteriormente, durante toda la cadena de producción y consumo existe una constante exposición de los alimentos a las contaminaciones microbianas. De modo que el control de la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos constituye otras de las medidas de seguridad alimentaria en vista a minimizar la incidencia de toxiinfecciones alimentarias.

Indudablemente para los establecimientos de restauración colectiva, el hecho de controlar la calidad higiénico-sanitaria de los platos preparados listos para el consumo permite evaluar las condiciones de salubridad bajo las cuales se llevó a cabo el proceso de preparación del producto, determinar los principales factores de riesgos y gestionar a tiempo las medidas más eficaces para reducir la contaminación por parte de microorganismos alterantes y patógenos.

Los microorganismos indicadores constituyen un grupo o especies microbianas que ponen de manifiesto las deficiencias en la calidad higiénico-sanitaria de un alimento. De hecho, los niveles elevados conducen al deterioro de los alimentos y a la consecuente reducción de su vida comercial; y probablemente estén relacionados con la presencia de microorganismos patógenos.

Según la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF), los microorganismos indicadores no ofrecen un riesgo directo para la salud humana; entre ellos se hallan los microorganismos mesófilos, termófilos, psicrótrofos, los hongos y levaduras, coliformes totales (*CT*), coliformes fecales (*CF*), enterococos, *Enterobacterias* y *E. coli* (Silva, 2007).

A continuación se detallan algunos de los microorganismos considerados indicadores de calidad higiénico-sanitaria de los alimentos:

2.6.1.1. *MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS*

Las especies que conforman este grupo son muy heterogéneas y se incluyen todas las bacterias, mohos y levaduras que crezcan bajo condiciones de aerobiosis. Por tanto la determinación de microorganismos aerobios mesófilos (*AEM*), indica las condiciones sanitarias de los alimentos durante la etapa de manipulación (Ray, 2004).

Los alimentos RTE (excepto los alimentos fermentados, quesos y otros derivados lácteos, etc.) con niveles significativos de *AEM* no deben ser considerados aptos para el consumo aún cuando los microorganismos no se hayan identificado como patógenos o no se aprecien cambios en las características organolépticas.

Generalmente, la contaminación se produce como consecuencia a la utilización de materias primas contaminadas o tratamientos sanitarios insatisfactorios así como por condiciones inadecuadas de tiempo y Temperatura de almacenamiento (Campos-Díaz, 2000; Caballero-Torres, 2008). La presencia de *AEM* en alimentos frescos demuestra la efectividad de los procedimientos sanitarios durante las etapas de procesado, manipulación y antes del almacenamiento (Ray, 2004).

En general, los niveles elevados suponen un mayor riesgo de contaminación por patógenos. Varios autores coinciden en que los valores recomendables para el caso de los alimentos RTE deben ser $<5 \log \text{ ufc/g}$ (Solberg y col., 1990; Shapton y Shapton, 1991; Jay, 1996). Sin embargo, los estudios demuestran que en ocasiones los niveles de contaminación por *AEM* superan este criterio en determinados alimentos. Por ejemplo, Azanza (2004) y Seng y Badji (1993) detectaron recuentos $\geq 5 \log \text{ ufc/g}$ en productos cárnicos cocidos de cerdo y pollo; mientras que Ayçiçek y col. (2004) determinaron niveles de hasta $7,4 \log \text{ ufc/g}$ en vegetales para ensaladas.

2.6.1.2. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las Bacterias Ácido Lácticas (*BAL*), son bacterias que comprenden un grupo amplio de microorganismos con características morfológicas, metabólicas y fisiológicas comunes. Los géneros más comunes son *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Lactococcus*, etc (Parra–Huertas, 2010).

En la industria alimentaria tienen múltiples utilidades como cultivos iniciadores en la fabricación de quesos, yogures, carnes fermentadas, etc; además por su acción antimicrobiana. Varios estudios resaltan su papel en la bioconservación de los alimentos a partir de la inhibición del crecimiento de microorganismos causantes del deterioro como *Leuconostoc mesenteroides* o *Brochothrix thermosphacta*, (Vermeiren y col., 2006) o de patógenos (Holzapfel y col., 1995; Bredholt y col., 1999; Özkaya y col., 2007). En los productos cárnicos, representan la flora predominante alcanzando niveles entre 8–9 log ufc/g e intervienen en los procesos de maduración (Hammes y col, 1990). Las especies más comunes son *Lactobacillus sakei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. pentosus*, *Pediococcus acidilactici* y *P. pentasaceus* (Geisen y col., 1992).

A pesar de su función protectora, éstos son capaces de producir metabolitos finales que conllevan al deterioro del alimento y por tanto al acortamiento de su vida útil, cuando son sometidos a determinadas condiciones, entre las que se citan las Temperaturas de almacenamiento, la composición del alimento y los métodos de envasado (Borch y col., 1996). Así, el deterioro causado por el crecimiento de *BAL* se manifiesta en cambios indeseables en el olor, sabor, color y producción de gases. Algunos estudios han presenciado estos cambios en los productos cárnicos envasados al vacío, en atmósfera modificada, etc. (Samelis y col., 2000; Cayré y col., 2003; Nychas y col., 2008).

2.6.1.3. *ENTEROBACTERIAS*

Las *Enterobacterias* se consideran microorganismos indicadores de calidad higiénica y entre ellas se destaca *E. coli* como indicador de contaminación fecal. Generalmente, la presencia de estos microorganismos en alimentos RTE está estrechamente vinculada con la aplicación de prácticas de manipulación inadecuadas, procesos de cocción ineficientes, contaminación cruzada, inadecuada higiene personal de los manipuladores y de los equipos y superficies de trabajo e inadecuado control del tiempo y la Temperatura de almacenamiento (Brum, 2004).

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son bacterias mayoritariamente Gram negativas, aerobias o anaerobias facultativas, no esporuladas, móviles o inmóviles, fermentadoras de la glucosa y reductoras del nitrato a nitrito. Dentro del grupo se incluyen los géneros *Salmonella* sp, *Shigella* sp, *Yersinia* sp (patógenos intestinales en el humano), *Edwarsiella* sp, *Hafnia* sp, *Proteus* sp, *Providencia* sp, *Morganella* sp, *Erwinia* sp, *Escherichia* sp, *Enterobacter* sp, *Citrobacter* sp, *Serratia* sp y *Klebsiella* sp. La gran mayoría de ellos son productores de endotoxinas y exotoxinas termolábiles y/o termoestables, destacándose los géneros *Shigella* sp y *E. coli* sp, por su producción de verotoxinas o toxinas shiga, reconocidas por su alta morbilidad y letalidad para el humano. Asimismo, se consideran responsables del 30-35% de los casos de septicemias producidas en el humano, de mas del 70% de todas las infecciones del tracto urinario, así como de numerosas infecciones intestinales (Díaz-Campos, 2000).

Las toxiinfecciones alimentarias producidas por las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* se vinculan a un amplio grupo de alimentos. Por ejemplo, se les asocia con productos cárnicos procesados (Al-Mutairi y col., 2011); con fórmulas alimenticias para lactantes (Gurtler y col., 2005; Shaker y col., 2007); y con ensaladas mixtas, vegetales crudos, leche, productos lácteos, entre otros, entre los que se han visto implicados los género *Shigella* sp, *Escherichia* sp, etc. (Warren y col., 2006).

2.6.1.4. COLIFORMES TOTALES Y FECALES

Bajo la denominación de coliformes se agrupan principalmente los géneros *Escherichia* sp, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp y *Citrobacter* sp, entre otras enterobacterias. Éstos son bacilos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, cuya Temperatura óptima de crecimiento es de 35°C aproximadamente. Forman parte del grupo de microorganismos indicadores de calidad higiénico-sanitaria de los alimentos ya que involucra a bacterias cuyo hábitat natural es el intestino del hombre y de los animales de sangre caliente, así como otros microorganismos localizados frecuentemente en el suelo o los vegetales.

Los coliformes se dividen en coliformes fecales o termotolerantes (*CF*) y coliformes totales (*CT*) y se diferencian entre ellos porque los *CF* fermentan la lactosa a Temperaturas entre 44–45°C. Dentro del grupo, incluye principalmente a *E. coli* (más del 90%) junto a ciertas especies de *Klebsiella* y *Citrobacter*. Los coliformes se consideran el indicador más adecuado de contaminación fecal y en ocasiones son hallados en los equipos y utensilios de trabajo como consecuencia a la contaminación cruzada, así como en una amplia variedad de alimentos (pescados, mariscos, carnes, leche, alimentos listos para el consumo, etc.), lo cual se traduce como un posible riesgo de contaminación por otros patógenos entéricos.

La contaminación de los alimentos RTE por coliformes, comúnmente se atribuye a una contaminación procedente del ambiente, la utilización de prácticas de higiene inadecuadas y/o insuficiente control de la Temperatura de almacenamiento. Para el caso de los alimentos tratados térmicamente, la presencia de coliformes es indicativa de un tratamiento inadecuado o una contaminación post-procesado, puesto que son microorganismos termolábiles que se destruyen por la acción del calor (Ray, 2004; Montville y Matthew, 2009).

2.6.2. *ESCHERICHIA COLI*

Escherichia coli es el microorganismo anaerobio facultativo más común en el tracto gastrointestinal del hombre y la mayoría de los animales. Se identificó inicialmente en 1885 en la flora intestinal de los niños, por un pediatra alemán llamado Theodore Escherich, de ahí su nombre. En 1892, Shardingger propuso el uso de *E. coli* como indicador de contaminación fecal, basándose en el predominio del microorganismo en las heces animales y humanas, no así en otros ambientes. Además podía ser fácilmente detectable por su habilidad de fermentar la lactosa y su aislamiento respecto a otros patógenos intestinales. Por lo tanto, la presencia de *E. coli* en los alimentos y el agua fue aceptada como signo manifiesto de la posible presencia de patógenos oportunistas.

La presencia de *E. coli* en alimentos crudos es considerado un indicador directo o indirecto de contaminación fecal (Renata, 2010). La contaminación directa se produce durante el procesado de los alimentos crudos de origen animal y debido a inadecuadas prácticas de higiene del personal manipulador de los alimentos, como se ha mencionado anteriormente, mientras que la contaminación indirecta puede ocurrir a través del agua de lavado o las aguas residuales.

Si bien la mayoría de las cepas de *E. coli* no son consideradas agentes patógenos, algunas sí actúan como patógenos oportunistas causando considerables daños sobre todo en personas inmunodeprimidas, niños o ancianos (Gassama y col., 2001). La mayoría de las cepas de *E. coli* provocan enfermedades entéricas en el humano, pero éstas se dividen en diferentes tipos patógenos de acuerdo con su virulencia y los mecanismos que intervienen en el proceso infeccioso (Donnenberg y Whittam, 2001; Robins-Browne y Hartland, 2002). Así, se clasifican en 5 grupos principales: *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* Enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* Enteropatogénica (EPEC) (Bugarel y col., 2011):

- ✓ ETEC: Las cepas enterotoxigénicas como su nombre lo indica producen toxinas termoestables y/o termolábiles que actúan en el intestino delgado. Son muy conocidas por producir la diarrea del viajero. Su período de incubación oscila entre 8–44h con una media de 26h y se caracteriza por síntomas como náuseas, dolor abdominal moderado y diarrea, tras la ingestión de agua y alimentos contaminados. Los serogrupos más comunes incluyen O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O80, O114, O115, O128AC, O148, O153, O159 y O167, entre otros (Mossel y col., 2003).
- ✓ EIEC: Producen una enfermedad más grave, a menudo acompañada de diarreas sanguinolentas (disentería). Son bacilos inmóviles y la mayoría son anaerobias, así como fermentadoras tardías de la lactosa. Los serogrupos principales son O28ac, O29, O112, O124, O136, O143, O144, O152, O164 y O167.
- ✓ EAEC: Están relacionadas con fenómenos de diarrea profusa en bebés y niños. No forman enterotoxinas, pero se diferencian del resto de *E. coli* por un característico patrón de adherencia a las células del epitelio intestinal, mediante fimbrias, de forma agregativa en las célula HEp-2 (Caballero-Torres, 2008; Montville y Matthews, 2009).
- ✓ EHEC: Este serogrupo está implicado con numerosos brotes de toxiinfecciones alimentarias en muchos países desarrollados y se caracteriza por producir procesos infecciosos que ocasionan complicaciones severas como colitis hemorrágica y espasmos abdominales. Además, transcurre con el llamado síndrome urémico hemolítico (HUS) y cuadros de púrpura trombocitopénica. Estas cepas producen potentes citotoxinas como las toxinas shiga (Stx), llamadas así por su relación con la toxina de *Shigella dysenteriae*, y las verotoxinas. Su factor de virulencia está determinado por la producción de factores de adherencia, de citotoxinas y enterohemolisinas, y la capacidad para transportar hierro y producir lesiones de adherencia y esfacelamiento con destrucción de las microvellosidades del epitelio intestinal. Actualmente,

el serotipo más peligroso es *E. coli* O157:H7 y O157:H₇ que están muy asociados a enfermedades de origen alimentario. Los humanos pueden adquirir la enfermedad por el consumo de agua y alimentos contaminados (como carne de vacuno, de cerdo y pollo, hamburguesas, vegetales frescos, leche etc.), por la transmisión directa de persona a persona o a partir de animales infectados (Meng y Doyle, 1998; Roldán y col., 2007, Caballero-Torres, 2008). En el año 2010, este serotipo fue responsable de 4,000 casos de toxiinfecciones alimentarias en la Unión Europea, lo cual representó un 12% más de las producidas en el año 2009; donde los niños de 0–4 años (1.161 casos) y de 5–14 años (>40 casos) fueron los más afectados (EFSA, 2012).

Sin embargo, a nivel mundial la prevalencia de infecciones por otros serogrupos de EHEC no O157, están siendo considerablemente subestimadas. Actualmente en el continente europeo, Australia y Latinoamérica, los casos por EHEC no O157:H7 son muy frecuentes (Montville y Matthews, 2009); prueba de ello fueron los brotes de toxiinfecciones alimentarias notificados en Alemania el pasado año, tras el consumo de brotes germinados, pepinos, lechuga entre otros vegetales contaminados con *E. coli* O104:H4; aunque previamente su incidencia se notificó en Asia y los Estados Unidos. La incidencia de las cepas Enterohemorrágicas varían de un país a otro, por ejemplo en Europa los serogrupos más frecuentes además de O157:H₇ son O26, O103, O111, O145 (Mossel y col., 2003).

✓ EPEC: Las EPEC se conocen desde 1940, y representan la principal causa de diarrea infantil en países desarrollados (Gomes y col., 1989, 1991; Nataro y Kaper, 1998). En los Estados Unidos, el primer brote por EPEC se notificó en 1971 tras el consumo de quesos contaminados importados desde Francia que afectó a más de 300 personas (Marier y col., 1973). Rowe y col. (1974) identificaron el serogrupo O158 tras un brote de enteritis en niños originado en una guardería. Éstas se caracterizan por producir diarreas acuosas que pueden llegar a ser profusas, acompañadas de fiebre, malestar

general y vómitos (Levine, 1987); asimismo provocan la destrucción de las micro-vellosidades tras su adherencia y esfacelamiento (A/E) a la mucosa intestinal (Caballero-Torres, 2008; Montville y Matthews, 2009). El hombre es el principal reservorio de EPEC y los serogrupos que más le afectan son O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128a y b, O142 y el O158.

En comparación con los rotavirus, las diarreas que producen pueden tener un curso más violento (Robin-Browne y col., 1980; Gomes y col., 1989); y pueden conllevar a la muerte ya que presentan un índice de mortalidad superior al 30% (Levine y Edelman, 1984; Senerwa y col., 1989). Por ejemplo, en Brasil, las diarreas son la causa de muerte de 200.000 niños al año, donde las EPEC representan una de las principales causas (Gomes y col., 1989, 1991; Mangia y col., 1993).

En la actualidad, los estudios científicos referentes estos a serogrupos Enteropatógenos de *E. coli* en alimentos son escasos. Es por ello, que la actual Tesis sirve de base científica para caracterizar el comportamiento de una cepa EPEC (*E. coli* O158:H23) en caldo de cultivo y en lechuga de IV Gama (Publicaciones 4 y 5, de la presente Tesis).

2.6.3. *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

En el sector de la restauración colectiva, *S. aureus* es considerado un microorganismo indicador de higiene durante la manipulación de alimentos. Su repercusión a nivel mundial se debe a la producción de enterotoxinas termoestables que se producen como consecuencia de su capacidad de crecimiento en una amplia variedad de alimentos y supervivencia en determinados ambientes adversos.

El ser humano es el principal reservorio de *S. aureus* y su propagación al ambiente y los alimentos se produce a partir de las manos, la piel, la boca y las fosas nasales de los manipuladores, si bien es cierto que el material de trabajo (cuchillo, tablas de corte, etc.), los equipos, o las superficies de trabajo contaminadas, también pueden

actuar como vehículos de transmisión de *S. aureus* hacia los alimentos (Sneed y col., 2004; Pérez-Rodríguez y col., 2007; DeVita y col., 2007).

S. aureus es una bacteria Gram positiva, que tiene la habilidad de crecer y producir enterotoxinas bajo condiciones muy variadas de Temperatura (7–48,5°C), de pH (4–10), de concentraciones de cloruro sódico (NaCl) de hasta un 25%; incluso de adaptarse a diferentes condiciones de estrés (Cebrián y col., 2010).

La intoxicación en el humano se produce por la ingestión de alimentos contaminados con dosis muy bajas (20–100ng) de enterotoxinas termoestables (Asao y col., 2003; Scherrer y col., 2004) producidas cuando la población estafilocócica se ha multiplicado hasta niveles del orden de 6 log ufc/g ó ml (Notermans y Heuvelman, 1983). La enfermedad cursa con síntomas como vómitos violentos, diarreas profusas, dolor abdominal y náuseas (Murray y col., 2002; Prescott y col., 2005), aunque rara vez produce la muerte.

No todas las cepas de *S. aureus* son capaces de producir enterotoxinas, como sucede con las cepas coagulasa negativas, aunque existen excepciones (Mossel y col., 2003). Hasta el momento se reconocen 21 tipos de enterotoxinas estafilocócicas (SE) o proteínas parecidas a las enterotoxinas (enterotoxin-like-proteins (SEL), aunque la mayoría de toxiinfecciones alimentarias están asociadas con las enterotoxinas A y D, destacándose la A como la causa más común (Thomas y col., 2006; Cha y col., 2006; Schlievert y Case, 2007; Kérouanton y col., 2007; Schelin y col., 2011). Las toxiinfecciones alimentarias producidas por enterotoxinas estafilocócicas representan en torno al 45% de las acontecidas a nivel mundial (Cunha Neto y col., 2002); y en la Unión Europea, en el año 2008 representaron la cuarta causa más común (EFSA, 2012) ocasionando un total de 5,550 brotes y alrededor de 49,000 personas afectadas. Con frecuencia se les asocia con alimentos ricos en proteínas como los productos lácteos, pescados y mariscos y los cárnicos que han recibido una extensa manipulación (Atanassova y col., 2001; Pepe y col., 2006; Fujikawa y Morozumi, 2006; Simon y Sanjeev, 2007), combinada con inadecuados tratamientos térmicos y/o

inadecuadas Temperaturas de almacenamiento (Le Loir y col., 2003; Smyth y col, 2004).

Numerosos autores han hecho referencia a este microorganismo por su capacidad de adaptación a diversos ambientes. La presente Tesis expone uno de los pocos estudios que evalúa la influencia de las condiciones de pre-incubación en caldo de una cepa enterotoxigénica de *S.aureus*, en su comportamiento posterior en un producto cárnico cocido RTE (fiambre de pollo cortado en lonchas) (Publicación 6).

2.6.4. MICROORGANISMOS PATÓGENOS

Actualmente se conocen más de 200 enfermedades transmitidas por los alimentos producidas por bacterias, virus, hongos, toxinas, parásitos, protozoos, priones, etc. (Mead y col., 1999). En el año 2010, en la Unión Europea se notificaron 5,262 brotes de toxiinfecciones alimentarias que afectaron a un total de 43,473 personas. En este caso los principales agentes etiológicos fueron las bacterias (50%) seguidas de los virus (15%), las toxinas bacterianas (9%), los parásitos (0,6%), entre otros (EFSA, 2012). A continuación, la Tabla 14 muestra los principales patógenos emergentes que se vincularon con los brotes acontecidos:

TABLA 14. Número de brotes de toxiinfecciones alimentarias relativos a algunos patógenos notificados en Europa en el año 2010.

Agentes etiológicos	No. de brotes	%
<i>Salmonella</i>	1,604	30,5
<i>Campylobacter</i>	470	8,9
<i>S. aureus</i> enterotoxigénico	274	5,2
<i>Bacillus cereus</i>	99	1,8
<i>Clostridium</i>	88	1,7
Otros agentes bacterianos ⁽¹⁾	64	1,1
<i>E. coli</i> patogénico	31	0,6
Total	2,630	50,0

⁽¹⁾Incluye los géneros *Brucella*, *Listeria*, *Shigella* y *Yersinia* (Elaboración propia y datos tomados de EFSA, 2012).

2.6.4.1. *SALMONELLA*

Los alimentos RTE no deben estar contaminados por *Salmonella*, porque su ingestión es una causa segura de toxiinfecciones alimentarias. *Salmonella*, es reconocida en todo el mundo como uno de los patógenos más comunes causantes de gastroenteritis tras el consumo de alimentos contaminados (Wegener y col., 2003; Forshell y Wierup, 2006). Dentro del grupo, *S. typhimurium* y *S. enteritidis* se identifican como los que afectan con mayor frecuencia al humanos (Prendergast y col., 2008; Fashae y col., 2010; Hendriksen y col., 2011). La enfermedad se caracteriza por un cuadro agudo de fiebre, dolor abdominal, náuseas y vómitos. Las principales vías de transmisión son a través del consumo de carne de pollo y las carnes rojas contaminadas, leche y sus derivados, frutas, vegetales, huevos, etc. (Caballero-Torres, 2008); producto a la cocción inadecuada de los alimentos, a un periodo de enfriamiento lento, al mantenimiento prolongado a Temperatura ambiente, al insuficiente recalentamiento y la contaminación cruzada. Asimismo, los manipuladores enfermos o portadores asintomáticos pueden producir contaminación por *Salmonella* en alimentos (Campos-Díaz, 2000; Borowsky y col., 2007). En la Unión Europea, se notificaron 99,020 casos en humanos en el año 2010 (EFSA, 2012). En los Estados Unidos, se estima que cada año enfermen por salmonelosis alrededor de 1,4 millones de personas (OMS, 2005) y según Majowicz y col. (2010), en Asia son responsables de alrededor de 37,600 muertes anuales.

2.6.4.2. *BACILLUS CEREUS*

Bacillus cereus, es una bacteria Gram positiva, que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Las esporas de *B. cereus* no muestran una resistencia especial al calor, pero poseen una resistencia elevada frente a algunos métodos de conservación como las radiaciones y las desinfecciones. La intoxicación se produce tras la ingestión de alimentos contaminados en los que el microorganismo ha sido capaz de crecer y alcanzar niveles $>5 \log \text{ ufc/g}$ (Tallent y col., 2001) y de sintetizar dos tipos de enterotoxinas (diarréica y emética) que producen síndromes como

náuseas y vómitos repentinos, diarreas y dolores abdominales (menos frecuentes), muy similares a los que producen las intoxicaciones por *S. aureus* o por *Clostridium* (Tauxe, 2000). Los procedimientos inadecuados de higiene y elaboración de los alimentos; y los tratamientos de cocción o almacenamiento indebidos, convierten a este microorganismo en un peligro potencial para la salud humana (Tallent y col., 2001). La incidencia de *B. cereus* en alimentos es muy amplia, aunque es muy frecuente su aislamiento de productos como las cremas, postres, productos cárnicos, vegetales, así como de la leche y productos lácteos y cereales o alimentos ricos en almidón (Downes y Ito, 2001; Lindback y col., 2004; Granum, 2005).

2.6.4.3. *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Listeria monocytogenes, es un microorganismo psicrotrofo capaz de crecer rápidamente a Temperaturas de refrigeración en alimentos contaminados (Koseki e Isobe, 2005) y crece en un amplio rango de Temperaturas, pH y a_w . Es responsable de infecciones oportunistas y se incluyen a las embarazadas, a los bebés y los ancianos como la población de riesgo. Los principales síntomas son meningitis, encefalitis, bacteriemias o abortos. La mortalidad en adultos es elevada pudiendo llegar a situarse en torno al 33-62% (Nollas, 2002). En la Unión Europea se notificaron 1,601 casos en humanos en 2010 (EFSA, 2012), mientras que en Estados Unidos este microorganismo es responsable de alrededor de 2,500 enfermos y 500 muertes cada año (CDC, 2003). Debido a su naturaleza ubicua, *L. monocytogenes* se ha aislado de alimentos RTE como quesos fabricados con leche cruda, pescado frío ahumado, productos cárnicos fermentados, ensaladas preparadas (Ray, 2004) y en ambientes de elaboración, procesado y almacenamiento de alimentos (Miettinen y col., 1999; Samelis y Metaxopoulos, 1999; Kabuki y col., 2004).

2.6.4.4. *CAMPYLOBACTER*

Las bacterias del género *Campylobacter* sp se relacionan frecuentemente con numerosos casos de gastroenteritis, especialmente en niños, donde *C. jejuni* es una de las especies comúnmente asociadas con las enfermedades en el humano, seguida

por *C. coli* y *C. lari*. La sintomatología consiste en la aparición de diarreas desde acuosas hasta sanguinolentas, dolor abdominal, fiebre y dolor de cabeza. Una de las vías principales de transmisión son los alimentos crudos o mal cocinados, o mediante la contaminación cruzada de los alimentos provocada por el uso de tablas de corte, cuchillos y otros utensilios de cocina (Gill y Harris, 1984). La carne de pollo es uno de los alimentos más implicados, aunque también se han evidenciado en leche cruda y productos lácteos, pescados, vegetales frescos etc. En el año 2008, en la Unión Europea, se notificaron un total de 212.064 casos de Campilobacteriosis en humanos (EFSA, 2010).

2.6.4.5. *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

La contaminación por *C. perfringens* se produce por el mantenimiento prolongado de los alimentos a Temperaturas de abuso, o bajo períodos de enfriamientos muy lentos que tienen lugar tras finalizar un tratamiento de cocción (Campos-Díaz, 2000). En ocasiones se utiliza como indicador de higiene durante la manipulación de los alimentos, debido a la presencia de esporas en el suelo y polvo (Pascual-Anderson, 1989). Los alimentos implicados en los brotes de toxiinfecciones alimentarias por *C. perfringens*, incluyen los cárnicos RTE o parcialmente cocidos, los productos cárnicos de aves de corral (Golden y col., 2009), las carnes recalentadas, empanadas, salsas, pasta de pescado, pollo etc. y de modo muy especial, los platos precocinados y las carnes asadas (Campos-Díaz, 2000).

2.6.5. CALIDAD HIGIÉNICO-SANITARIA DE LOS PLATOS PREPARADOS RTE

El análisis microbiológico de los alimentos listos para el consumo representa una medida de evaluación de los procedimientos de higiene y de manipulación de los alimentos en las etapas previas a su consumo, que a su vez sirve de ayuda para identificar y corregir los posibles factores de riesgos de contaminación microbiana.

Cada año, se notifican un número considerable de toxiinfecciones alimentarias procedentes de los hogares (Gorman y col., 2002; Scott, 2003) y los establecimientos de restauración (Gilliespie y col., 2000; Michino y Outsuki, 2000; Brasil, 2005; Meldrum y col., 2009a) en todo el mundo. Sin embargo, el sector de la restauración colectiva puede estar mayormente implicado, en parte por los grandes y variados volúmenes alimentos que preparan diariamente y por los posibles factores de riesgo de contaminación microbiana que pueden que se vinculan a las etapas de preparación y servicio de alimentos. Según un informe aportado por EFSA (2012), de los brotes acontecidos en Europa en el año 2010, más del 40% de las notificaciones estuvieron asociadas con los establecimientos de restauración colectiva. Además, desde el punto de vista de la salud pública es un sector que merece especial atención teniendo en cuenta que brinda sus servicios a un grupo muy heterogéneo de consumidores.

Sobre esta base, numerosos autores han evaluado la calidad higiénico-sanitaria de los platos preparados en los establecimientos de restauración colectiva, y especialmente de aquellos alimentos que se destinan a sectores de población más susceptible. Algunos de ellos ponen de manifiesto los recuentos elevados de *AEM* (>5 log cfu/g), CT (>3 log cfu/g), *S. aureus* coagulasa positivos (>3 log cfu/g) o presencia de patógenos como *E. coli* O157:H7, *B. cereus* y *Cronobacter sakazakii* en platos preparados a base de vegetales, pescados, arroces, huevos, legumbres y postres (Tessi y col., 2002; Santana y col., 2009; Rabbi y col., 2011; Ryu y col., 2011).

Otros estudios realizados a nivel nacional proceden en muchas ocasiones de organismos de salud pública dependientes de las distintas Comunidades Autónomas. Pérez-Silva y col. (1998) compararon la calidad higiénico-sanitaria de los platos preparados (pastas, arroces y alimentos compuestos por huevo) en varios comedores colectivos de Madrid. En el estudio detectaron que los alimentos servidos en los comedores, presentaban mayores niveles de contaminación por *AEM* (48,9%), mientras que en las guarderías (42,9%) y residencias geriátricas (46,2%)

predominaron los microorganismos indicadores de higiene como *E. coli*, *S. aureus* y *C. perfringens*. Asimismo, detectaron la presencia de microorganismos psicrótrofos en todas las muestras, probablemente debido a deficiencias en los periodos de almacenamiento. Por su parte, Arrans y col. (2002), analizaron 319 muestras de platos preparados en diferentes hoteles, restaurantes y bares de Andalucía. Los resultados revelaron que el 87,5% del total de muestras analizadas estuvieron contaminadas por *Enterobacterias*, el 62,8% por *AEM* y el 29,3% por patógenos como *C. perfringens* (18,2%) y *Salmonella* (2,3%); donde las ensaladas (48%), el arroz/pasta (41%) y las frituras/asados (36%) fueron los platos preparados más contaminados. Pedregal y col. (2002) evaluaron la calidad higiénico-sanitaria de los platos preparados (36 muestras) en 90 comedores colectivos de la provincia de Albacete. Los resultados evidenciaron un porcentaje elevado de muestras contaminadas (88,9%) que se correspondieron con los platos calientes (85,2%) y los platos fríos (100%), con microorganismos como *AEM* (80,5%), *Enterobacterias* (61%), microorganismos psicrótrofos (100% de los platos servidos en frío) y coliformes (11%). *E. coli* y *C. perfringens* se aislaron de los platos servidos en caliente, mientras que >20% de las muestras de los platos fríos estuvieron contaminadas con *S. aureus*.

2.6.5.1. CALIDAD HIGIÉNICO-SANITARIA DE LOS PLATOS DE ENSALADA RTE

En cuanto a las ensaladas vegetales de IV Gama, debido a su vínculo con un número considerable de brotes, son reconocidas como unos de los principales vehículos de patógenos entéricos (Little y Gillespie, 2008), lo cual justifica su estudio desde el punto de vista de la seguridad alimentaria. En la Tabla 15, se muestran diferentes brotes de toxiinfecciones alimentarias ocurridos en Europa y Estados Unidos, relacionados con el consumo de ensaladas de lechuga u otros vegetales contaminados. De entre los estudios realizados a nivel de restauración colectiva, podemos destacar el de Martínez-Tomé y col. (2000), quienes determinaron la calidad higiénico-sanitaria de las ensaladas vegetales preparadas y servidas en varios

comedores escolares españoles. Los platos de ensaladas listos para el consumo, presentaron niveles de microorganismos psicrótrofos entre 2,5–3,8 log ufc/g, y de *Enterobacterias* <2 log ufc/g. También analizaron por separado las muestras de lechuga, tomate y zanahoria, para comprobar los procedimientos de higiene y de desinfección de los ingredientes antes de su combinación final y detectaron un predominio de *Enterobacterias* y de *AEM* con niveles >5 log ufc/g. Como conclusión, enfatizaron en la importancia de la formación del personal manipulador, las medidas adecuadas de higiene y de desinfección y las prácticas de manipulación, sobre las características microbiológicas de los platos de ensalada. Otro estudio de Abadias y col. (2008) evaluó la calidad higiénico-sanitaria de diferentes vegetales frescos, frutas y vegetales mínimamente procesados, y de brotes, procedentes de varios establecimientos de venta al detalle de la provincia de Cataluña, durante los años 2005–2006. Los resultados indicaron que entre los vegetales frescos cortados para ensaladas, las zanahorias ralladas, la rúcula y las espinacas presentaron los niveles de contaminación más altos en ese mismo orden, por *AEM* (7,4–7,8 log ufc/g), mohos y levaduras (entre 5,2–6,1 log ufc/g), *BAL* (entre 4–5,9 log ufc/g) y *Enterobacterias* (entre 5,3–6,2 log ufc/g) y le siguieron las endivias y las lechugas con aunque con niveles de contaminación más bajos. Otros estudios han indicado la presencia de patógenos como *Salmonella* o *L. monocytogenes* en vegetales frescos y de IV Gama, aunque la prevalencia suele ser baja (1–4%) (De Giusti y col., 2010; Oliveira y col. 2011).

2.6.5.2. CALIDAD HIGIÉNICO-SANITARIA DE LOS PLATOS DE CÁRNICOS COCIDOS RTE

Los productos cárnicos cocidos RTE son alimentos potencialmente vulnerables a la contaminación microbiana (Matagaras y col., 2003). Pese a recibir tratamientos térmicos durante el procesado, están sujetos a determinadas prácticas de manipulación durante la etapa de preparación en los establecimientos de restauración o venta que influyen de manera significativa en la recontaminación del producto; causa por la cual es muy probable el deterioro y/o la vehiculación de

patógenos emergentes (Papadopoulou y col., 2012). Una de las principales causas de deterioro de productos envasados en anaerobiosis es el crecimiento de *BAL*. Las *BAL* se caracterizan por crecer en alimentos refrigerados y el deterioro se manifiesta a través de la alteración física, sensorial (agriado, viscosidad, exudación etc.) y la producción de gases que con frecuencia producen el abombamiento del envase antes de la fecha de caducidad del producto (Devlieghere y col., 2000). La literatura científica se refiere a los géneros *Lactobacillus sakei* y *Leuconostoc mesenteroides* sp *mesenteroides* como los principales responsables de la alteración del jamón cocido almacenado a 4 y 12°C, debido a la recontaminación del producto durante el cortado en lonchas (Samelis y col., 1998). La contaminación cruzada entre las carnes crudas y cocidas, también se describe como una de las causas que conlleva al deterioro del producto por *BAL*. Björkroth y col. (1998) realizaron un estudio en una industria de procesado cárnico y determinaron que la carne cruda fue el origen de contaminación del jamón cocido, con un predominio de *Leuconostoc carnosum* como microorganismo alterante.

Así, las toxiinfecciones alimentarias asociadas a productos cárnicos cocidos RTE están producidas fundamentalmente por *Salmonella*, *S. aureus* (Todd, 1997; Little y Louvois, 1998; Roberts y col., 1998; Kohl y Farley, 2000;), *Cl. perfringens*, *B. cereus* y *B. subtilis* (Kramer y Gilbert, 1989; Regan y col., 1995). Del mismo modo merecen especial atención los patógenos psicrótrofos (como *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* etc.) por desarrollarse en los productos cárnicos envasados al vacío (Rodríguez-Pérez y col., 2003; Elson y col., 2004; Garrido y col., 2009; Pérez-Rodríguez y col., 2010). A modo de ejemplo, en la Tabla 16, se exponen algunos de los brotes notificados durante los últimos años, en diferentes países de Europa y América en industrias y establecimientos de restauración colectiva.

Los estudios mencionados concluyen que los problemas estructurales de los establecimientos evaluados (como la falta de espacio en las cocinas), la inadecuada manipulación y conservación de los alimentos, las prácticas inadecuadas de higiene y de desinfección, así como la necesidad de formación de los manipuladores en materia

de higiene, fueron los factores de riesgo que influyeron en mayor medida sobre la contaminación de los alimentos.

A pesar de todo lo descrito anteriormente, cabe señalar que en España existen un número reducido de estudios con base científica sobre evaluación microbiológica de los platos preparados en el sector de la restauración colectiva. Así, se disponen de pocos estudios que brinden una información pormenorizada sobre calidad alimentaria, y que a la vez puntualicen sobre la situación actual del sector de la restauración en materia de seguridad alimentaria. Los estudios realizados a través de la presente Tesis, permitieron evaluar exhaustivamente los procedimientos higiénicos y sanitarios llevados a cabo en diferentes establecimientos hospitalarios, escolares y geriátricos de la comunidad de Andalucía, con el objeto de identificar las principales problemáticas y la repercusión de éstas en la calidad higiénico-sanitaria de platos preparados (Publicaciones 1, 2 y 3, de la presente Tesis).

TABLA 15. Brotes de toxiinfecciones alimentarias notificados en Europa y los Estados Unidos por el consumo de vegetales RTE (continúa en la página siguiente).

Año	Vehículo	Microorganismo involucrado	Lugar	País afectado	No. Casos	Referencia
2012	Lechuga romana	<i>E. coli</i> O157:H7	Red de establecimientos de venta al detalle	Estados Unidos	58	Centro de Control y Prevención de enfermedades (CDC,2012)
2011	semillas germinadas o brotes	<i>E. coli</i> O104:H4	Múltiples lugares	12 países europeos y Alemania	3,910	Boletín Semanal Epidemiológico (2011)
2011	Lechuga romana	<i>E. coli</i> O157:H7	Red de establecimientos de venta al detalle	Estados Unidos	60	CDC (2011)
2011	Albahaca fresca	<i>Shigella sonnei</i>	--*	Noruega	46	Guzman-Herrador (2011)
2010	Lechuga	<i>E. coli</i> enterotoxigénica y <i>Norovirus</i>	Empresas de catering	Dinamarca	260	Ethelberg y col. (2010)
2010	Lechuga	<i>E. coli</i> O145	Comedores institucionales	Estados Unidos	12	Schreck (2010)
2007	Lechuga contaminada cortada y pre-envasada	<i>E. coli</i> O157	Industria de procesado	Holanda, Islandia	50	Friesema y col (2008)
2007	Brotes de alfalfa	<i>Salmonella stanley</i>	Hogares	Suecia	51	Werner y col (2007)
2006	Lechuga romana troceada	<i>E. coli</i> O145	Industria de procesado	Estados Unidos	26	CDC (2010)

2005	Ensalada de lechuga (iceberg)	<i>E. coli</i> O157 VT2	--	Noruega, Suecia	>120	Soderström y col. (2005)
2005	Ensalada de lechuga	<i>Salmonella typhimurium</i> DT104	--	Reino Unido	96	Health Protection Agency (HPA, 2005)
2005	Ensalada de lechuga (iceberg)	<i>Salmonella typhimurium</i> DT104	Comedores institucionales	Finlandia y Suecia	>60	Takkinen y col (2005)
2004	Ensalada de lechuga (rúcula)	<i>Salmonella thompson</i>	--	Dinamarca, Noruega, Suecia	100	Nygaard y col (2007)
2004	Ensalada de lechuga	<i>Salmonella newport</i>	--	Reino Unido, Islas de Man	375	HPA (2004)
2004	Lechuga iceberg	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> O:3	Cafeterías	Finlandia	47	Nuorti y col. (2004)
2003	Ensalada de lechuga	<i>Salmonella braenderup</i>	--	Reino Unido	40	HPA (2003)
2002	Ensalada de lechuga con condimentos frescos	<i>Clyclospora cayetanensis</i>	Restaurantes	Alemania	34	Döller y col. (2002)
2002	Ensalada de pepinos	<i>E. coli</i> O157 PT34 VT2	--	Francia, Reino Unido	21	Duffell y col. (2003)
2001	Ensalada de lechuga	Virus Hepatitis A	--	Suecia	54	Nygaard y col. (2001)
2001	Ensalada de lechuga (iceberg)	<i>Salmonella newport</i> PT 33	--	Reino Unido	19	Ward y col. (2002)
2001	Ensalada de lechuga	<i>Salmonella typhimurium</i> DT104	--	Reino Unido	361	Horby y col. (2003)
1996	Mezclas de lechuga	<i>E. coli</i> O157:H7	--	Estados Unidos	--	Hilborn y col. (1999)
1994	Ensalada de lechuga (iceberg)	<i>Shigella sonnei</i>	Hogares	Reino Unido, Noruega	--	Kapperud y col. (1995)

*Datos no disponibles

TABLA 16. Brotes de toxiinfecciones alimentarias notificados en Europa y América por el consumo de productos cárnicos RTE

Año	Vehículo	Microorganismo involucrado	Entorno implicado	País afectado	No. Casos	Referencia
2011	Carne de pavo molido	<i>Salmonella</i> Heidelberg	--	Estados Unidos (32 estados)	77	CDC, 2011
2009	Salami y cárnicos listos para el consumo	<i>Salmonella montevideo</i>	--	Estados Unidos (varios estados)	272	CDC, 2010
2009	Cárnicos cocidos	<i>E. coli</i> O157	Comedores escolares	Wales (Inglaterra)	150	Meldrum y col. (2009b)
2008	--*	<i>L. monocytogenes</i>	Sala de corte (industria de procesado cárnico)	Canadá	(22 anciano)	Canadian Food Inspection Agency (CFIA, 2009).
2006	Carne de cerdo lista para el consumo	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	--	Noruega	11	Grahek-Ogden (2007)
2006	Salchichas fermentadas	<i>E. coli</i> O103:H25	--	Noruega	17	Sekse y col. (2009)
2005	Carne de res molida	<i>E. coli</i> O157:H7	--	Francia	69	EFSA (2006)
2002	Productos cárnicos de pavo	<i>L. monocytogenes</i>	Industria procesado	Estados Unidos (varios estados)	54	Gottlieb y col. (2006)
2001	Carne cocida	<i>E. coli</i>	Carnicería	Reino Unido	30	Rajpura y col. (2003)
--	Mezcla de albóndigas con col	<i>E. coli</i> O157	--	--	13	Meng y col. (2001)
--	Carne de res molida	<i>E. coli</i> O157	--	--	732 (4)	Meng y col. (2001)
2000	Jamón y carne de res en conserva	<i>L. monocytogenes</i>	--	Nueva Zelanda	28	Gilbert y col. (2009)
2000	Lonchas de pavo procesado	<i>L. monocytogenes</i>	Industria de procesado	Estados Unidos (varios estados)	11	Olsen y col. (2005)
1996	Carne cocida	<i>E. coli</i>	--	Escocia	496 (20)	Pennington (1998)
1997	Jamón	<i>S. aureus</i>	--	Florida	30	CDC, 1997
1966-1995	Carne de cecina	<i>S. aureus</i> y <i>Salmonella</i> sp.	Industria de procesado	Nuevo México	250	Millicent y col. (2000)
1988	Empanadas pre-cocidas de carne	<i>E. coli</i>	Cafetería escolar	Estados Unidos	32	Belongia y col. (1991)
1985	Salchichas de pavo	<i>L. monocytogenes</i>	--	Estados Unidos	--	Buncic y Avery (2004)
1985	Carne de pavo, carne de pollo, en salsa	<i>S. aureus</i>	Picnic	Nuevo México	855	CDC, 1986

*Datos no disponibles; (#) Muertes notificadas

Condiciones higiénico-sanitarias de establecimientos de restauración colectiva y seguridad microbiológica de platos de ensalada y cárnicos cocidos dirigidos a poblaciones de riesgo

2.7. MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA

La necesidad de garantizar una alimentación sana y la incapacidad de los métodos convencionales para asegurar de forma eficiente la seguridad microbiológica de los alimentos, han sido unas las razones de peso por las que se han desarrollado nuevas estrategias y perspectivas en el ámbito de la seguridad alimentaria. Entre ellas, el Análisis del Riesgo Microbiológico y el uso de la Microbiología Predictiva desempeñan un papel muy importante.

El Análisis del Riesgo Microbiológico (ARM) se realiza sobre la base de tres aspectos fundamentales como la Evaluación de riesgos, la Gestión de riesgos y la Comunicación de riesgos cuyo objetivo primordial es el de garantizar la protección de la salud pública (Codex Alimentarius, 1999):

- ✓ Evaluación del riesgo: es un proceso iterativo de carácter científico que consiste en el desarrollo de cuatro etapas: Identificación del Peligro, Caracterización del Peligro, Evaluación de la Exposición y Caracterización del Riesgo.
- ✓ Gestión del riesgo: es el proceso de selección de alternativas en función de los resultados obtenidos en la Evaluación del Riesgo, y en su caso, de implementación de medidas o acciones correctoras.
- ✓ Comunicación del riesgo: es el proceso interactivo de intercambio de información y opiniones concernientes a la gestión del riesgo entre diferentes asesores de riesgo, gestores, consumidores y otros partidos interesados.

Concretamente, la Evaluación del Riesgo es el elemento clave dentro del ARM para asegurar el empleo de conocimientos científicos sólidos a efectos de establecer normas, directrices y otras recomendaciones en relación con la inocuidad alimentaria. Lo que se traduce, en la estimación del riesgo microbiológico asociado al consumo de productos alimenticios que puedan conducir a la aparición de

Condiciones higiénico-sanitarias de establecimientos de restauración colectiva y seguridad microbiológica de platos de ensalada y cárnicos cocidos dirigidos a poblaciones de riesgo

toxiinfecciones alimentarias, a través del examen de datos cuantitativos y el uso de información científica. En un sistema tan complejo como el de la producción y el consumo de alimentos, son muchos los factores que están involucrados con el riesgo de contaminación microbiana y en ocasiones la información disponible de alguno de ellos es escasa. Por tanto, para una gestión efectiva de la seguridad alimentaria es necesario examinar dichos factores de forma exhaustiva. En el marco de trabajo de la Evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico (ECRM), la Microbiología Predictiva (MP) ocupa un lugar muy importante en el desarrollo de modelos matemáticos que permiten estimar la frecuencia de consumo de alimentos contaminados, el número de bacterias presentes en un alimento o la probabilidad de contraer una enfermedad basada en un grupo de factores de riesgo, etc.

2.7.1. APLICACIONES DE LA MICROBIOLOGÍA

La MP de alimentos se puede definir como *«el conocimiento detallado de las respuestas de crecimiento de los microorganismos presentes en los alimentos frente a los factores medioambientales que les afectan. Si la ecología microbiana de una operación de procesado o un producto alimentario son conocidos durante la distribución o almacenamiento, la supervivencia y/o crecimiento de un microorganismo de interés puede ser estimado, en base a una relación matemática entre la velocidad de crecimiento microbiana y las condiciones medioambientales. Esto significa que se puede estimar la calidad y seguridad alimentaria monitorizando las condiciones de almacenamiento (Temperatura, atmósfera gaseosa, etc.), o las propiedades intrínsecas del alimento (a_w , valor de pH, etc.) y posteriormente, aplicando una base de modelos predictivos»* (McMeekin y col., 1993).

La MP tiene una amplia lista de aplicaciones en el contexto industrial, sin embargo pueden ser resumidas en tres grupos fundamentales (Membre y Lambert, 2008):

1. Innovación de alimentos: La MP permite evaluar la velocidad de crecimiento microbiano, los límites de crecimiento/o tasa de inactivación asociada con la

formulación de un alimento concreto, así como con unas determinadas condiciones de procesado, con el fin de desarrollar nuevos productos y procesos, reformular productos existentes y optimizar las condiciones de almacenamiento y vida útil;

2. Ayuda en la toma de decisiones durante la fabricación de un alimento: Permite apoyar las medidas de seguridad alimentaria que deben ser tomadas en el momento de aplicar o ejecutar una operación de fabricación de un producto, como el establecimiento de los Puntos de Control Críticos (PCC) en un sistema de APPCC, el diseño de tratamientos térmicos durante el procesado, la evaluación de la repercusión de las desviaciones de un proceso, en materia de seguridad alimentaria y calidad de los productos alimenticios;
3. Asistencia en alertas alimentarias: Estimar la repercusión sobre la seguridad del consumidor o la calidad del producto en caso de problemas con los productos comercializados.

Un ejemplo claro de aplicación práctica de la MP en una industria alimentaria se expone a continuación en la Figura 9. Concretamente, el estudio pretende estimar la probabilidad de crecimiento de *B. cereus* en alimentos procesados. Para ello considera los diferentes escenarios: producción industrial, distribución/venta; almacenamiento en el hogar; así como los factores de riesgos vinculados a cada escenario, en este caso: la Temperatura de procesado y los tiempos/Temperaturas (t/T) de almacenamiento post-procesado; y finalmente estima la repercusión de éstos sobre el comportamiento microbiano y producción de esporas de *B. cereus*.

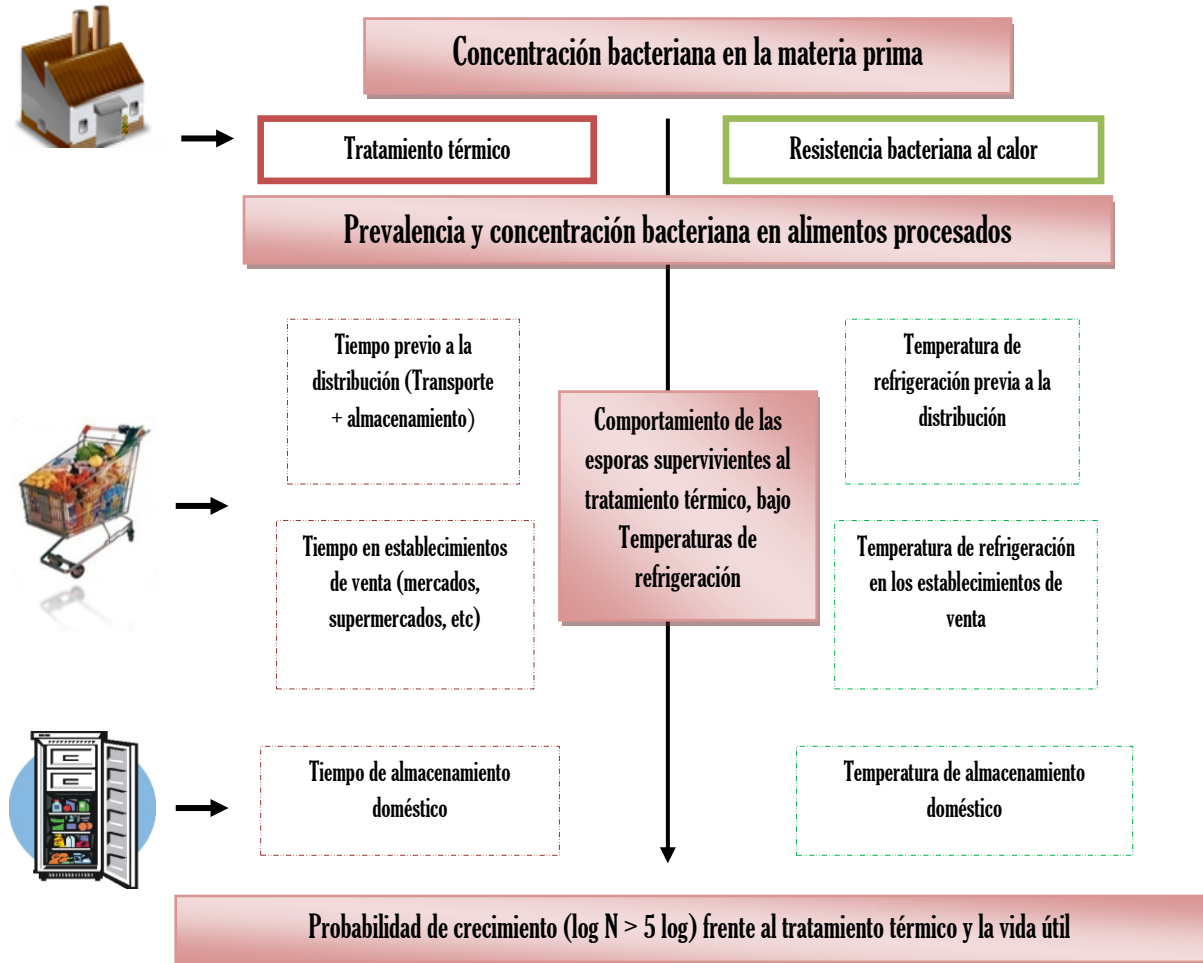


Figura 9. Aplicación práctica de la MP en la estimación de la probabilidad de crecimiento de *B. cereus* en alimentos procesados. Tomado de Membré y Lambert (2008).

2.7.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

La evaluación de la repercusión de los factores ambientales sobre el comportamiento de los microorganismos transmitidos por los alimentos es la primera fuente de datos para el desarrollo de modelos predictivos. Para diseñar un experimento es importante considerar la influencia de más de un factor y la descripción exacta de la interacción entre los factores. Desafortunadamente, en ocasiones en el modelado del crecimiento bacteriano en alimentos, el diseño no se tiene en cuenta o solo se usa como un hábito, en lugar del propósito específico del experimento. Precisamente, unas de las ventajas de un diseño experimental es extraer la información deseada (por ejemplo, las interacciones entre factores) y evitar el exceso de trabajo (Rasch, 2002). Algunos autores sugieren que los investigadores deben estar conscientes del

diseño experimental a utilizar con el fin de evitar extrapolaciones (Baranyi y col., 1996; Masana y Baranyi, 2000a; Pin y col., 2000).

En el diseño de un modelo predictivo es preciso tener en cuenta su finalidad. Éste será distinto en el caso que se quiera estimar cuantitativamente un parámetro de crecimiento microbiano en función de ciertos factores ambientales, o bien cuando se desarrolle un modelo de Probabilidad donde se quiera estudiar el comportamiento microbiano de forma cualitativa.

En un estudio de validación en un alimento en concreto, el diseño se realizará acorde con la representatividad de los datos bajo condiciones reales o el tiempo de análisis empleado. Para ello es imprescindible realizar ensayos preliminares que determinen ciertos factores (como la Temperatura, el pH, la actividad de agua (a_w), etc.) que se quieran emplear y que sean realmente significativos. Lógicamente al aumentar el número de factores en el modelo y los niveles empleados de cada uno de ellos, el diseño va a resultar más complejo (Devlieghere y col., 2000).

2.7.3. GENERACIÓN DE DATOS

La acumulación de datos debe basarse en la optimización del número de datos y del coste empleado en la obtención de cada uno de ellos.

En el caso de los modelos de crecimiento e inactivación, es necesario recopilar datos durante todo el periodo de crecimiento/inactivación del microorganismo y casi siempre se necesitan alrededor de cien curvas para que el modelo sea significativo (McDonald y Sun, 1999). Gibson y col. (1987) recomendaron la necesidad de recoger al menos entre 10 y 15 puntos por curva de crecimiento/inactivación, estableciendo un óptimo de 20 puntos. Un número menor de 10 puntos por curva, supone que el ajuste no sea lo suficientemente representativo y por tanto aumente la incertidumbre de los datos.

Actualmente existen distintos métodos de acumulación de datos: los métodos tradicionales y los métodos rápidos.

2.7.3.1. MÉTODOS TRADICIONALES DE GENERACIÓN DE DATOS

El método tradicional más utilizado para la monitorización del crecimiento de una población bacteriana es el recuento en placa, sin embargo tiene los inconvenientes que los datos pueden ser subestimados por la presencia de agregados microbianos en forma de cadenas o grupos; y es un método lento, laborioso y no proporciona resultados de forma inmediata. Este hecho dificulta la elaboración de modelos predictivos, especialmente cuando se requiere un gran número de datos.

Los modelos predictivos generados a partir de caldo de cultivo se desarrollan a partir de la modificación artificial del medio (adición de conservantes como los ácidos orgánicos, NaCl, nitrito de sodio, etc., o la reducción de los niveles de pH con la adición de HCl) y la inoculación con un microorganismo específico, cuyo crecimiento o supervivencia se controla durante un cierto periodo de tiempo. Actualmente, son muchos los estudios publicados que siguen este tipo de metodología (Ross y McMeekin, 1994; Sutherland y col., 1994; Ratkowsky y Ross, 1995; Sutherland y col., 1995; Ross y col., 2003; Zurera-Cosano y col., 2004; Lindqvist, 2006; Valero y col., 2009).

Cuando se trata de matrices alimentarias, se realiza lo que se denomina un 'estudio de desafío', definido como un *«método para evaluar el comportamiento microbiano en el que se inocula un microorganismo determinado en un alimento específico y se comprueba si el alimento permite o no el crecimiento o supervivencia microbiana bajo un conjunto limitado de condiciones»*. Seguidamente se explica en detalle el procedimiento experimental para llevar a cabo un estudio de desafío general; evidentemente este tipo de método tiene muchas variantes y usos de acuerdo con sus objetivos finales, no obstante la intención es la de resumir los pasos más genéricos:

Los estudios de desafío microbiológicos se utilizan en la MP para evaluar el comportamiento de una cepa en particular o una mezcla de diferentes cepas, para posteriormente calcular y predecir el comportamiento microbiano como consecuencia de una contaminación inicial del alimento y unas determinadas condiciones ambientales; así como para determinar la vida útil potencial de ciertos alimentos que se almacenan bajo refrigeración o a Temperatura ambiente. Estos estudios son apropiados o útiles y deben hacerse sobre del conocimiento previo de determinados factores relativos al alimento que pueden hacer posible el crecimiento y/o supervivencia microorganismos tanto patógenos como responsables del deterioro o el conocimiento previo del producto. Existen diferentes guías y documentos que proporcionan más información sobre la metodología que hay que llevar a cabo para diseñar un estudio de desafío (FDA, 2009).

2.7.3.2. MÉTODOS RÁPIDOS DE GENERACIÓN DE DATOS

Los métodos rápidos de monitorización del crecimiento bacteriano son muy utilizados en el campo de la MP como una alternativa para simplificar la detección microbiana. Entre éstos se destacan la turbidimetría, citometría de flujo, la microscopía y análisis de imágenes; y los métodos electroquímicos (impedancia y conductancia).

En comparación con el recuento en placa, la turbidimetría y la impedancia son métodos automatizados que permiten realizar un elevado número de experimentos, mientras que la citometría de flujo y la microscopía brindan información adicional sobre el estado fisiológico celular (Rasch, 2004).

2.7.3.2.1. TURBIDIMETRÍA

La turbidimetría es un método establecido para estudiar el crecimiento bacteriano a partir de medidas de *Absorbancia (ABS)* o de *Densidad Óptica (OD)* (Begot y col., 1996). La técnica se fundamenta en la capacidad que tienen las células bacterianas suspendidas en un medio líquido transparente, de absorber y dispersar un haz de luz

incidente, que depende de su concentración en el medio, su tamaño, forma, de la longitud de onda e índice de refracción. Consecuentemente al crecimiento celular se produce un incremento de turbidez de la suspensión y por tanto ocurre un incremento de la *OD*.

Este método constituye una técnica rápida, fiable, no destructiva, económica y relativamente fácil de automatizar; a la vez que permite el seguimiento simultáneo de un gran número de muestras (Begot y col., 1996; Barco-Alcalá y col., 2000 y Dalgaard y Koutsoumanis, 2001). Sin embargo, sus desventajas se deben a su baja sensibilidad (la concentración celular mínima detectable es 5-6 log ufc/ml) y a la relación no directamente proporcional entre las medidas de *OD* y los recuentos en placa cuando las concentraciones celulares son elevadas (Valero, 2006).

El Bioscreen C® es un espectrofotómetro utilizado para obtener las mediciones de *OD* de forma automatizada. Mediante este equipo se realizan múltiples mediciones (hasta 200 pocillos) a intervalos de tiempos específicos, manteniendo una Temperatura de incubación constante. Sin embargo, el uso de las mediciones de *OD* para modelar el crecimiento bacteriano tiene sus limitaciones, probablemente la linealidad sea uno de los inconvenientes más importantes. En este sentido es muy aconsejable la utilización de la ecuación de Beer-Lambert (Ecuación 1):

$$\log \left(\frac{I_{\text{incidente}}}{I_{\text{transmitida}}} \right) = \text{absorbancia} = -xcl \quad \text{Ec.1}$$

Donde, $I_{\text{incidente}}$ es la intensidad de luz que incide en el medio, mientras que $I_{\text{transmitida}}$ es la intensidad de luz que sale del medio; x es una constante que depende del medio y del microorganismo, c es la concentración microbiana, e l es la distancia que recorre la luz a través del medio. Otro de los aspectos a tener en cuenta cuando se utilizan las mediciones de *OD* es que los límites de detección son relativamente altos y con frecuencia se sitúan por encima de los 6 log ufc/ml, lo que significa que el modelo de crecimiento debería estar basado en un nivel de inóculo inicial elevado.

Su imposibilidad para diferenciar entre las células vivas y muertas influye en su aplicación en los modelos de crecimiento.

En la literatura científica son muy frecuentes los modelos predictivos basados en datos de *OD*, pese a las limitaciones que se mencionan, en los que se estima μ_{max} para diferentes microorganismos y condiciones ambientales; puesto que este parámetro solamente expresa una tasa de cambio con respecto al tiempo (Dalgaard y col., 1994; Begot y col., 1996; Augustin y col., 1999; Zurera-Cosano y col., 2006). Sin embargo, existen algunos autores que consideran que los modelos que se basan en datos de *OD* pueden subestimar la μ_{max} y por tanto sugieren otro tipo de enfoque, estimando este parámetro mediante el uso del tiempo de detección (t_d) (Lindqvist, 2006; Lianou y Koutsoumanis, 2011). La ecuación 2, utilizada por Cuppers y Smelt (1993) y Lianou y Koutsoumanis (2011), permite estimar la μ_{max} a partir de los datos del t_d .

$$\log(NI) = k - \mu_{max} t_d \quad \text{Ec.2}$$

donde *NI* es el nivel de inóculo, como resultado a las diferentes diluciones decimales del nivel de inóculo inicial, μ_{max} es la tasa máxima de crecimiento y *k* es una constante de regresión.

Por otra parte las curvas de calibración que relacionan la *OD* y la concentración bacteriana son muy utilizadas para obtener estimaciones fiables de los parámetros cinéticos y constituyen una alternativa sobre el uso directo de los datos de *OD*. Las ecuaciones de calibración estimadas a partir de los datos experimentales se utilizan para transformar los datos de *OD* en datos de recuento para determinar los parámetros cinéticos (Dalgaard y Koutsoumanis, 2001). Es muy importante tener presente que las curvas de calibración deben realizarse en correspondencia con una condición específica de crecimiento, puesto que la aplicación de un estrés ambiental durante el crecimiento puede afectar las mediciones de *OD* (Valero, 2006).

Para el caso de los modelos predictivos de crecimiento/no crecimiento (C/NC), los datos de *OD* no constituyen un inconveniente, justamente porque solo consideran si

existe o no crecimiento. Experimentalmente, el crecimiento se traduce en el registro de un cambio significativo de los datos de *OD*.

En la Publicación 4 de la presente Tesis, la turbidimetría fue el método utilizado para la determinación a tiempo real el crecimiento de 4 cepas enteropatógenas de *E. coli* (O55:H6; O59:H21; O158:H23; O157:H7), en función de diferentes factores medioambientales (nivel de inóculo inicial, Temperatura, pH y a_w). Los resultados obtenidos sirvieron de base para comparar el comportamiento entre las cepas y seleccionar la más resistente.

2.7.3.2.2. MÉTODO DE CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es otra técnica rápida para mediciones de células individuales en suspensión. Las mediciones se producen cuando cientos de células confinadas en un fluido pasan por una ventana de medición, que mide con elevada precisión varios parámetros simultáneamente por segundo (Vives-Rego y col., 2000). La dispersión de la luz permite determinar el tamaño, forma e integridad de las células, mientras que las mediciones de fluorescencia comprueban el estado fisiológico y el contenido celular mediante un tinte fluorescente (Walberg y col., 1997). Varios estudios señalan la adecuada correlación entre la determinación microbiana que realiza el método, con los métodos de recuento en placa (Sorensen y Jakobsen, 1997; Endo y col., 2001; Holm y col., 2004).

2.7.3.2.3. MÉTODO DE MICROSCOPIA Y ANÁLISIS DE IMAGEN

La microscopía es otro método que está ganando interés y se combina con el uso de programas de análisis de imágenes que permiten que el método sea más accesible. Posee ventajas en comparación con las técnicas de recuento en placa y las basadas en datos de *OD*; al observar directamente la presencia de microorganismos en matrices alimentarias y medios de cultivo. Asimismo, permiten obtener recuentos más bajos y por tanto una mejor exactitud y precisión en los resultados. Este método determina el estado fisiológico de las bacterias en superficies basado en las propiedades

bioquímicas de las células y el uso de fluorocromos específicos (Bredholt y col., 1999).

2.7.3.2.4. MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS: IMPEDANCIA Y CONDUCTANCIA

Estos métodos se fundamentan sobre la base que la conductividad de un medio de crecimiento aumenta, con el incremento bacteriano debido a la producción de moléculas orgánicas debilmente cargadas (Rasch, 2004). Sus ventajas se deben a la determinación del nivel bacteriano de un medio de crecimiento y de los alimentos, a través de los métodos de Conductancia y Capacitancia (Lanzanova y col., 1993; Noble, 1999; Koutsoumanis y Nychas, 2000); o a la obtención de parámetros cinéticos y la determinación del t_d mediante los datos de Impedancia (McMeekin y col., 1993).

2.7.4. MODELOS MATEMÁTICOS

Los modelos matemáticos se utilizan sobre la base de dos aspectos principales (Ross y McMeekin, 1994; Nakashima y col., 2000):

1. Predecir la probabilidad de ocurrencia de un evento en un periodo de tiempo conocido y para ello se aplican los modelos probabilísticos.
2. Representar el aumento o la disminución de una población microbiana de interés, mediante el uso de los modelos cinéticos.

Los modelos matemáticos pueden ser de tipo empíricos, que describen un conjunto de datos mediante una relación matemática conveniente; y Mecanicistas que facilitan la interpretación de los parámetros del modelo en términos de fenómenos y procesos conocidos (McMeekin y col., 1993).

No obstante, para una mejor comprensión y con la perspectiva de elaboración de modelos, se propuso clasificarlos en tres niveles Whiting y Buchanan (1993):

1. modelos Primarios: Son los modelos que describen el comportamiento de la población microbiana en función del tiempo;

2. modelos Secundarios: Son los que relacionan y describen los parámetros obtenidos en los modelos Primarios frente a un determinado conjunto de factores ambientales;
3. modelos Terciarios: Son los programas informáticos utilizados para integrar los modelos Primarios y Secundarios.

2.7.4.1. MODELOS PRIMARIOS

Describen la cinética de un proceso con el menor número de parámetros posibles, tratando de definir con precisión las fases crecimiento, de supervivencia o de inactivación de una población microbiana en un medio o alimento en concreto.

Se aplican a un conjunto de datos microbiológicos de la siguiente manera:

- ✓ En una primera etapa, se selecciona un modelo matemático que se adecúe a la tendencia de los datos, es decir, cómo la concentración microbiana varía en el tiempo.
- ✓ En una segunda etapa, dicho modelo se ajusta a los datos microbiológicos mediante regresión (lineal o no-lineal) y como consecuencia, se obtienen un conjunto de parámetros cinéticos como: *lag* (se le denomina *lag* cuando se corresponde a un proceso de crecimiento u “hombro” cuando se corresponde a un proceso de inactivación), μ_{\max} /tasa de inactivación (t_i); tamaño inicial (N_0) y densidad máxima de la población (N_{\max}). El conjunto de datos utilizados para ajustar el modelo supuestamente se obtienen bajo determinadas condiciones intrínsecas (pH, a_w , acidez, contenido de sales) o condiciones extrínsecas (Temperaturas, gases, etc.). Por esta razón los parámetros cinéticos obtenidos tras el ajuste del modelo solamente se aplican dentro del dominio perteneciente a los factores intrínsecos y extrínsecos que caracterizan el conjunto de datos.

Los modelos Primarios se dividen:

- ✓ modelos cinéticos de crecimiento.
- ✓ modelos de supervivencia/inactivación.

2.7.4.1.1. MODELOS CINÉTICOS DE CRECIMIENTO

Los modelos cinéticos de crecimiento estudian la evolución microbiana en un medio determinado en función de los factores que los afecten. A través de los datos obtenidos se predice lo que sucederá durante la etapa de almacenamiento. Estos modelos son particularmente útiles cuando se desea predecir el cambio de un parámetro cinético de crecimiento en función del tiempo, de una forma cuantitativa.

Los parámetros que se miden en un evento de crecimiento microbiano son:

- ✓ Densidad máxima de población (N_{\max} , log ufc/g): consiste en la determinación del nivel máximo que puede alcanzar una población microbiana bajo unas determinadas condiciones. Obviamente, cuanto más favorables sean las condiciones para el crecimiento, mayor será el nivel microbiano;
- ✓ Tasa máxima de crecimiento (μ_{\max} , h): es la velocidad de crecimiento microbiana/unidad de tiempo. Está relacionada de forma inversa con el tiempo de generación (t_g). Ésta será mayor cuanto más favorables sean las condiciones para el crecimiento microbiano;
- ✓ Tiempo de adaptación o latencia (lag o λ , h): se refiere al tiempo que necesita la población microbiana para adaptarse al medio. Consiste en la determinación del tiempo transcurrido desde la colonización microbiana hasta que comienzan a multiplicarse. La fase de adaptación microbiana será menor cuanto más favorables sean las condiciones para el crecimiento microbiano;

- ✓ Concentración del inóculo inicial (N_0 , log ufc/g): se corresponde con la concentración inicial de inóculo, que puede ser expresada también en log ufc/ml.

Para una mejor comprensión, a continuación se representan las diferentes fases de una curva sigmoideal de un evento de crecimiento microbiano:

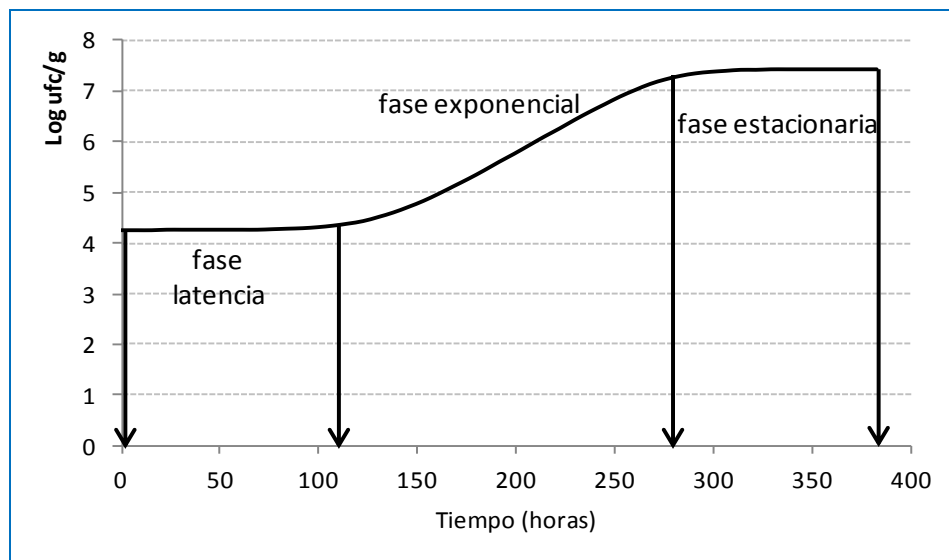


Figura 10. Parámetros de una curva de crecimiento microbiano.

El primer libro dedicado exclusivamente al campo de la MP (McMeekin y col., 1993) ofrece una amplia y excelente revisión y discusión de las ecuaciones clásicas que se utilizan para describir el crecimiento sigmoideal, entre las que se destacan las ecuaciones Logísticas modificadas y de Gompertz. Dichos modelos fueron introducidos por Gibson y col. en 1987 y desde entonces han sido las más utilizadas para ajustar los datos de crecimiento ya que estas funciones pueden ofrecer un ajuste razonablemente bueno a datos experimentales de crecimiento microbiano.

En los últimos años se ha desarrollado una nueva generación de modelos cinéticos de crecimiento microbiano con un carácter de tipo mecanicista. Entre ellos se encuentran el modelo de Baranyi (Baranyi y col., 1993; Baranyi y Roberts, 1994), el modelo de Hills (Hills y Wright, 1994; Hills y Mackey, 1995), el modelo de Buchanan (Buchanan y col., 1997) o el modelo de McKellar (McKellar, 1997).

2.7.4.1.1.1. MODELO DE BARANYI

El modelo de Baranyi y Roberts (1994) es uno de los modelos ampliamente utilizado. Fue introducido en la MP en los estudios realizados por Baranyi y col. (1993) y Baranyi y Roberts (1994, 1995). Se utiliza para ajustar los datos de crecimiento microbiano frente al tiempo a través del software DMFit (DMFit, Institute of Research, Norwich, UK). Dicho software puede descargarse gratuitamente a través de la dirección web: <http://www.ifr.ac.uk/safety/DMFit/default.html>.

El modelo de Baranyi y Roberts (1994), fue empleado en las Publicaciones 4 y 6 de la presente Tesis, para determinar los parámetros cinéticos de crecimiento de *E. coli* sometido a diferentes condiciones, en caldo de cultivo y de una cepa estresada de *S aureus*, en un producto cárnico cocido mantenido a 20°C.

Este tipo de modelo asume que durante la fase *lag*, las células necesitan sintetizar un sustrato q fundamental para el crecimiento y una vez que se adaptan al nuevo ambiente, existe un crecimiento exponencial limitado por las condiciones del medio de cultivo (Ecuación 3).

$$\frac{dx}{dt} = \frac{q(t)}{q(t)+1} \cdot \mu_{max} \cdot \left(1 - \left(\frac{x(t)}{x_{max}}\right)^m\right) x(t) \quad \text{Ec.3}$$

Donde, x es el número de células a tiempo t , x_{max} es la densidad máxima celular y $q(t)$ es la concentración del sustrato limitante que varía con el tiempo. El parámetro m caracteriza la curvatura antes de la fase estacionaria. Cuando $m = 1$ la función se reduce a una curva Logística que a menudo se asume como una simplificación del modelo (Ecuación 4):

$$\frac{dq}{dt} = \mu_{max} \cdot q(t) \quad \text{Ec.4}$$

El valor inicial de q (q_0) es una medida del estado fisiológico de las células. Una transformación más estable de q_0 puede ser definida tal y como indica la ecuación 5:

$$h_0 = \ln \left(1 + \frac{1}{q_0} \right) = \mu_{max} \lambda \quad \text{Ec.5}$$

Finalmente, el modelo tiene cuatro parámetros: x_0 (cantidad inicial de células); h_0 ; x_{max} ; y μ_{max} . Donde el parámetro h_0 se describe como una interpretación del primer periodo de latencia (*lag*) formalizado por Robinson y col. (1998), quienes consideraron que éste se correspondía con el “trabajo” que deben realizar las células para adaptarse a un nuevo entorno antes de iniciar el crecimiento exponencial (μ_{max}) y dependía del tipo de microorganismo, las condiciones ambientales y la velocidad a la que realiza el trabajo.

2.7.4.1.1.2. MODELO DE HILLS

Hills y Wright (1994) y Hills y Mackey (1995) desarrollaron una teoría acerca de la disposición espacial de las bacterias en un sistema heterogéneo, en la que describen el transporte de nutrientes mediante la combinación de un modelo cinético celular estructurado con las ecuaciones de reacción-difusión.

2.7.4.1.1.3. MODELO DE BUCHANAN

Buchanan y col. (1997) desarrollaron un modelo Primario que tiene en cuenta el comportamiento de las células individuales como un de poblaciones bacterianas. Se trata de un modelo Lineal de tres fases que describe o divide la curva de crecimiento en tres fases: fase de adaptación. Durante la fase de adaptación, se asume que no existe división celular porque las células se están adaptando al nuevo entorno. Por este motivo la tasa específica de crecimiento es igual a 0 ($\mu = 0$). Una vez adaptadas, las células comienzan a crecer hasta una velocidad que es máxima para el microorganismo en un ambiente determinado. Durante la fase exponencial se asume que tasa específica de crecimiento es una constante ($\mu = k$), donde la población celular aumenta logarítmicamente linealmente respecto al tiempo. Una vez alcanzada la fase estacionaria no hay incremento de la población celular y μ vuelve a ser 0 ($\mu = 0$).

2.7.4.1.1.4. MODELO DE MCKELLAR

Es un modelo empírico creado por McKellar (1997) y asume que el crecimiento de la población microbiana se inicia gracias a un incremento de una fracción pequeña de la población total de células, que se encuentran presentes en un medio de cultivo a tiempo $t = 0$. El modelo se basa en la teoría de que las poblaciones microbianas son heterogéneas más que homogéneas, existiendo por tanto dos poblaciones microbianas con comportamientos diferentes; la suma de las dos poblaciones efectivamente describe la transición de la fase de latencia a la exponencial y define un nuevo parámetro G_0 , que es la población inicial capaz de crecer.

A modo general, en la actualidad no es posible definir un modelo de crecimiento como el más apropiado para representar el crecimiento microbiano (McKellar y Lu, 2004). Según plantea Garthright (1997), un modelo Lineal de tres fases puede ser suficiente para representar con precisión los parámetros fundamentales de crecimiento. Sin embargo, es preciso desarrollar modelos de crecimiento más complejos y más realistas (modelos más mecanicistas) con lo cual sería conveniente una mejor comprensión del comportamiento celular a nivel fisiológico. En la literatura científica, los estudios confirman la acción del estrés térmico, osmótico, ácido, etc., sobre el estado fisiológico de las células microbianas y la influencia sobre la fase *lag*. Los estudios recientes sobre *S. aureus* señalan que las células estresadas son capaces de adaptarse y crecer exponencialmente si las condiciones medioambientales son favorables para su desarrollo (Rode y col., 2007; Ingham y col., 2009). El presente trabajo de Tesis comprende un estudio que evalúa el comportamiento y la producción de enterotoxina A, de una cepa estresada de *S. aureus* enterotoxigénico, en fiambre de pechuga de pollo almacenada a 10 y 20°C. El estudio aporta los datos suficientes y destaca la importancia del estrés causado por las condiciones de pre-incubación en caldo en el comportamiento posterior de la cepa en el producto cárnico cocido (Publicación 6).

2.7.4.1.2. MODELOS DE SUPERVIVENCIA E INACTIVACIÓN MICROBIANA

Históricamente la inactivación microbiana por tratamientos térmicos u otras tecnologías se describieron usando la cinética de primer orden. Sin embargo, con frecuencia son observadas las curvas con “hombro o cola” y desviaciones significativas de la linealidad, lo cual demanda el desarrollo de modelos más complejos (Zwietering y col., 1990; Cole y col., 1993; Peleg y Cole, 1998). En la Figura 11, se representan los modelos actuales más usados para describir la supervivencia/inactivación de los microorganismos patógenos en alimentos:

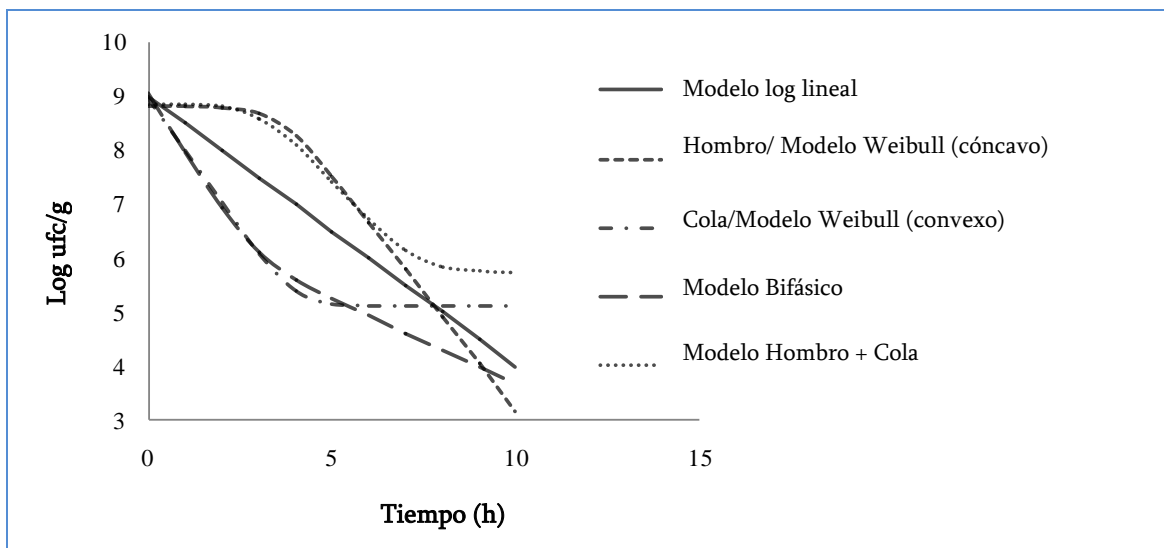


Figura 11. Modelos más utilizados para la descripción de la supervivencia/inactivación de patógenos en alimentos.

2.7.4.1.2.1. MODELO LINEAL

El modelo Lineal clásico asume que la inactivación es explicada por una simple reacción cinética de primer orden bajo condiciones isotérmicas (Ecuación 6):

$$\frac{dS_t}{dt} = -K' S_t \quad \text{Ec.6}$$

donde S_t es la tasa de supervivencia (N_t/N_0) y k' es la velocidad constante. Cuando el número de células supervivientes disminuye exponencialmente se utiliza la ecuación 7:

$$S_t = e^{-k't} \quad \text{Ec.7}$$

Y si se expresa en log se obtiene la siguiente ecuación:

$$\log S_t = -kt \quad \text{Ec.8}$$

donde $k = k'/\ln_{10}$. El valor D se refiere al tiempo de reducción decimal. El valor $D = 1/k$, donde k es la pendiente. Los valores de D también se pueden expresar como muestra la ecuación 9:

$$\text{Valor } D = \frac{t}{\log N_0 - \log N_t} \quad \text{Ec.9}$$

donde el logaritmo de los valores de D se representa respecto a las Temperaturas correspondientes. El inverso de la pendiente es igual al valor z , que representa el aumento de Temperatura que se requiere para obtener una reducción de 1 log en valor D . La velocidad constante también puede relacionarse con la Temperatura por la ecuación de Arrhenius (Ecuación 10):

$$k = N_0 e^{\left(\frac{E}{RT}\right)} \quad \text{Ec.10}$$

donde E_a es la energía de inactivación, R es la constante universal de gases y T es la Temperatura en grados Kelvin.

En la actualidad se conoce un amplio trabajo sobre la determinación de los valores de D y z para la mayoría de los patógenos, tanto en caldo como en matrices alimentarias (Mazzota, 2001; Murphy y col., 2002; Van Asselt y Zwietering, 2006).

2.7.4.1.2.2. *MODELO DE HOMBRO Y COLA/ MODELO DE WEIBULL*

Aunque en la actualidad es aplicado el concepto de muerte logarítmica, también las curvas no lineales han sido estudiadas durante muchos años. Las curvas no lineales son las curvas que muestran una región “hombro” al inicio y/o una región “cola” al final de la curva de inactivación. Las posibles explicaciones de este comportamiento se relacionan con la variabilidad microbiana a un proceso térmico, el uso de cultivos mixtos, la aglutinación, el efecto protector de las células muertas, los mecanismos de

choque múltiple, distribución natural de sensibilización al calor o la adaptación al calor (Stringer y col., 2000).

Este tipo de modelo asume que las células no solo existen como organismos vivos o muertos, sino que también pueden experimentar varios grados de lesiones o daños subletales dando lugar a aparentes curvas no lineales de supervivencia (Stringer y col., 2000). Así pues, los modelos de supervivencia deben incluir una comprensión más completa de los eventos moleculares que mantienen la resistencia microbiana al medio ambiente. Como la heterogeneidad es la razón más plausible para la observación de curvas no lineales, a menudo se sugiere el uso de distribuciones como Gamma (Takumi y col., 2000) o Weibull (Van Boekel, 2002; Coroller y col., 2006).

El modelo de Weibull ha sido usado como un modelo Primario de inactivación de bacterias vegetativas (Van Boekel, 2002). Este modelo se ajusta datos no lineales de supervivencia/inactivación, y es básicamente un modelo estadístico de distribución de los tiempos de inactivación. El modelo se basa en dos parámetros: el parámetro de escala delta (δ) y el parámetro de forma adimensional p . El logaritmo de la escala del parámetro δ depende linealmente de la Temperatura, no siendo así para el parámetro p cuya relación con la Temperatura no está muy bien establecida. (Peleg y col., 1998). El parámetro de forma (p) tiene en cuenta la concavidad de la curva de supervivencia. Cuando $p < 1$, la curva de supervivencia toma una forma cóncava hacia arriba; cuando la curva es lineal entonces $p = 1$ y se asume que no existe variación biológica (donde cada célula es igualmente susceptible de ser destruida); y la curva será cóncava hacia abajo o convexa cuando $p > 1$. La ecuación 11 representa la función acumulativa de una curva de supervivencia:

$$\log S(t) = -\frac{1}{2.303} \left(\frac{t}{\alpha}\right)^{\beta} \quad \text{Ec.11}$$

La siguiente Figura 12, representa algunos ejemplos de curvas de Supervivencia/Inactivación generadas a partir del modelo de Weibull:

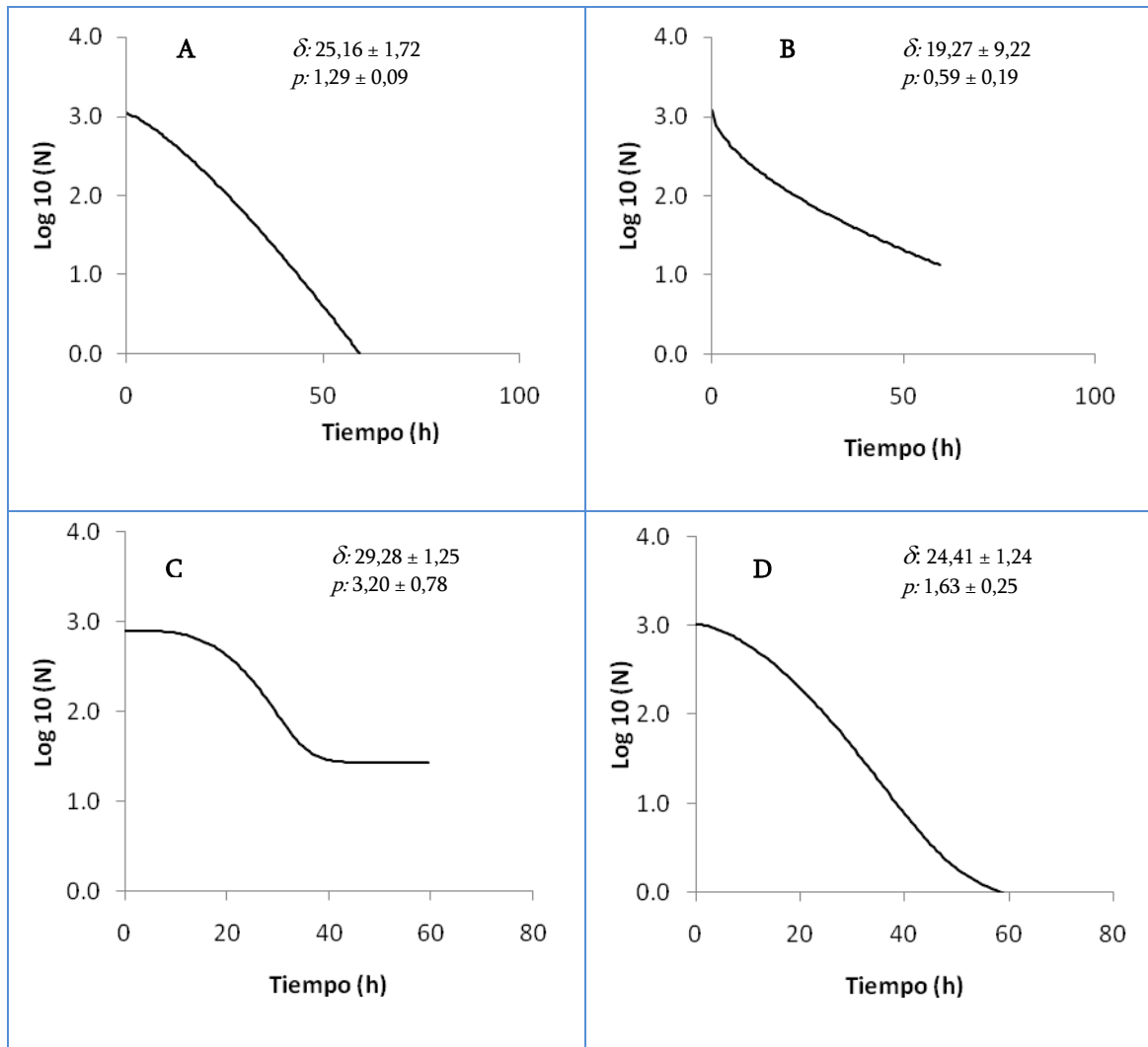


Figura 12. Curvas de supervivencia del modelo de Weibull: δ y p , representan los parámetros del modelo. A y B: modelos de Weibull descrito por Mafart y col. (2002); C: modelo de Weibull con cola descrito por Mafart y col. (2002), D: modelo doble Weibull, descrito por Coroler y col. (2006).

En la presente Tesis Doctoral, el modelo Weibull fue empleado para cuantificar la supervivencia de la cepa estresada de *S. aureus* en fiambre de pechuga de pollo cortado en lonchas, almacenadas a 10°C (Publicación 6)

2.7.4.2. MODELOS SECUNDARIOS

Según Whiting (1995), los modelos secundarios son ecuaciones que describen las variaciones de los parámetros de crecimiento o inactivación, estimadas a partir de los modelos Primarios, bajo la influencia de uno o más factores ambientales asociados a un medio o alimento; y para ello resulta determinante el conocimiento de los factores ambientales que más influyen en el crecimiento microbiano, para un mejor desarrollo y uso práctico de los modelos predictivos (McKellar y Lu, 2004).

Los modelos Secundarios se pueden desarrollar para describir la acción que ejercen los factores ambientales sobre los parámetros de crecimiento (*lag* y μ_{max}). Entre ellos encontramos:

- ✓ modelos Polinomiales
- ✓ modelo de Raíz Cuadrada
- ✓ modelos de Parámetros Cardinales y Concepto Gamma

Los modelos Secundarios pueden describir la probabilidad de crecimiento en un rango limitado de condiciones medioambientales. Existen otros modelos secundarios ampliamente desarrollados, como los de transferencia, los cuales no son objeto de la presente Tesis.

2.7.4.2.1. MODELOS POLINOMIALES

Los modelos Polinomiales describen las respuestas de crecimiento (*lag*, μ_{max}) o sus transformaciones ($\sqrt{\mu_{max}}$, $\ln(\mu_{max})$ etc.) a través de una función polinómica. Como ejemplo del uso de un modelo Polinomial, se describe uno desarrollado por McClure y col. (1993) para *Brochothrix thermosphacta* (Ecuación 12):

$$\ln(\mu_{max}) = a_0 + a_1 T + a_2 \cdot pH + a_3 (\%NaCl) + a_4 T \cdot pH + a_5 T(\%NaCl) + a_6 \cdot pH(\%NaCl) + a_7 T^2 + a_8 \cdot pH^2 + a_9 (\%NaCl)^2$$

Ec.12

Las ventajas de estos modelos es que en la mayoría de casos describen el efecto de cualquier factor ambiental, incluso las interacciones entre ellos y no requieren de técnicas avanzadas para llevar a cabo su ajuste, como sí pasa para la regresión no lineal. No obstante, sus desventajas residen en la cantidad de parámetros y en ocasiones carecen de significación biológica.

La Figura 13 representa un modelo Secundario en tres dimensiones que se corresponde con el modelo de respuesta en superficie. Éste caracteriza la influencia

de dos factores ambientales (NaCl y pH) sobre el logaritmo neperiano de la tasa de crecimiento ($\ln \mu_{max}$).

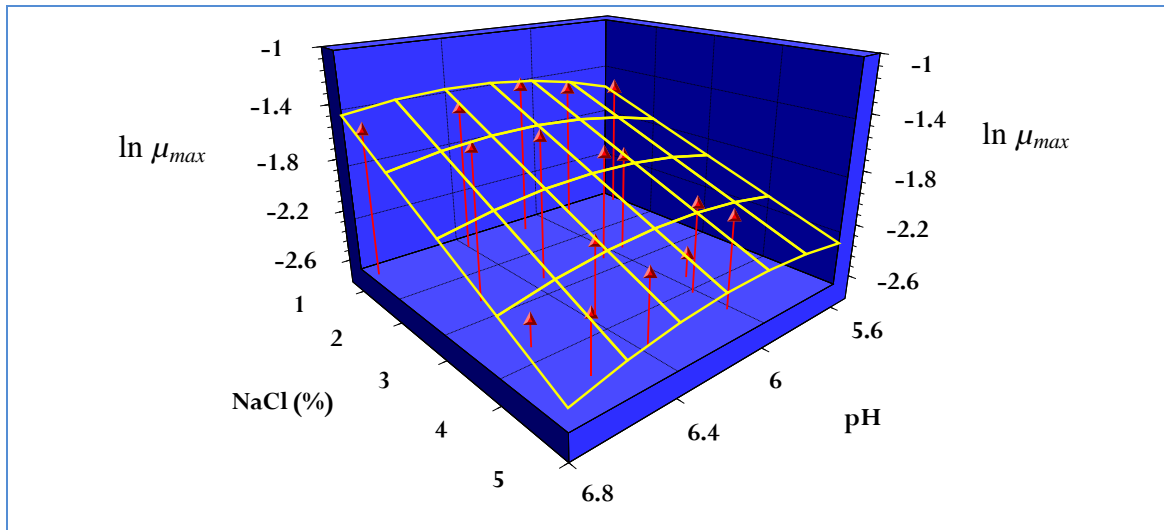


Figura 13. Representación de la relación del logaritmo neperiano de la tasa máxima de crecimiento ($\ln \mu_{max}$) y los niveles de pH y NaCl a través de un modelo de Respuesta en superficie.

2.7.4.2.2. MODELOS DE RAÍZ CUADRADA

Los modelos de Raíz Cuadrada se desarrollaron para describir el efecto de la Temperatura sobre la μ_{max} . Este tipo de modelo asumió una relación lineal entre la Temperatura y la raíz cuadrada de μ_{max} en un rango de Temperaturas subóptimas. Inicialmente, Ratkowsky y col. (1982) propusieron la siguiente función (Ecuación 13):

$$\sqrt{\mu_{max}} = b(T - T_{min}) \quad \text{Ec.13}$$

Donde, b es una constante, T es la Temperatura y T_{min} es la Temperatura mínima teórica para el crecimiento. Posteriormente la ecuación fue ampliada (Ecuación 14) con el objeto de describir el efecto de la Temperatura en un rango que permitiera el crecimiento bacteriano, el llamado “rango biocinético,” propuesto por Ratkowsky y col. (1983):

$$\sqrt{\mu_{max}} = b(T - T_{min}) \left(1 - \exp(c(T - T_{max})) \right) \quad \text{Ec.14}$$

Donde, T_{max} es la Temperatura máxima teórica para el crecimiento y c es un parámetro del modelo sin significación biológica.

Los modelos de Raíz Cuadrada se continuaron ampliando con la finalidad de incluir otros factores medioambientales como el pH, la a_w , entre otros, para obtener predicciones más seguras. Por ejemplo, en el estudio realizado por McMeekin y col. (1987), utilizaron la siguiente ecuación para describir los efectos combinados de la Temperatura y la a_w sobre la μ_{max} de *Staphylococcus xylosum*:

$$\sqrt{\mu_{max}} = b(T - T_{min})\sqrt{(a_w - a_{wmin})} \quad \text{Ec.15}$$

Donde, a_{wmin} es la actividad de agua mínima teórica para el crecimiento.

También se conocen otros estudios científicos como el de Devlieghere y col. (1998), Presser y col. (1997) y Ross y col. (2003) en los que se describieron los efectos de otros factores como el CO₂, el pH o ácido láctico, respectivamente.

2.7.4.2.3. MODELO DE PARÁMETRO CARDINAL Y CONCEPTO GAMMA

El modelo Gamma fue propuesto por Zwietering y col. (1992) para describir la μ_{max} respecto a su valor máximo en condiciones óptimas para el crecimiento

El concepto subyacente de este modelo (concepto Gamma) se basa en los siguientes supuestos: el efecto de cualquier factor sobre la μ_{max} puede ser descrito como una fracción de su tasa de crecimiento en condiciones óptimas (μ_{opt}), usando una función Gamma (γ) normalizada entre 0 (indica no crecimiento) y 1 (indica condiciones óptimas de crecimiento); y los factores ambientales actúan independientemente sobre la tasa de crecimiento bacteriano. En este sentido, el modelo es capaz de predecir los efectos combinados de los factores ambientales, mediante la multiplicación de los efectos individuales de cada factor.

En condiciones óptimas para el crecimiento, todos los términos Gamma (γ) son iguales a 1 y entonces $\mu_{max} = \mu_{opt}$.

Por su parte Rosso y col. (1993,1995) incorporaron el concepto Gamma a un modelo de parámetros cardinales, con el objeto de describir los efectos de la Temperatura, el pH y la a_w sobre μ_{max} .

Otros estudios, sin embargo han utilizado el modelo de Parámetros Cardinales para describir el efecto de los ácidos orgánicos y otras sustancias inhibitorias del crecimiento (Augustin y col., 2000a, 2000b; Le Marc y col., 2002; Coroller y col., 2003).

2.7.4.2.4. MODELOS DE PROBABILIDAD

Los modelos de interfaz de C/NC son aquellos modelos que tratan de cuantificar la probabilidad de crecimiento de un microorganismo o conjunto de microorganismos bajo unas condiciones medioambientales específicas; éstos permiten determinar las zonas límites de probabilidad de crecimiento microbiano por lo que también son conocidos como modelo de límite de crecimiento. Los modelos de Probabilidad permiten definir con cierta precisión la zona de C/NC microbianos utilizando uno o más factores de forma controlada para diseñar formulaciones adecuadas que inhiban el crecimiento de microorganismos (Ratkowsky y Ross, 1995; Presser y col., 1998; Salter y col., 2000; Stewart y col., 2001). Por ello, suelen ser los modelos usados para aplicar un tratamiento de conservación a un alimento mínimamente procesado, para la formulación de nuevos productos, y para orientar de un modo más preciso a los asesores de riesgo, de forma que determinen la contaminación real que existe en los alimentos de cara al consumidor (Presser y col., 1997), o se minimice el riesgo de crecimiento de un microorganismo patógeno (McMeekin y col., 2000).

Ratkowsky y Ross (1995) propusieron la aplicación de los modelos de Regresión Logística para poder relacionar la probabilidad de crecimiento con los factores ambientales. El enfoque incluye una modificación del modelo de Raíz Cuadrada para describir la influencia de varios factores como la Temperatura, el pH, la a_w y el nitrito, sobre la probabilidad de crecimiento microbiano (McMeekin y col., 1993):

$$\sqrt{\mu_{max}} = a_1 \cdot (T - T_{min}) \cdot \sqrt{(pH - pH_{min}) \cdot (a_w - a_{w_{min}}) \cdot (NO_{2_{max}} - NO_2)} \quad \text{Ec.16}$$

donde μ_{max} es la tasa máxima de crecimiento, h^{-1} ; T es la Temperatura, $^{\circ}C$; a_w es la actividad de agua y NO_2 es la concentración de nitrito (ppm). Los valores mínimos

son los valores teóricos en los que por encima de estos valores se produce el crecimiento. Por el contrario, los valores máximos son los valores teóricos en los que por debajo de ellos es permitido el crecimiento.

En tanto, la Regresión Logística contempla la sustitución de la raíz cuadrada de μ_{\max} por el término “Logit P”: (Ecuación 17):

$$\text{logit } P = \ln\left(\frac{P}{1-P}\right) \quad \text{Ec.17}$$

donde P se refiere a la probabilidad de crecimiento (entre 0 (No crecimiento) y 1(crecimiento)); quedando la Ecuación 18 de la siguiente forma:

$$\text{logit } P = b_0 + b_1 \cdot T + b_2 \cdot pH + b_3 \cdot T \cdot pH + b_4 \cdot T^2 + b_5 \cdot pH^2 \quad \text{Ec.18}$$

Donde, b_0 , b_1 , b_2 , b_3 y b_4 son los coeficientes de regresión del modelo, y T es la Temperatura. Estos modelos predicen una respuesta binaria definida como la probabilidad de ocurrencia de un evento en términos de un conjunto específicos de variables explicativas relacionadas con ella (Salter y col., 2000; Tienungoon y col., 2000).

En la literatura científica se conoce un amplio estudio sobre la utilización de los modelos de interfaz de C/NC para obtener información acerca del C/NC microbianos en superficies sólidas o en matrices alimentarias (Lanciotti y col., 2001; McKellar y col., 2002; Koutsoumanis y col., 2004; Mejlholm y col., 2010).

En la confección de los modelos de Probabilidad, algunos autores utilizan como punto de corte de interfaz de C/NC, $P = 0,5$ (esto significa un 50% de probabilidad de crecimiento) (Masana y Baranyi, 2000b), ello supone la obtención de predicciones menos seguras en caso de contaminación por patógenos (Salter y col., 2000). Para el caso de microorganismos patógenos, resulta conveniente fijar niveles de probabilidad que delimiten la interfaz de C/NC en valores bajos, de forma que se minimicen los casos de falsos negativos (crecimiento observado y no crecimiento estimado).

En la Publicación 4 de la presente Tesis, los modelos de Probabilidad de crecimiento permitieron estimar los límites de crecimiento en caldo de cultivo de una cepa de *E. coli* O158:H23 en función de diferentes condiciones de pH, a_w , Temperaturas y nivel de inóculo inicial; y se consideró el valor límite de C/NC de 0,01 de cara a la obtención de predicciones más fiables.

Otros estudios han comprobado que los niveles mínimos de factores ambientales de Temperatura, pH, a_w que delimitan la interfaz de C/NC microbiana se han visto influenciados por otros factores, entre los que se encuentra el nivel de inóculo. Koutsoumanis y Sofos (2005) y Skandamis y col. (2007), estudiaron la adaptación de *E. coli* O157:H7 a diferentes concentraciones de ácidos orgánicos y pH y evidenciaron crecimiento en condiciones más limitantes, a mayores niveles de inóculo inicial.

Los modelos de C/NC predicen una zona de transición abrupta entre las condiciones de crecimiento y no crecimiento; este hecho ocurre debido a una pequeña cantidad de repeticiones (n) en comparación con el número de condiciones analizadas. En esta situación, se evidencian dificultades para aplicar un modelo de Regresión Logística, especialmente cuando se alcanza una convergencia para las condiciones óptimas globales o para un conjunto apropiado de condiciones (Ratkowsky, 2002) a menos que sean usados procedimientos alternativos (Geeraerd y col., 2004).

Al aumentar el número de repeticiones (n~ entre 20 o 30) se pueden alcanzar transiciones más suaves entre las zonas de C/NC. Varios autores han comprobado que mediante esta metodología la probabilidad de crecimiento no cambia drásticamente a lo largo de un conjunto limitado de condiciones y puede proporcionar respuestas de C/NC más fiables (Vermeulen y col., 2007; Valero y col., 2009).

Además, existe una tendencia creciente a utilizar un cóctel de cepas a fin de predecir un comportamiento microbiano más realista, en los alimentos. Según Vermeulen y col. (2007), para el caso de los modelos de C/NC, el uso de diferentes cepas permite

evaluar con mayor precisión las condiciones limitantes para el crecimiento que suelen diseñarse en función de las respuestas microbianas de la cepa más resistente. Este hecho se ha tenido en cuenta en otros estudios para su utilización en la ERM (Lindqvist, 2006).

2.7.4.3. MODELOS TERCIARIOS

Los modelos Terciarios son aplicaciones de uno o más modelos Primarios y Secundarios, incorporados a softwares informáticos a nivel de usuario, cuyo uso facilita la aplicación de dichas las ecuaciones matemáticas. Actualmente existen varios paquetes informáticos o softwares de modelización microbiana, que varían en complejidad, desde una sencilla ecuación en una hoja de cálculo, a sistemas expertos o programas de simulación de la evaluación del riesgo. En general, los usuarios de estos programas no necesitan estar preparados en las técnicas de modelización predictiva y en este sentido hacen de la MP una herramienta fácilmente accesible y poderosa para todas las áreas de la investigación e industria de los alimentos (Buchanan, 1993; Whiting y Buchanan, 1993, 1994; Whiting, 1995). Entre los modelos Terciarios más relevantes se describen:

2.7.4.3.1. PATHOGEN MODELING PROGRAM (PMP)

El programa PMP fue creado en los Estados Unidos por el USDA-ARS (Eastern Regional Research Center, Microbial Food Safety Research Unit). La versión actual del software, incluye más de 40 modelos para diferentes patógenos y posibilita las predicciones de crecimiento e inactivación en función de la acción combinada de diferentes factores ambientales como la Temperatura, pH, NaCl, nitrito de sodio (NANO₂) (ppm) y nivel de inóculo inicial. Además, incluye los modelos que predicen el efecto de condiciones dinámicas de enfriamiento tras la cocción sobre el posterior crecimiento de *Cl. Botulinum* y *Cl. Perfringens* en alimentos. Permite exportar los resultados obtenidos y proporciona un listado de referencias de los estudios desarrollados. El software está disponible on-line de forma gratuita (<http://portal.arserrc.gov/>). El software ha estado disponible durante más de 20 años

y su perfeccionamiento y actualización se realiza de forma periódica; en el 2007 se integró al Portal de Información de MP. La Figura 14, muestra la captura de pantalla del software PMP:

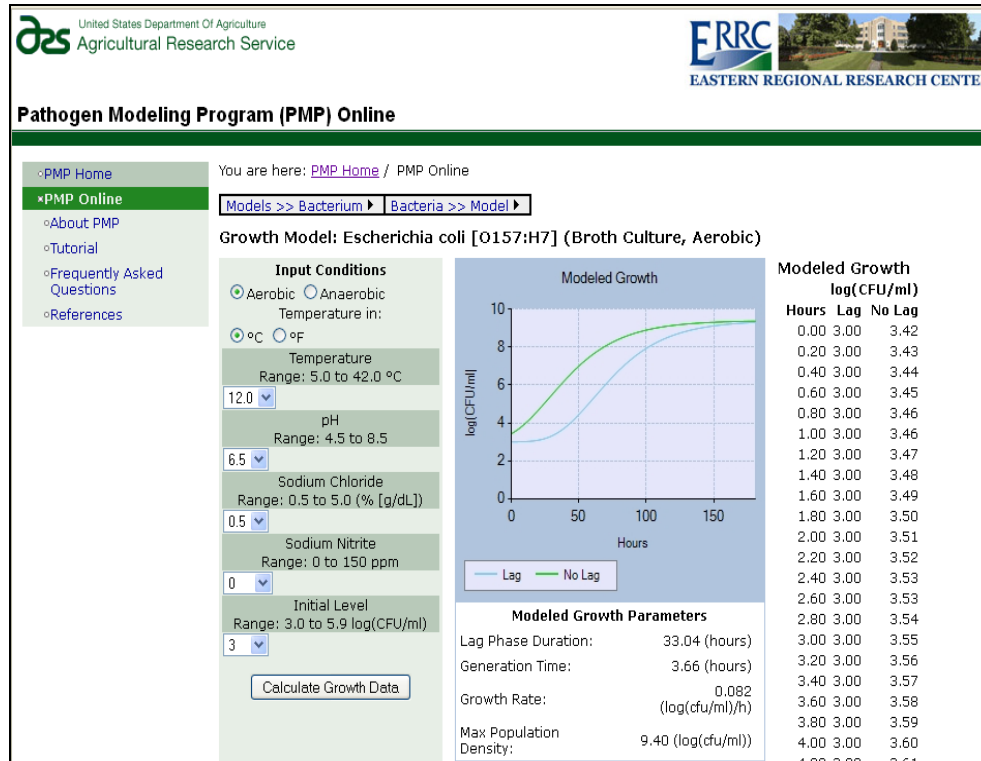


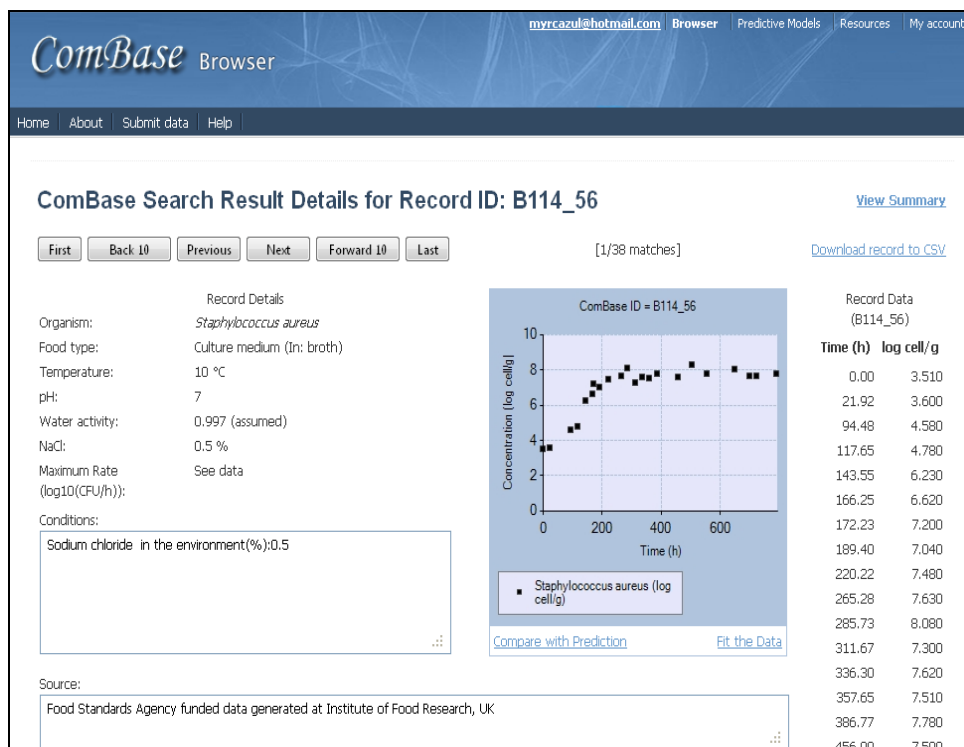
Figura 14. Captura de pantalla de PMP.

2.7.4.3.2. COMBASE

El software ComBase fue desarrollado por el Instituto de Investigación Alimentaria del Reino Unido (IFR, UK) y luego pasó a formar parte de un consorcio con el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (siglas en inglés USDA-ARS) y con el Centro de Seguridad Alimentaria (siglas en inglés FSC) de la Universidad de Tasmania y Australia. Es una base de datos que contempla multitud de registros acerca de respuestas de crecimiento, inactivación y supervivencia microbianos ismos en una amplia variedad de ambientes (medios de cultivo y matrices alimentarias) y proporciona una recopilación de los modelos predictivos más relevantes. Se encuentra disponible gratuitamente on-line (<http://www.combase.cc/index.php/en/>). En la actualidad, las herramientas de predicciones disponibles en el software, incluyen las siguientes aplicaciones:

- ✓ ComBase Browser: Es la base de datos de miles de curvas de crecimiento e inactivación, recopiladas en los centros de investigación y de las Publicaciones científicas.
- ✓ ComBase Predictor: Es un conjunto de 23 modelos de crecimiento y 6 modelos de destrucción térmica, para predecir el comportamiento de diversos microorganismos patógenos y alterantes frente a un conjunto de factores ambientales. Existe una versión Demo de Combase en Excel que se puede descargar de forma gratuita a través de la página web.
- ✓ Perfringens Predictor: Es una aplicación especialmente diseñada para predecir el crecimiento de *Cl. perfringens* durante la refrigeración de carne sometida a proceso de cocción. La versión en Excel de la aplicación, también se puede encontrar en la sección de descargas de la página web.

La Figura 15, muestra las capturas de pantalla del ComBase:



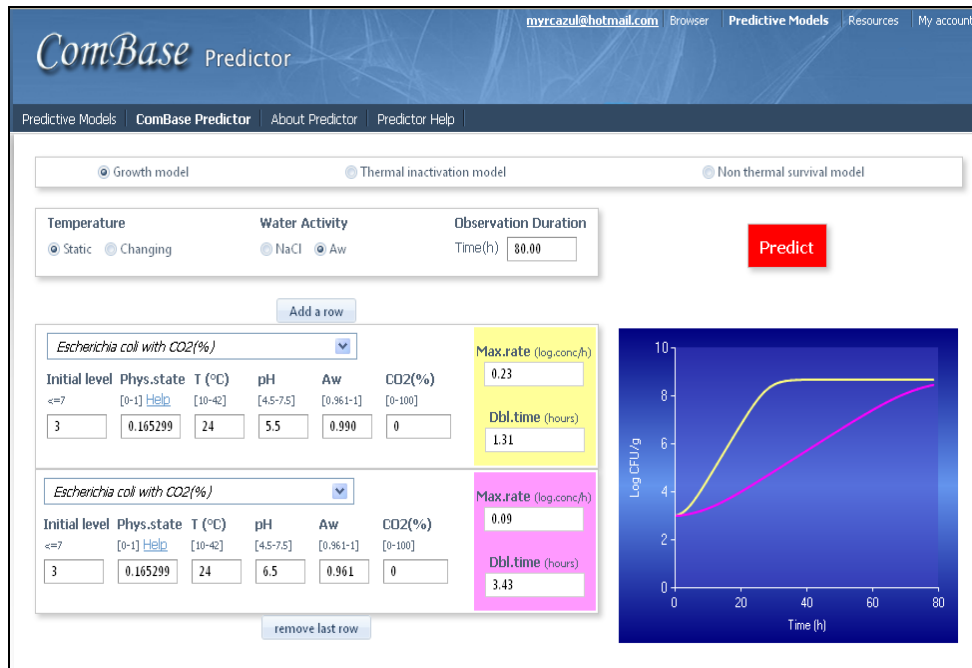


Figura 15. Capturas de pantallas del software ComBase Browser y ComBase Predictor.

2.7.4.3.3. SYM'PREVIUS

Este software se desarrolló en Francia con el objeto de proporcionar ayuda en la toma de decisiones en materia de seguridad alimentaria. Incluye una base de datos y una herramienta de simulación del crecimiento, supervivencia/inactivación C/NC de microorganismos patógenos y alterantes. La información del software Sym'Previus también está disponible de forma comercial on-line (<http://www.symprevius.org/>).

2.7.4.3.4. SEAFOOD SPOILAGE AND SAFETY PREDICTOR (SSSP)

El software SSSP fue desarrollado por el Instituto Nacional de Recursos Pesqueros de Dinamarca, con el objeto de facilitar el uso práctico de los modelos matemáticos para predecir la vida útil y el crecimiento de bacterias patógenas y alterantes en productos pesqueros, especialmente productos RTE (Figura 16). El software incluye varios modelos cinéticos que predicen la velocidad de deterioro de productos pesqueros específicos, así como diversos módulos de validación y comparación de modelos. Asimismo, le permite al usuario predecir el crecimiento y producción de histamina causada por *Morganella psychrotolerans* y *Morganella morgani*. Por último, el software contempla un modelo de C/NC y otro modelo de interacción para predecir

el crecimiento de *L. monocytogenes* y *BAL*. El software se puede descargar gratuitamente en la página siguiente: http://sssp.dtuqua.dk/HTML_Pages/Help/English/Index.htm.

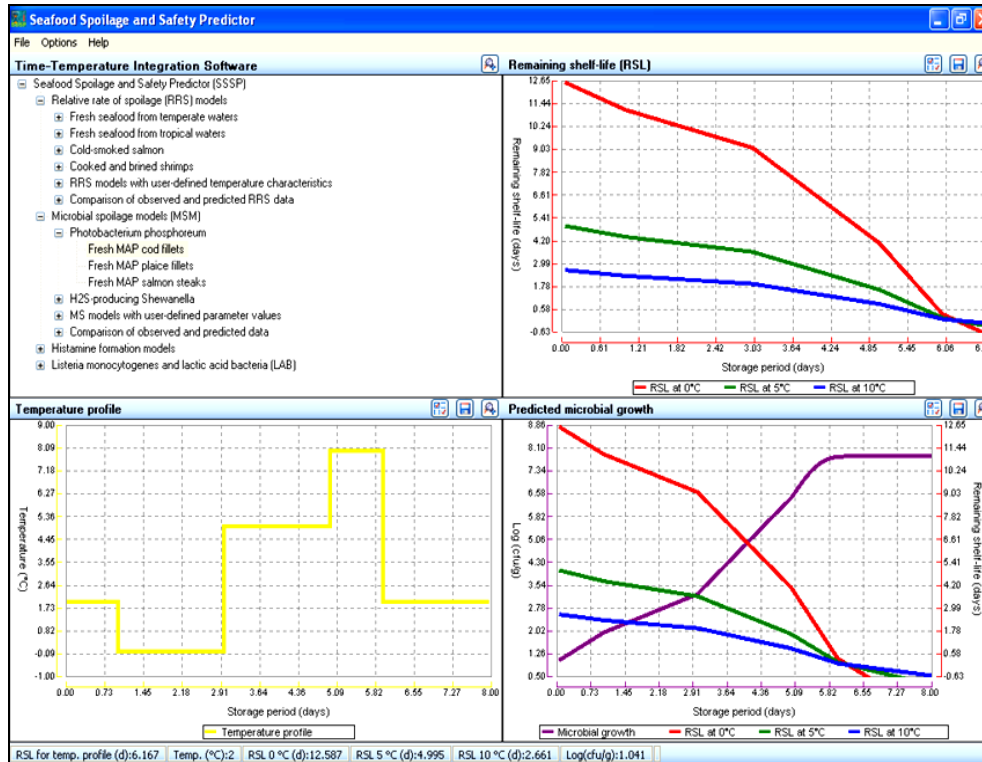


Figura 16. Captura de pantalla del software SSSP.

2.7.4.3.5. MICROBIAL RESPONSES VIEWER (MRV)

El software MRV es una base de datos, formado por datos de C/NC de 16 microorganismos diferentes, derivados de ComBase. El software muestra un gráfico de contorno en dos dimensiones con datos de C/NC microbianos en función de varios factores ambientales (Temperatura, el pH y a_w), basado en un modelo log lineal de Poisson, que es una familia de modelos Lineales generalizados (Figura 17). El software permite al usuario visualizar rápidamente el gráfico de contorno con las estimaciones del modelo de C/NC, conjuntamente con los datos de crecimiento aportados por el ComBase (<http://mrv.nfri.affrc.go.jp/Default.aspx#/Home>):

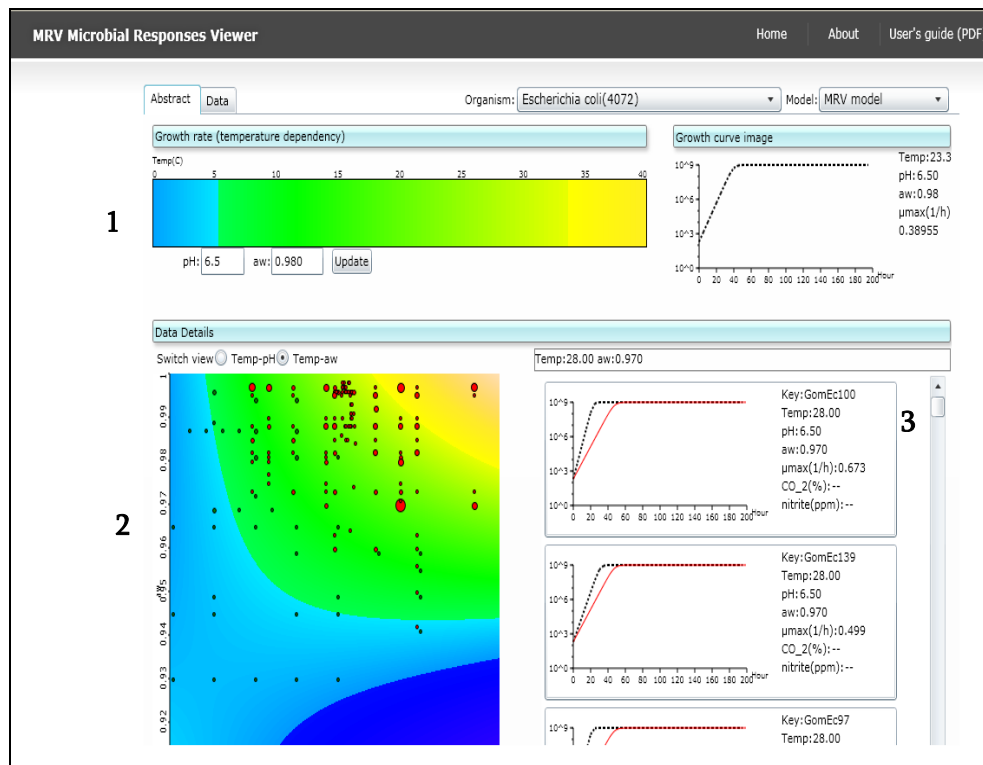


Figura 17. Captura de pantalla del software *MRV*. 1: Crecimiento estimado por el modelo, 2: Datos de C/NC (puntos rojos (crecimiento), puntos verdes (no crecimiento)); 3: Visualización de los datos registrados por el software ComBase (en correspondencia con los puntos rojos o verdes)

2.7.4.3.6. MICROHIBRO

Es una nueva herramienta de predicción on-line para productos vegetales y cárnicos RTE. Ha sido creada en 2012 por el grupo de investigación HIBRO de la Universidad de Córdoba. La aplicación incorpora diferentes modelos predictivos para un variado número de microorganismos y alimentos que permiten que el usuario pueda obtener datos de predicciones de crecimiento y supervivencia de los microorganismos bajo condiciones ambientales seleccionadas, tal y como se representa en la Figura 18.

MicroHibro a su vez permite incluir cualquier tipo de función que permite su fácil actualización y que por tanto convierten a herramienta en dinámica. Asimismo permite a los expertos en microbiología predictiva poner a disposición de los usuarios finales, sus modelos predictivos o resultados. Este software es fácilmente accesible luego de su correspondiente registro como usuario en la página web: <http://www.microhibro.com>. También incorpora un módulo de validación para permitirá los usuarios evaluar los modelos disponibles con sus propios datos. Por último, la aplicación tiene un enfoque estocástico destinado a la evaluación de riesgo

para llevar a cabo modelos probabilísticos de riesgo. Los resultados se muestran mediante una adecuada interfaz gráfica para mejorar la interpretación y el análisis de datos:

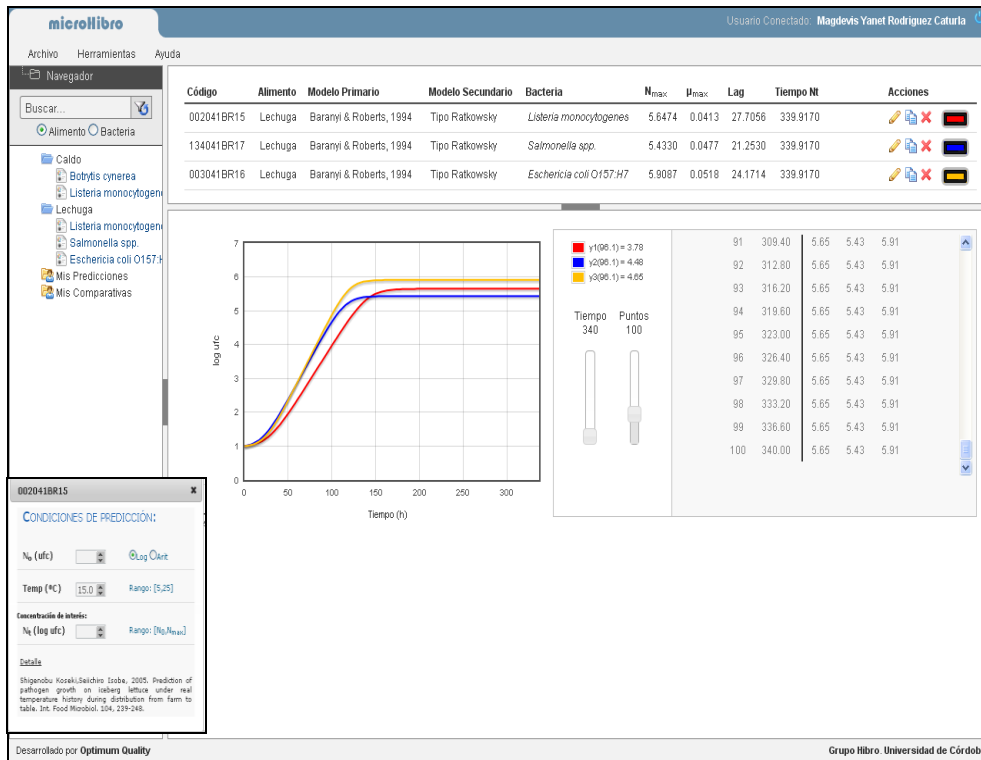


Figura 18. Captura de pantalla de la aplicación informática microHibro

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Los nuevos estilos de vida de la sociedad traen consigo cambios en los patrones de consumo caracterizados por una mayor demanda de alimentos de elevada calidad organoléptica, saludables, seguros y de fácil y rápida preparación y consumo. En España, estos cambios han originado un aumento considerable del consumo de alimentos fuera del hogar donde la restauración colectiva juega un rol muy importante de cara a ofrecer un servicio eficaz para satisfacer esta demanda social. Sin embargo, a través de muchos estudios se ha comprobado que en este ámbito pueden existir incumplimientos y/o desconocimiento acerca de las buenas prácticas de manipulación de los alimentos y del mantenimiento de las condiciones higiénicas y sanitarias en las cocinas centrales, lo cual puede contribuir a la producción y distribución de alimentos no aptos o seguros para el consumidor. Precisamente, uno de los sectores de la población más afectados por toxiinfecciones alimentarias son los niños, los ancianos, los enfermos, las personas inmunodeprimidas, las embarazadas, etc., pese a ello en España se dispone de poca información de carácter científico, relativa a las condiciones de los establecimientos de restauración dedicados al servicio de alimentos destinados a este tipo de consumidores que habitualmente sí realizan alguna de sus comidas en estos centros.

La contaminación de los alimentos preparados por microorganismos patógenos y/o indicadores se produce consecuentemente a la recepción de materias primas contaminadas, la incorrecta manipulación de los alimentos en las cocinas centrales, o unas condiciones de almacenamiento y distribución inadecuadas. En este sentido, se antoja esencial el uso de herramientas que puedan cuantificar el comportamiento microbiano bajo dichas condiciones, con la finalidad de prevenir la aparición de toxiinfecciones alimentarias. Dos de los microorganismos comúnmente asociados a platos preparados a base de vegetales y cárnicos cocidos son las cepas patogénicas de *E. coli* y *S. aureus* enterotoxigénico, respectivamente; sin embargo, se existe una reducida información acerca del impacto de las condiciones de elaboración, almacenamiento y distribución propias de los servicios de restauración colectiva

sobre el comportamiento de estos microorganismos en dichos alimentos. Para ello, la microbiología predictiva se ha constituido como un elemento diferenciador, que ha servido de base a industriales, inspectores y gestores del riesgo microbiológico para poder aplicarse en productos y procesos específicos. Asimismo, el establecimiento de métodos alternativos de simulación puede servir para una mejor cuantificación de la variabilidad asociada al crecimiento de los microorganismos en condiciones concretas que pueden aparecer en los establecimientos de restauración. Así, la información obtenida puede representar un punto de partida para el establecimiento de los Objetivos de Seguridad Alimentaria dentro de un enfoque de Evaluación del Riesgo Microbiológico en los alimentos vulnerables.

OBJETIVO GENERAL

La presente Tesis Doctoral tiene como Objetivo General evaluar las condiciones higiénico-sanitarias y de seguridad microbiológica de los establecimientos de restauración colectiva de comedores escolares, geriátricos y hospitales, así como de platos mínimamente procesados y RTE (ensaladas y productos cárnicos cocidos), que son servidos en dichos establecimientos y destinados a su población consumidora más sensible ante los peligros microbiológicos y por lo tanto más susceptible de enfermar por razones de edad y estado de salud. Asimismo se pretende cuantificar el comportamiento de los microorganismos patógenos representativos en estos tipos de alimentos mediante el uso de herramientas de Microbiología Predictiva y ECRM.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluación de las condiciones higiénico-sanitarias, prácticas de manipulación y seguridad microbiológica de los establecimientos y platos de ensaladas vegetales y productos cárnicos cocidos RTE, servidos en comedores escolares, centros geriátricos y hospitales de Andalucía. (El presente objetivo se aborda en las Publicaciones 1, 2 y 3 de la presente Tesis);
2. Estudio de la cinética de crecimiento de serotipos patogénicos de *E. coli* a partir de mediciones turbidimétricas, bajo diferentes condiciones de pH, a_w , Temperatura y concentración de inóculo; y selección del serogrupo mejor adaptado (El mencionado objetivo se aborda en la Publicación 4, de la presente Tesis);
3. Evaluación del incremento logarítmico de *E. coli* en lechuga iceberg, bajo condiciones de almacenamiento habituales en los servicios de restauración colectiva a diferentes niveles de contaminación (Este objetivo se aborda en la Publicación 5, de la presente Tesis);
4. Estimación del comportamiento de *E. coli* a Temperaturas estáticas y la variabilidad potencial bajo perfiles dinámicos de tiempo/Temperatura de

almacenamiento mediante la aplicación de modelos predictivos de regresión Logística y el establecimiento de metodologías de Evaluación del Riesgo Microbiológicos. (Objetivo abordado en la Publicación 5, de la presente Tesis);

5. Estudio de la influencia de las condiciones de pre-incubación (Temperatura/pH/ a_w) de una cepa enterotoxiénica de *S. aureus* en caldo, sobre su capacidad de crecimiento y supervivencia y producción de enterotoxinas estafilocócicas A (SEA) en fiambre de pechuga de pollo cocida cortado en lonchas, almacenadas a diferentes condiciones de Temperatura (Abordado en la Publicación 6, de la presente Tesis).

4. RESULTADOS

PUBLICACIONES

PUBLICACIÓN 1:

Evaluation of hygiene practices and microbiological status of ready-to-eat vegetable salads in Spanish school canteens, *Journal of the Science of Food and Agriculture*; 2012, 92(11): 2332–2340.

PUBLICACIÓN 2:

Evaluation of food handler practices and microbiological status of ready-to-eat foods in long-term care facilities in Andalusia region of Spain, *Journal of Food Protection*; 2011, 74(9): 1504-1512.

PUBLICACIÓN 3:

Hygienic conditions and microbiological status of chilled ready-to-eat products served in Southern Spanish hospitals, *Food Control*; 2011, 22(6): 874-882.

PUBLICACIÓN 4:

Studying the growth boundary and subsequent time to growth of pathogenic *Escherichia coli* serotypes by turbidity measurements, *Food Microbiology*; 2010, 27 (6): 819–828.

PUBLICACIÓN 5:

Development of a risk-based methodology for estimating survival and growth of enteropathogenic *Escherichia coli* on iceberg-lettuce exposed at short-term storage in foodservice centers, *Journal of Microbiological Methods*; 2012, 90 (3): 273–279.

PUBLICACIÓN 6:

Effect of pre-incubation conditions on growth and survival of *Staphylococcus aureus* in sliced cooked chicken breast, *Meat Science*; 2012, 92(4): 409–416.

PUBLICACIÓN 1:

PUBLICACIÓN 1: EVALUACIÓN DE LAS PRÁCTICAS DE HIGIENE Y SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA DE ENSALADAS VEGETALES LISTAS PARA EL CONSUMO EN COMEDORES ESCOLARES EN ESPAÑA

EVALUATION OF HYGIENE PRACTICES AND MICROBIOLOGICAL STATUS OF READY-TO-EAT VEGETABLE SALADS IN SPANISH SCHOOL CANTEENS

PUBLICACIÓN 1: EVALUACIÓN DE LAS PRÁCTICAS DE HIGIENE Y SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA DE ENSALADAS VEGETALES LISTAS PARA EL CONSUMO EN COMEDORES ESCOLARES EN ESPAÑA

RESUMEN

El presente estudio se realizó con el objeto de evaluar las condiciones higiénicas-sanitarias y las prácticas de manipulación llevadas a cabo en centros escolares andaluces, y su influencia en la calidad y seguridad microbiológica de las ensaladas vegetales listas para el consumo servidas en estos centros. Además, evaluar la higiene de las superficies de trabajo y la calidad ambiental de posibles zonas potencialmente contaminadas. Finalmente, con la información obtenida se proporcionaron las posibles medidas correctoras.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio en comedores escolares se realizó durante el período Septiembre de 2008 a Junio de 2009 e implicó a 8 comedores escolares de Andalucía (España). Se planificaron 5 visitas entre los horarios de 11:00 a 15:00h. Con la información obtenida de cada centro se confeccionaron los cuestionarios o “checklists” en correspondencia con las normas y regulaciones internacionales y europeas (Codex Alimentarius (2003); Reglamento comunitario 852/2004 *relativo a la higiene de los productos alimenticios*) y con la opinión de los expertos en calidad alimentaria de cada centro.

CUESTIONARIOS (CHECKLIST)

Se crearon un total de 5 checklists por centro (1/visita) y se desarrollaron mediante el método observacional por parte del evaluador, durante la etapa de preparación de alimentos. Las listas de comprobación se confeccionaron partiendo de 15 atributos y se dividieron en dos partes fundamentales que se evaluaron independientemente. Finalmente, se sumaron los resultados totales de las dos partes y de esta forma se evaluó cada centro como muestra la Tabla 1, del artículo publicado:

- 1) Primera parte (P1): relativa a los hábitos de los manipuladores de alimentos y el uso de equipos de cocina adecuados (atributos del 1–9). Los atributos fueron medidos en una escala de frecuencia (ocurrencia del atributo observado) de forma que las respuestas afirmativas se puntuaron con 1 y las negativas con 0.

2) Segunda Parte (P2): relativa a las condiciones higiénico-sanitarias y las prácticas de manipulación de los alimentos (atributos del 10-15). Los atributos se midieron en una escala del 0–4 (0: Pobre, 1: Deficiente, 2: Aceptable, 3: Bueno y 4: Excelente). Se halló el promedio de cada atributo y se sumaron los resultados obtenidos de las diferentes visitas a cada centro.

MUESTREO DE ALIMENTOS

Se tomaron 2 muestras de ensaladas vegetales por visita en cada comedor escolar, para un total de 80 muestras. La planificación del muestreo se realizó de forma que se tomaron muestras de los últimos platos servidos con el objeto de determinar la contaminación microbiana en el momento del consumo. En este caso, se tomaron muestras de ensaladas de lechuga (54), ensaladas mixtas de vegetales (18) y otras ensaladas (8) (de tomate, con mayonesa o de legumbres).

El t/T se midió durante la refrigeración de las materias primas (2h) y justo después de la distribución (1h), mediante un termómetro equipado con una sonda especial para alimentos sólidos (HI 95809-1, Hanna Instruments, Michigan, USA).

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LAS ENSALADAS VEGETALES LISTAS PARA EL CONSUMO

Las muestras de ensaladas vegetales se analizaron para los siguientes microorganismos: *AEM* (ISO 4833:1991), *CT* (ISO 4832:1991), *Staphylococcus* coagulasa positivo (ISO 6888-2:1999), *E. coli* (ISO 7251:2005) y para patógenos como *Listeria* sp (ISO 11290-2:1998) y *Salmonella* (ISO 6579:2002).

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LAS SUPERFICIES DE TRABAJO

Se analizaron 4 superficies de trabajo del área de procesado y estas fueron las mesas de trabajo, tablas de corte, fregaderos y grifos. El muestreo se realizó antes de la preparación de los alimentos, a razón de 1 muestra por visita obteniéndose un total de 160 muestras, mediante el método de hisopo tomando muestra de una superficie equivalente a 100cm² (10x10cm). En el caso de los grifos se muestreó el área aproximada en contacto con las manos de los manipuladores, teniendo en cuenta el área sugerida por Ren y col. (2011). Los microorganismos *AEM* y las *Enterobacterias* se utilizaron como microorganismos indicadores de higiene.

CALIDAD DEL AIRE

Las zonas analizadas fueron las consideradas como potencialmente contaminadas dada la actividad que se realizaba en ellas; así se tomaron muestras de la zona de procesado (cocina), fregadero y comedores donde se servían los platos RTE. Se

tomaron un total de 120 muestras en los centros evaluados. El muestreo del aire se llevó a cabo durante la preparación de los platos, mediante un método activo de muestreo a través de un succionador de aire (SAS Super 180, Scharlab, Barcelona, España) que permitió expresar el recuento microbiano en ufc/m³ (Pasquarella y col., 2000). La calidad del aire se determinó mediante el recuento de microorganismos indicadores como *AEM* y *Staphylococcus sp*; y el recuento de *AEM* se clasificó de acuerdo a las orientaciones aportadas por Al-Dagal y col. (1992) (Grado A (Excelente ≤ 100 ufc/m³), Grado B (Intermedio 100–300 ufc/m³) y Grado C (Deficiente > 300 ufc/m³)).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos estadísticos descriptivos (media, desviación estándar) se calcularon en Microsoft Excel 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA), correspondientes a los recuentos microbiológicos obtenidos, así como a los resultados de las puntuaciones de los cuestionarios y los datos de t/T.

Asimismo, se realizó la prueba Chi-cuadrado para identificar las diferencias significativas entre los 8 comedores, respecto a los atributos de la Parte 1 de la checklist. Las puntuaciones de la Parte 2 de la checklist se evaluaron mediante el coeficiente de Pearson (r), el cual se utilizó para hallar correlaciones significativas entre los atributos de la parte 2 con los recuentos microbiológicos hallados en los platos de ensalada, superficies de trabajo y aire.

Finalmente, las pruebas paramétricas (t de student, análisis de varianza y la prueba de Duncan) se realizaron para determinar si hubo diferencias significativas entre los 8 comedores escolares respecto a los datos microbiológicos obtenidos. Las diferencias significativas se calcularon para un nivel de confianza del 95% ($p = 0,05$).

RESULTADOS

CUESTIONARIOS (CHECKLIST)

Los resultados procedentes de las checklists demostraron que en los servicios de restauración escolares es muy frecuente el uso de guantes (85%), pero no así el cambio de guantes (8%). También se observó un alto porcentaje de lavado incorrecto de manos (35%), siendo incluso ausente por parte de los manipuladores de algunos centros. Asimismo, se detectó el uso de joyas por parte de algunos manipuladores durante la preparación de las ensaladas y de los delantales para limpieza de manos. No obstante, los utensilios de cocina y tablas de corte fueron considerados apropiados en la mayor parte de los centros evaluados.

Se evidenciaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los 8 comedores con respecto a los atributos de la primera parte de la checklist, exceptuándose el uso y el cambio de guantes (Tabla 1, artículo publicado). De forma global los resultados de la segunda parte de la checklist fueron aceptables puesto que la puntuación media superó los 2 puntos; aunque se evidenciaron ciertas deficiencias relativas a las prácticas de manipulación de los alimentos (1,78).

El coeficiente de correlación de Pearson demostró una fuerte correlación entre la limpieza de las superficies de trabajo y la higiene de las cocinas ($r = 0,652$).

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS PLATOS DE ENSALADAS VEGETALES

En general, los recuentos promedio de *AEM* en los platos de ensaladas vegetales no superaron los 6 log ufc/g. Los recuentos promedio más elevados se relacionaron con las muestras de ensaladas de lechuga y estuvieron en torno a 5 log ufc/g ($5,5 \pm 1,6$ log ufc/g). Es importante resaltar, que una de las muestras de ensalada de lechuga presentó niveles de contaminación de hasta 7 log ufc/g.

Los niveles de contaminación por *CT* promediaron recuentos por debajo de los 4 log ufc/g. Los recuentos más altos se evidenciaron en ensaladas de lechuga ($3,7 \pm 0,5$ log ufc/g) y ensaladas mixtas de vegetales ($3,8 \pm 0,6$ log ufc/g).

Los recuentos promedio de *Staphylococcus* coagulasa positivos fueron inferiores a 2 log ufc/g en todas las muestras de ensaladas de lechuga, aunque existieron muestras con recuentos de hasta 2,5 log ufc/g. Como se puede ver en la Tabla 2 del artículo publicado, los recuentos más bajos se hallaron en las ensaladas mixtas de vegetales y otros ingredientes.

Del total de muestras de ensaladas (80), 4 muestras (2 muestras de ensaladas de lechuga y 2 muestras de ensaladas mixtas de vegetales) resultaron positivas a *E. coli*. Por otra parte, no se evidenció la contaminación por patógenos como *L. monocytogenes* y *Salmonella* sp.

Las mediciones de los t/T de refrigeración indicaron que los valores promedios de almacenamiento de las materias primas fue de $5,6 \pm 3,1$ °C/2h, los valores promedios durante el procesado fueron de $20,6 \pm 4,8$ °C/1h y justo después de las distribución fue de $14,1 \pm 4,3$ °C/1h.

CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LAS SUPERFICIES DE CONTACTO CON LOS ALIMENTOS

Los recuentos en las superficies de trabajo presentaron una alta variabilidad, probablemente debido a los cambios en la frecuencia y los procedimientos de limpieza de cada centro. Los niveles promedio de contaminación se muestran en la Tabla 3 del artículo publicado.

Las mesas de trabajo presentaron recuentos promedio de *AEM* inferiores a 10 ufc/cm² en la mayor parte de las muestras analizadas, con valores máximos de 70,79 ± 4,90 ufc/cm², lo que sugiere que las medidas de limpieza y desinfección no fueron siempre apropiadas. En la mayoría de comedores, los niveles de *Enterobacterias* estuvieron por debajo de 1 ufc/cm², incluso se hallaron muestras negativas. El recuento más alto de *Enterobacterias* en las mesas de trabajo fue de 2,73 ± 0,32 log ufc/cm².

En las tablas de corte, los recuentos de *AEM* estuvieron comprendidos entre 1,10 ± 0,55 y 16,90 ± 1,53 ufc/cm². La mayoría de las muestras analizadas para *Enterobacterias* superaron los valores de 1 ufc/cm² y los niveles más altos se correspondieron con 4,19 ± 0,45 ufc/cm²; aunque hubo comedores cuyas muestras resultaron negativas.

En los fregaderos se hallaron diferencias significativas en cuanto a los niveles de contaminación por *AEM*. Los recuentos promedios más altos oscilaron entre 18,62 ± 9,80 y 73,11 ± 16,09 ufc/cm². La contaminación por *Enterobacterias* también alcanzó los 4,19 ± 0,46 ufc/cm² como recuentos promedio más altos.

Los grifos se consideraron una fuente potencial de contaminación microbiana y por tanto una posible vía de contaminación cruzada. Los niveles de contaminación por *AEM* y *Enterobacterias* fueron sustancialmente superiores que el resto de superficies. De hecho, la mayoría de las muestras presentaron recuentos promedios de *AEM* mayores de 300 ufc/cm² y de *Enterobacterias* superiores a 10 ufc/cm².

El coeficiente de correlación de Pearson estableció una correlación negativa ($p < 0,05$) entre los niveles de contaminación por *AEM* ($r = -0,400$) y *Enterobacterias* ($r = -0,490$) de las mesas de trabajo y el grado de limpieza de las cocinas. Asimismo, se evidenció una correlación significativa entre el uso de tablas de corte apropiadas y los niveles microbianos hallados de *AEM* ($r = -0,366$) y de *Enterobacterias* ($r = -0,329$).

CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AIRE

Los resultados de los recuentos microbiológicos de las muestras analizadas de aire se muestran en la Tabla 4 del artículo publicado. No se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$) respecto a los recuentos de *AEM* hallados en los comedores escolares. En todas las zonas de procesado, la mayoría de las muestras de aire superaron 300 ufc/m³ y fueron clasificadas como Deficientes. Las muestras procedentes de la zona de fregaderos, fueron también catalogadas como Deficientes para *AEM*. Sólo dos comedores presentaron recuentos inferiores a 300 ufc/m³ (249 ± 281 ufc/m³ y 288 ± 191 ufc/m³). En los comedores, la mayoría de las muestras se clasificaron de Intermedias y los recuentos oscilaron entre 118 ± 46 y 268 ± 88 ufc/m³.

Con respecto a los recuentos de *Staphylococcus* sp, los resultados mostraron la existencia de variabilidad entre comedores. De entre los 8 comedores evaluados, 2 presentaron niveles de contaminación superiores a 100 ufc/m³ en las tres zonas analizadas e incluso se hallaron recuentos en comedores que alcanzaron niveles promedio de hasta 156 ± 113 ufc/m³.

Se hallaron correlaciones significativas entre los niveles de contaminación por *AEM* comprobados en la zona de los fregaderos, con el grado de limpieza de las superficies de trabajo ($r = 0,33$) y la limpieza de los utensilios de cocina y los equipos ($r = 0,32$). Así, los recuentos de *Staphylococcus* sp procedentes de las áreas de procesado de alimentos se correlacionaron con las prácticas de manipulación ($r = - 0,39$), con la limpieza de los utensilios de cocina y los equipos ($r = - 0,37$) y con la higiene de las cocinas ($r = - 0,36$). Estos resultados sugieren la posible existencia de contaminación cruzada entre aire-manipuladores-superficies de contacto-alimento.

Research Article

Received: 24 June 2011

Revised: 11 October 2011

Accepted: 26 January 2012

Published online in Wiley Online Library: 14 March 2012

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jsfa.5634

Evaluation of hygiene practices and microbiological status of ready-to-eat vegetable salads in Spanish school canteens

Magdevis Y Rodríguez-Caturla,* Antonio Valero, Elena Carrasco, Guiomar D Posada, Rosa M García-Gimeno and Gonzalo Zurera

Abstract

BACKGROUND: This study was conducted in eight Spanish school canteens during the period 2008–2009. Food handlers' practices, kitchen equipment, hygiene/sanitation conditions and handling practices were evaluated using checklists. In parallel, the microbiological quality and safety of ready-to-eat (RTE) vegetable salads were assessed. In addition, food contact surfaces and environmental air quality of different areas were analysed. The study determined the relationship between the microbiological quality of RTE foods and food handling practices, together with the degree of contamination of working surfaces and environmental contamination of processing and distribution areas.

RESULTS: Some deficiencies were found regarding the use and change of gloves, hand-washing and cleanliness of working surfaces. The microbial levels detected in the foods examined indicated the absence of pathogens in the samples analysed. Surface counts were higher on cutting boards and faucets, showing insufficient cleanliness procedures.

CONCLUSION: This study constitutes a descriptive analysis of the hygiene/sanitation conditions implemented in food service systems in eight Spanish school canteens. The results should help risk managers to better define control measures to be adopted in order to prevent foodborne infections.

© 2012 Society of Chemical Industry

Keywords: school canteens; checklist; microbial quality; ready-to-eat salads; hygiene conditions

INTRODUCTION

An improvement in catering businesses has been made in recent years based on the implementation of the principles of the Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) system.¹ Food safety preventive measures have been focused on training handlers in hygiene practices and on improving the sanitary quality of meals.^{2–4} In this respect the use of checklists and/or questionnaires in food catering services is valuable for the surveillance of HACCP systems.⁵

In Europe, more than 59% of foodborne disease outbreaks between 1993 and 1998 were attributed to catering businesses.⁶ A similar trend occurred in Spain, where 1782 outbreaks (55%) were attributed to food catering services during 2004–2007. This fact highlights that the impact of preventive measures in the last few years has not been as effective as expected.⁷ Moreover, it seems to be necessary to strengthen food hygiene practices and compliance with the HACCP system in order to prevent such foodborne disease outbreaks.⁸

Special attention should be paid to food services destined for susceptible population groups, such as school canteens, because children are more likely to become ill when exposed to foodborne agents.^{9,10}

Some studies consider that the top five risk factors of foodborne disease outbreaks in food service operations include improper holding temperatures, inadequate cooking, contaminated

equipment, purchase/receipt of food from unsafe sources and poor personal hygiene. These are all directly related to food handler error and can be prevented if food handlers follow proper food safety practices.^{11–13}

The role of hand-washing in the presence and transfer of bacteria has been studied in a variety of settings, including hospitals,¹⁴ food service facilities,^{15–18} assisted living facilities¹⁹ and child care locations.²⁰ The faecal/oral transmission pathway from food service workers to customers is a hazard where hand-washing can be a preventive control point.

On the other hand, inadequate cleaning or disinfection of food contact surfaces also represents a risk factor for contamination.²¹ For many foods, especially ready-to-eat (RTE) foods, the cleanliness of food contact surfaces is considered critically important.²²

Researchers agree that food training is effective in increasing sanitation scores relating to the microbiological quality of food.^{23–26} However, it has been found that food service managers and employees receiving training on proper food handling

* Correspondence to: Magdevis Y Rodríguez-Caturla, Department of Food Science and Technology, University of Cordoba, Campus Rabanales, Edif. Charles Darwin, E-14014 Cordoba, Spain. E-mail: myrcazul@hotmail.com

Department of Food Science and Technology, University of Cordoba, Campus Rabanales, Edif. Charles Darwin, E-14014 Cordoba, Spain

practices and adequate food safety knowledge do not always translate this into improved behaviour.^{27–30} Therefore many authors have used various questionnaires to obtain real information about food handlers' practices.^{3,31–34}

Ready-to-eat vegetable salads are among the most popular food commodities owing to their convenience and acceptance by consumers.³⁵ However, these foods can be subjected to temperature/time abuses during processing and distribution, together with poor handling practices. In addition, it is well recognised that RTE vegetable salads are susceptible to the presence of high microbial contamination, since they are not subjected to further treatments that could eliminate or reduce microbial load.³⁶

Also, inadequate food preparation practices can lead to cross-contamination events.³⁷ Regarding this, the transmission of enteric pathogens and other microbial hazards to RTE foods through air, contaminated utensils or food contact surfaces is also widely reported.^{38,39}

On the other hand, it is important to note that, although the air does not represent a true ecosystem whereby micro-organisms can grow and reproduce, it does contain microbial forms in suspension coming from soil, water, plants or animals, including humans.^{40,41} Besides, the aerosolisation of micro-organisms in food service systems may occur through people in an area, moving parts (machinery), raw materials, poor separation between areas, open drains, condensation, establishment design, poor hygiene and/or dust.⁴²

Some studies highlight the importance of airborne contamination as a possible way of cross-contamination, especially in industrial processing plants,^{43–46} slaughterhouses^{47,48} and hospitals.^{33,49–52} However, to the best of our knowledge, few studies have considered the impact of airborne contamination on microbial food quality and safety in school canteens.

This study was undertaken in eight school canteens in southern Spain in order to evaluate hygiene/sanitation conditions and handling practices to determine their influence on the microbial quality and safety of RTE vegetable salads served. Also, the status of food contact surfaces was measured together with the environmental quality of potentially contaminated areas. Then, with the information obtained, conclusions regarding potential corrective measures to be applied were provided.

MATERIALS AND METHODS

The survey was conducted from September 2008 to June 2009 and involved eight school canteens (A–H) in the Andalusia region of Spain. Each canteen was visited five times during the experiment. Visits were previously arranged (through the establishment of a confidential agreement) with the person responsible and were made in the middle of the week from 11:00 to 15:00 by the same trained person in order to avoid variability in the evaluation procedures. In addition, food handlers were not informed about the day of the visit, because this would have produced a biased false behaviour when evaluated.

With the information obtained, a checklist was developed based on the observance of principles and rules of international guidelines and regulations^{53,54} and the opinion of the person responsible for food quality in each centre.

Checklist

With the checklist developed, data were collected for 15 attributes and structured in two parts. Part 1 (P1) concerned

handlers' practices and kitchen equipment and was based on yes/no (score 1/0) questions (attributes 1–9). Part 2 (P2) was related to hygiene/sanitation conditions and handling practices and included semi-quantitative scores (attributes 10–15). Five checklists per centre were filled out (one checklist per visit).

The two parts were evaluated independently, since the measurement units of attributes were different. In P1, attributes were measured as frequencies (occurrence of observed attribute). A description of how the attributes were considered to be accomplished (score 1) or not (score 0) is detailed below (attribute numbers are shown in parentheses).

- Use of gloves (1) and change of gloves (2): if we observed that the handler used one pair of gloves and changed them at least once during food preparation. In this question it was assumed as positive (score 1) if the food handler used gloves when preparing salads and changed them at least once during the examination period.
- Correct hand-washing (3): if the handler washed their hands by applying soap and water, rubbing them together vigorously, rinsing them with clean water and thoroughly drying them with an air dryer or using a single-use towel or a clean, unused towel.
- Use of hair net (4): if we observed that the handler used a hair net covering all hairs during food preparation.
- Wearing jewelry (5): if the handler wore rings, bracelets, watches or any other object contacting food (however, wedding bands were allowed).
- Use of apron for cleaning hands (6) and use of the same cloth for cleaning different surfaces (7): both were considered incorrect practices. These were evaluated if observed at least once during food preparation.
- Proper cutting board (8) and proper cooking utensils and slicing machine (9): if the cutting board was made of plastic and/or polypropylene material and if the slicing machines and cooking utensils were made of stainless steel.

Concerning P2 of the checklist, different scores were assigned depending on the degree of cleanliness of handlers (including food handling) and food preparation areas. The attributes corresponding to P2 (10–15) were measured on a scale from 0 to 4 (0 = poor, 1 = deficient, 2 = acceptable, 3 = good, 4 = very good). The evaluation process was carried out by considering food hygiene requisites⁵³ and principles,⁵⁵ which helped to differentiate the scores to be assigned for each attribute evaluated. The main criteria followed to assign a specific score in P2 of the checklist are described below.

- Cleanliness of hands/gloves (10).
 - Score 2: acceptable, if hands were visibly cleaned but not washed or if gloves were used but not changed before preparing salads.
 - Score 3: good, if hands were cleaned and washed with tap water and if gloves were used and changed before preparing salads.
 - Score 4: very good, if hands were cleaned and washed with soap and if gloves were used and changed before preparing salads.
- Cleanliness of uniforms (11): this attribute was based on the frequency of laundering. This information was collected by the evaluator on each visit.
 - Score 2: acceptable, if uniforms were cleaned and laundered at least twice per week.

- Score 3: good, if uniforms were cleaned and laundered at least three times per week.
- Score 4: very good, if uniforms were cleaned and laundered daily.
- Correct food handling (12): food handlers were observed at a relatively short distance (3–4 cm away) in order not to interfere in their daily tasks. They were examined by the same trained person for 3–4 h. The number of food handlers observed per centre was four or five.
 - Score 2: acceptable, if food handling prevented cross-contamination (i.e. use of different cutting boards and utensils when handling raw and cooked products), raw ingredients were washed but salads were not promptly refrigerated.
 - Score 3: good, if food handling prevented cross-contamination (i.e. use of different cutting boards and utensils when handling raw and cooked products), raw ingredients were washed and disinfected but salads were not promptly refrigerated.
 - Score 4: very good, if food handling prevented cross-contamination (i.e. use of different cutting boards and utensils when handling raw and cooked products), raw ingredients were washed and disinfected and salads were promptly refrigerated.
- Cleanliness of working surfaces (13)/cleanliness of cooking utensils and equipment (14).
 - Score 2: acceptable, if they were washed with tap water and rinsed and visually free of dust, dirt, food residues and other debris before food handling (11:00).
 - Score 3: good, if they were washed with tap water, disinfected and rinsed and visually free of dust, dirt, food residues and other debris before food handling (11:00).
 - Score 4: very good, if they were washed with tap water, disinfected and rinsed and visually free of dust, dirt, food residues and other debris before food handling (11:00) and if additionally food contact surfaces and utensils were immediately washed after food handling (15:00).
- Kitchen hygiene (15).
 - Score 2: acceptable, if the design and layout permitted appropriate maintenance, cleaning and disinfection.
 - Score 3: good, if additionally the kitchen had a good hygienic design and construction, an appropriate location and the provision of adequate facilities.
 - Score 4: very good, if additionally the kitchen was adequately organised during food handling and staff contributed to the appropriate maintenance of cooking utensils, preventing food contamination.

From the scores of P2 of the checklist, the average values of each attribute were calculated and summed for each school canteen (total score of each school canteen).

Food sampling

Samples were collected when the last tray of the daily menu was served to children in order to estimate microbial load before consumption. Salad samples (~100 g) were aseptically taken from the tray with sterile tweezers. Two samples were collected per visit, giving a total of 80 samples over the duration of the study. Samples corresponded to lettuce salads (54), mixed vegetable (lettuce, tomato and onion) salads (18), tomato salads (four), mayonnaise-based deli salads (two) and bean salads (two). The last three were grouped within 'other salads'. Temperatures and times

were measured during storage of raw materials (2 h), processing (1 h) and just after distribution (1 h) using a food thermometer equipped with a special probe (HI 95 809-1, Hanna Instruments, Michigan, USA). Subsequently, samples were placed in plastic sterile bags and kept refrigerated (0–4 °C) during transportation to the laboratory (4 h from collection).

Microbial analyses of RTE vegetable salads

Prior to analysis, samples (25 g) were diluted in 225 mL of buffered peptone water (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) and homogenised in a Stomacher 400 Circulator blender (Seward, Worthing UK) for 2 min. When necessary, decimal dilutions were prepared in 85% physiological saline solution (Panreac, Barcelona Spain). The following microbial analyses were performed on the samples collected: mesophilic aerobic bacteria (MAB), ISO 4833:1991;⁵⁶ total coliforms (TC), ISO 4832:1991;⁵⁷ coagulase-positive staphylococci (CPS), ISO 6888-2:1999;⁵⁸ *Escherichia coli*, ISO 7251:2005;⁵⁹ *Listeria* spp., ISO 11 290-2:1998;⁶⁰ *Salmonella* spp., ISO 6579:2002.⁶¹

Microbial analyses of working surfaces

Four different working surfaces were monitored: working tables, cutting boards, sinks and faucets. The surfaces were swabbed before handlers started to work, and a total of 160 samples were collected. MAB were chosen as indicators of the grade of hygiene of food contact surfaces, and Enterobacteriaceae are known to be involved in cross-contamination events between surfaces, foods and handlers.⁶² Sterile polypropylene swabs (Nuovo Aptaca, Canelli, Italy) with amies medium were used for surface sampling. Each surface was swabbed using a 10 cm × 10 cm sterile metal template, then the swab head (1–2 cm) was aseptically cut and immersed in 7 mL test tubes of 1% buffered peptone water. In the case of faucets, surfaces were swabbed as described above to sample the approximate area that was in contact with hands, which can be estimated as 225.07 ± 21.07 cm² for men and 188.03 ± 16.08 cm² for women.⁶³ Finally, samples were transported under refrigeration (2–5 °C) to the laboratory.

For microbial enumeration, test tubes were shaken in a vortex (Reax 2000, Heidolph, Kelheim, Germany) for 1 min, then 1 mL from each tube was pour-plated on plate count agar and violet red bile glucose agar (Oxoid Ltd) for the determination of MAB and Enterobacteriaceae respectively.

Air quality

Microbial air quality was measured in each school canteen, and MAB and *Staphylococcus* spp. were selected as microbial indicators. Three critical zones were considered as potential areas of air contamination: processing rooms (kitchens), humid zones (sinks) and canteens. A total of 120 samples were collected. An air sampler (SAS Super 180™, Scharlab, Barcelona, Spain) was used. This equipment allows one to sample a certain volume of air according to the manufacturer's instructions; in the present study the volume of air was fixed at 500 L. This active technique was used instead of passive sampling, since most standard guidelines refer to colony-forming units (CFU) m⁻³ for expressing air contamination.⁶⁴ Probable counts (*Pr*, statistical possibility of multiple particles passing through the same hole) were obtained using a conversion table, and *Pr* served to calculate counts in CFU m⁻³.

Statistical analysis

Descriptive statistics for microbiological data and checklist scores were calculated with Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA). All

statistical analyses were implemented in Statistica for Windows Version 10 (Statsoft Iberica, Lisbon Portugal). The chi-square test was applied in order to study significant differences between schools regarding attributes of P1 of the checklist. In addition, Pearson coefficients (r) were calculated to find significant correlations between attributes of P2 of the checklist and microbiological data. Finally, parametric tests (Student's t test and variance analysis together with Duncan's test) at 5% significance level were performed to determine whether there were significant differences between schools regarding microbiological data collected.

RESULTS

Checklist

From the checklist results, the average scores of five visits obtained in P1 and P2 of the checklists and total scores of the eight school canteens were calculated (Table 1).

The results from P1 of the checklist were treated as frequencies since they were based on yes/no questions. In the eight school canteens (A–H) visited, some deficiencies in handlers' habits were found, as demonstrated by the average score results for the attributes of P1 (Table 1). The use of gloves was observed in 85% of cases, being higher in schools A, C, F and G. However, it is noteworthy that handlers did not often change their gloves, since this practice was observed in only 8% of visits. Hand-washing was incorrect (in 35% of visits) or even absent in centres C, F and H. Nevertheless, other practices were considered to be accomplished. For example, handlers wearing jewelry were mostly observed in school A, while school H showed the highest frequency of use of aprons for cleaning hands and cloths for cleaning different surfaces, which could result in cross-contamination events. These practices should be avoided in accordance with current European regulations.¹⁹ Finally, all cutting boards and cooking utensils were considered appropriate except those from school canteens C and H.

In order to evaluate the differences observed in P1, chi-square values were calculated from contingency tables. Significant differences among schools canteens ($P < 0.05$) were noted for all attributes of P1 of the checklist (Table 1) except attributes 1 (use of gloves, 0.091) and 2 (change of gloves, 0.61).

Regarding P2 of the checklist, the total scores were obtained as the sum of the mean values collected in the five visits per school canteen. School canteens B (17.0) and E (19.0) presented the best total score values, while school canteen H obtained the lowest value (10.4), thus indicating poor handling practices. This is in agreement with the results from P1, since, in school canteen H, correct hand-washing was not observed on any visit, and deficient habits were present among handlers (attributes 6 and 7).

Globally, the total averages obtained for P2 attributes were considered acceptable because they were higher than 2.0. Only attribute 12 (correct food handling, 1.78) was considered as poor, because all canteens except B (2.0), D (2.0) and E (2.6) reached unacceptable average values. Attribute 11 (cleanliness of uniforms, 3.13) was considered as good (Table 1) despite school canteen H having a very low average (1.8).

From the information in P2 of the checklist, Pearson correlation coefficients were calculated to study significant differences among attributes. The strongest correlation ($r = 0.652$) was found between cleanliness of working surfaces (attribute 13) and kitchen hygiene (attribute 15).

Microbial analyses of food samples

The average counts (MAB, TC and CPS) obtained from samples of foods analysed in each school canteen (A–H) are presented in Table 2. The average counts of MAB were below $6.0 \log \text{CFU g}^{-1}$ in all RTE salad samples analysed. The highest average counts corresponded to RTE lettuce salad samples from school canteens F ($5.1 \pm 0.4 \log \text{CFU g}^{-1}$), G ($5.5 \pm 1.6 \log \text{CFU g}^{-1}$) and H ($5.2 \pm 0.7 \log \text{CFU g}^{-1}$). This is in line with the results obtained in P1 of the checklist and the total scores obtained in P2, where school canteen H had the lowest score (10.4). It is important to mention that one sample of RTE lettuce salad collected from school canteen G had a MAB count above $7.0 \log \text{CFU g}^{-1}$. The levels of TC contamination were below $4.0 \log \text{CFU g}^{-1}$. The highest counts were found in RTE lettuce salad samples from school canteen H ($3.7 \pm 0.5 \log \text{CFU g}^{-1}$) and in samples of mixed vegetable salads from school canteen F ($3.8 \pm 0.6 \log \text{CFU g}^{-1}$). The lettuce samples collected from school canteen A reached lower counts than those from the other school canteens. Regarding CPS, the average levels were below $2.0 \log \text{CFU g}^{-1}$ in all samples of RTE lettuce salads, although some samples from school canteens B and G presented values above $2.5 \log \text{CFU g}^{-1}$. However, as can be seen in Table 2, mixed salad samples and other salads showed the lowest CPS counts ($\sim 1.0 \log \text{CFU g}^{-1}$). The highest contamination levels found in RTE lettuce salads could likely be attributed to poor handling practices, such as maintaining the salads at room temperature for several hours.

Concerning *E. coli*, only four samples of the total (80) were positive. The positive samples of RTE lettuce salads (two) and mixed salads (two) were found in school canteens G and F respectively. Nevertheless, microbial counts were lower than $1.0 \log \text{CFU g}^{-1}$ in all cases. The presence of *E. coli* in these salad samples was probably due to inadequate hand-washing and subsequent food handling.

Finally, no pathogens (*Salmonella* spp and *Listeria* spp) were detected in the samples analysed.

Temperatures/times measured indicated that the average storage values of raw materials were $5.6 \pm 3.1 \text{ }^\circ\text{C}/2 \text{ h}$. In addition, the average environmental values during processing were $20.6 \pm 4.8 \text{ }^\circ\text{C}/1 \text{ h}$, while the final values of RTE foods just after distribution were $14.1 \pm 4.3 \text{ }^\circ\text{C}/1 \text{ h}$.

Food contact surfaces

Four food contact surfaces (working tables, cutting boards, sinks and faucets) were examined regarding two microbial parameters: MAB and Enterobacteriaceae (Table 3). Surface counts presented high variability, probably attributable to methodological issues, non-regular cleanliness procedures or inadequate cleaning methods. Mean concentration values are shown in Table 3. It is important to note that, in the case of faucets, results were based on the area corresponding to the zone in contact with hands.

The average MAB counts for working tables were below 10 CFU cm^{-2} in school canteens B, D, E and H. The highest concentrations of MAB were found in school canteens A ($36.98 \pm 10.44 \text{ CFU cm}^{-2}$), C ($70.79 \pm 4.90 \text{ CFU cm}^{-2}$), F ($49.43 \pm 6.30 \text{ CFU cm}^{-2}$) and G ($11.91 \pm 1.96 \text{ CFU cm}^{-2}$). This means that cleaning and disinfection measures of working tables were insufficient in these centres. On the other hand, the contamination levels by Enterobacteriaceae did not exceed 1.0 CFU cm^{-2} in all cases except school canteen C ($2.73 \pm 0.32 \text{ CFU cm}^{-2}$). Absence of microbial counts was detected on working tables in school canteen D.

Cutting boards were not considered acceptable for MAB in school canteen F, which had counts above 300 CFU cm^{-2} .

Table 1. Average scores of five visits obtained in part 1 (P1) and part 2 (P2) of checklists and total scores of eight school canteens (A–H) evaluated ($n = 40$)

Code	Attribute evaluated	Average score								Total
		A	B	C	D	E	F	G	H	
<i>P1</i>										
1	Use of gloves	1.0	0.6	1.0	0.8	0.8	1.0	1.0	0.6	0.85
2	Change of gloves	0.2	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.2	0.08
3	Correct hand-washing	0.8	0.4	0.0	0.4	0.6	0.0	0.6	0.0	0.35
4	Use of hair net	0.8	0.8	0.6	0.6	1.0	1.0	0.0	1.0	0.73
5	Wearing of jewelry	0.8	0.0	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.0	0.15
6	Use of apron for cleaning hands	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.8	0.13
7	Use of same cloth for cleaning	0.0	0.0	0.2	0.0	0.4	0.4	0.0	1.0	0.25
8	Proper cutting board material	1.0	1.0	0.6	1.0	1.0	1.0	1.0	0.4	0.88
9	Proper cooking utensils	1.0	1.0	0.4	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.93
<i>P2</i>										
10	Cleanliness of hands/gloves	2.8	2.6	2.8	2.4	2.8	2.2	3.2	1.6	2.55
11	Cleanliness of uniforms	3.6	3.4	2.4	3.4	3.8	2.8	3.8	1.8	3.13
12	Correct food handling	1.6	2.0	1.4	2.0	2.6	1.8	1.6	1.2	1.78
13	Cleanliness of working surfaces	2.2	2.6	1.0	2.6	3.2	2.8	1.6	1.4	2.18
14	Cleanliness of cooking utensils and equipment	3.8	3.6	2.0	3.4	3.4	2.2	2.6	2.8	2.98
15	Kitchen hygiene	2.2	2.8	1.8	2.8	3.2	3.0	2.4	1.6	2.48
<i>Total score for P2</i>		16.2	17.0	11.4	16.6	19.0	14.8	15.2	10.4	15.1

Table 2. Concentrations of mesophilic aerobic bacteria (MAB), total coliforms (TC) and coagulase-positive staphylococci (CPS) found in ready-to-eat (RTE) foods in eight school canteens (A–H) evaluated ($n = 80$)

RTE food	Microbial type	Microbial concentration (log CFU g ⁻¹)							
		A	B	C	D	E	F	G	H
Lettuce salad	MAB	3.6 ± 1.2	4.6 ± 0.7	4.9 ± 1.6	4.2 ± 1.0	4.4 ± 0.5	5.1 ± 0.4	5.5 ± 1.6	5.2 ± 0.7
	TC	1.1 ± 0.9	2.4 ± 0.8	3.2 ± 2.0	2.2 ± 1.6	3.5 ± 0.8	1.6 ± 1.9	3.2 ± 2.0	3.7 ± 0.5
	CPS	1.0 ± 0.6	1.9 ± 0.6	0.9 ± 0.8	1.4 ± 0.6	1.5 ± 0.7	1.0 ± 0.8	1.4 ± 0.9	1.2 ± 0.5
Mixed vegetable salad	MAB	3.6 ± 0.6	3.5 ± 0.2	NA	NA	4.1 ± 0.7	4.4 ± 0.4	NA	NA
	TC	2.5 ± 0.1	1.8 ± 0.1	NA	NA	2.1 ± 1.8	3.8 ± 0.6	NA	NA
	CPS	0.7 ± 0.0 ^a	ND	NA	NA	1.1 ± 0.6	0.5 ± 0.5	NA	NA
Other salads	MAB	3.1 ± 0.1	NA	3.3 ± 0.1	NA	3.9 ± 0.6	NA	NA	3.6 ± 0.9
	TC	2.9 ± 0.0 ^a	NA	1.7 ± 0.3	NA	ND	NA	NA	3.2 ± 0.0 ^a
	CPS	ND	NA	1.0 ± 0.4	NA	0.8 ± 0.0 ^a	NA	NA	0.1 ± 0.2

Values are expressed as mean ± standard deviation. ND, not detected; NA, not available on menu.
^a The same microbial count was obtained.

The other school canteens presented lower counts, but some exceeded 10 CFU cm⁻², namely school canteens A (10.91 ± 8.52 CFU cm⁻²), B (11.80 ± 2.08 CFU cm⁻²) and H (16.90 ± 1.53 CFU cm⁻²). For Enterobacteriaceae, all cutting boards showing positive results exceeded 1.0 CFU cm⁻² apart from those in school canteen A (0.69 ± 0.31 CFU cm⁻²). School canteen F presented the highest contamination (4.19 ± 0.45 CFU cm⁻²). Finally, for school canteens D, E and H, negative results were obtained.

Regarding sink contamination, large differences were found, with school canteens A (67.30 ± 5.03 CFU cm⁻²), F (18.62 ± 9.80 CFU cm⁻²) and G (73.11 ± 16.09 CFU cm⁻²) showing the highest levels of MAB. The other counts were below 10 CFU cm⁻², and school canteen D had the lowest contamination level (0.17 ± 0.03 CFU cm⁻²). The contamination levels of Enterobacteriaceae from sinks were higher in school canteens A (4.19 ± 0.46 CFU cm⁻²) and F (2.52 ± 0.32 CFU cm⁻²). Elsewhere, average counts remained at

or below 1.0 CFU cm⁻². Sinks in school canteen D did not show any contamination.

Finally, faucets were considered as potential sources of cross-contamination. As can be seen in Table 3, the average counts of MAB and Enterobacteriaceae on faucets were substantially higher than on the other contact surfaces. Indeed, most of them showed counts around 300 CFU cm⁻² for MAB and 10 CFU cm⁻² for Enterobacteriaceae. In the other school canteens (B, C and D) the average counts of MAB and Enterobacteriaceae exceeded 20 and 4.0 CFU cm⁻² respectively. These results showed that cleaning and disinfection measures were inadequate and not carried out with the same exigency on all surfaces, probably owing to lack of knowledge on cleaning and disinfection of faucets.

Concerning checklist attributes, significant negative correlations ($P < 0.05$) were found between microbial counts of MAB ($r = -0.400$) and Enterobacteriaceae ($r = -0.490$) on working

Table 3. Concentrations of mesophilic aerobic bacteria (MAB) and Enterobacteriaceae (ENT) found on working tables, cutting boards, sinks and faucets in eight school canteens (A–H) evaluated ($n = 160$)

School canteen	Microbial concentration (CFU cm ⁻²)							
	Working tables		Cutting boards		Sinks		Faucets ^a	
	MAB	ENT	MAB	ENT	MAB	ENT	MAB	ENT
A	36.98 ± 10.44c	0.32 ± 0.03ab	10.91 ± 8.52bc	0.69 ± 0.31b	67.30 ± 5.03c	4.19 ± 0.46f	>100c	9.77 ± 1.82b
B	2.82 ± 0.70ab	0.52 ± 0.34ab	11.80 ± 2.08cd	3.22 ± 0.50d	2.31 ± 0.22a	0.58 ± 0.36ab	20.70 ± 11.49a	4.99 ± 2.95a
C	70.79 ± 4.90e	2.73 ± 0.32c	7.01 ± 1.61abc	1.49 ± 0.20c	1.55 ± 0.78a	0.78 ± 0.48bc	29.65 ± 11.70ab	5.06 ± 4.50a
D	0.37 ± 0.21a	0.00a	1.10 ± 0.55a	0.00a	0.17 ± 0.03a	0.00a	38.73 ± 3.35b	4.41 ± 3.69a
E	5.89 ± 0.92ab	0.82 ± 0.24ab	1.55 ± 0.46a	0.00a	7.05 ± 0.83ab	1.28 ± 0.53cd	>300c	>10b
F	49.43 ± 6.30d	0.77 ± 0.43ab	>300e	4.19 ± 0.45e	18.62 ± 9.80b	2.52 ± 0.32e	>300c	>10b
G	11.91 ± 1.96b	1.18 ± 1.18b	5.11 ± 1.14ab	1.37 ± 0.21c	73.11 ± 16.09c	1.54 ± 0.18d	>300c	>10b
H	8.71 ± 2.70ab	0.98 ± 0.11b	16.90 ± 1.53d	0.00a	5.35 ± 1.15a	0.52 ± 0.26ab	>300c	>10b

Values are expressed as mean ± standard deviation. Means with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

^a Results are based on the area corresponding to the zone in contact with hands.

tables and kitchen hygiene (attribute 15). This relationship was also found to be significant for maintenance of proper cutting board material ($r = -0.366$ and -0.329 for MAB and Enterobacteriaceae respectively).

Air quality

Three critical zones were considered as areas of potential air contamination: processing rooms (kitchens), humid zones (sinks) and canteens. The average counts for MAB and *Staphylococcus* spp. are presented in Table 4. The microbial quality of the air was graded using guidelines established by Al Dagal *et al.*,⁴³ with grade A (excellent) equating to <100 CFU m⁻³, grade B (intermediate) to 100 – 300 CFU m⁻³ and grade C (poor) to >300 CFU m⁻³.

No significant differences in MAB counts were found among the investigated areas ($P < 0.05$). In all processing rooms the air samples were classified as poor (>300 CFU m⁻³) for MAB apart from school canteen H, which had the lowest average (166 ± 38 CFU m⁻³) and was categorised as intermediate. The air collected from sink areas was also considered of poor quality. Only the air samples from school canteens F (249 ± 281 CFU m⁻³) and G (288 ± 191 CFU m⁻³) showed lower values. The same results were detected in canteen areas. Only three of the eight school canteens evaluated, namely A, D and H, reached the category of intermediate, with 241 ± 76 , 268 ± 88 and 118 ± 46 CFU m⁻³ respectively.

On the other hand, high variability was observed in *Staphylococcus* spp. counts in the air. The highest contamination levels (>100 CFU m⁻³) were obtained in air samples from processing rooms, sinks and canteen areas in school canteens B and E. It should be noted that in the latter the contamination level in canteen areas averaged 156 ± 113 CFU m⁻³. Nevertheless, the average counts from school canteen D were lower in the three investigated areas.

Likewise, significant correlations ($P < 0.05$) in school canteens were found between MAB counts in sinks and attributes 13 and 14 of the checklist, i.e. cleanliness of working surfaces and cleanliness of cooking utensils and equipment ($r = 0.33$ and 0.32 respectively). The presence of *Staphylococcus* spp. in school kitchens was influenced by food handling practices (attribute 12, $r = -0.39$), cleanliness of cooking utensils and equipment (attribute 14, $r = -0.37$) and kitchen hygiene (attribute 15, $r = -0.36$), all of which are associated with cross-contamination events.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Checklist evaluation

Several studies have used checklists or questionnaires in order to identify critical control points and to implement food safety and management measures.^{2,30,32,65–69} In our study, in all school canteens, difficulties were mainly related to handlers' practices. The major problems were observed with glove changing (8%) and correct hand-washing (35%). However, the use of gloves was not regularly observed (25%) during food preparation and distribution. These findings matched those reported by Veiros *et al.*² in food service facilities, where only 24% of the attributes evaluated in checklists were classified as satisfactory. It is important to note that food workers' hands can act as vectors in the spread of foodborne diseases,⁷⁰ particularly in the case of handlers with inadequate personal hygiene.⁷¹ Moreover, hand-washing is a simple and effective way to avoid cross-contamination,⁷² and the use and change of gloves during food handling are crucial, because soiled gloves can be a cross-contamination source similar to unwashed hands.⁷³ In this study, glove changing was considered essential because the workers took part in several activities.

Likewise, the use of aprons for cleaning hands or the same cloth for cleaning surfaces and the use of jewelry during preparation of salads were considered as incorrect practices, but they were not frequently observed. This fact was detected by Lues and Van Tonder,⁷⁴ who found positive correlations between microbial counts on hands and on aprons, with *Staphylococcus aureus* having a higher positive correlation ($r = 0.56$) than other groups such as MAB, TC and Enterobacteriaceae. Effective training was proposed by Acikel *et al.*,²⁶ who observed an improvement in food handling practices regarding the use of jewelry. Our study found that the use of jewelry was less frequent (15%) than reported by Couto-Campos *et al.*⁷⁵ (81.5%).

On the other hand, observations of food handling practices indicated that the use of proper hair nets was observed 73% of the time in school canteens. However, some authors reported that this practice was infrequent among food handlers.^{19,75,76}

In order to avoid these deficient practices, effective training of food handlers in food service systems could be implemented. Indeed, some authors concluded that training of food handlers can be effective.^{2–4} However, it is recognised that this training should be repeated over time to minimise the reluctance of food handlers

Table 4. Concentrations of mesophilic aerobic bacteria (MAB) and *Staphylococcus* spp. (ST) found in environmental air of processing rooms, sinks and canteens in eight school canteens (A–H) evaluated ($n = 120$)

Area	Microbial type	Microbial concentration (CFU m ⁻³)							
		A	B	C	D	E	F	G	H
Processing rooms	MAB	≥300	≥300	≥300	≥300	≥300	≥300	≥300	166 ± 38
	ST	68 ± 50	116 ± 99	55 ± 18	15 ± 10	132 ± 65	26 ± 21	33 ± 24	31 ± 7
Sinks	MAB	≥300	≥300	≥300	≥300	≥300	249 ± 281	288 ± 191	≥300
	ST	68 ± 61	102 ± 108	65 ± 24	19 ± 12	143 ± 53	18 ± 9	37 ± 34	45 ± 21
Canteens	MAB	241 ± 76	≥300	≥300	268 ± 88	≥300	≥300	≥300	118 ± 46
	ST	19 ± 13	60 ± 95	47 ± 27	8 ± 11	156 ± 113	35 ± 16	13 ± 12	24 ± 19

Values are expressed as mean ± standard deviation.

to apply their acquired knowledge.⁷⁷ Sivapalasingam *et al.*⁷⁸ stated that three times as many foodborne disease outbreaks occurred owing to poor personal hygiene than to unsafe food sources. Therefore, as demonstrated in our study, periodic microbiological assessment of high-risk food service operations, in addition to visual inspection, should be performed to minimise the risk of foodborne disease outbreaks.⁷⁹

Assessment of microbiological safety and quality

The microbial levels detected in the foods examined indicated the absence of pathogens in the samples analysed.

Currently, there is no Spanish legislation addressing microbiological criteria in RTE foods. However, other studies recommend MAB analysis in such products as an indicator of their microbiological status.⁷⁰ Réglie-Poupet *et al.*⁸⁰ proposed microbiological limits of 5×10^6 and 10^4 CFU g⁻¹ for MAB and TC respectively in RTE foods at retail, before consumption. Our results showed that only five samples (6.25%) collected in the eight school canteens did not fulfil these criteria. In the UK, guidelines for RTE foods⁸¹ consider microbial counts of CPS between 20 and 10^4 log CFU g⁻¹ as borderline. In our study the highest count of CPS was 1.9 ± 0.6 log CFU g⁻¹ in lettuce salad samples from school canteen B (Table 2).

The food contact surfaces with the highest microbial loads were cutting boards and faucets (Table 3). Solberg *et al.*⁷⁹ proposed that acceptability of food contact surfaces be set between 10 and 20 CFU cm⁻², while Sneed *et al.*¹⁹ proposed standards for food contact surfaces of <20 CFU cm⁻² for MAB and <10 CFU cm⁻² for Enterobacteriaceae. The latter study reported high levels of MAB on durable resin cutting boards (>20 CFU cm⁻²), which matched those found in our study in school canteen F. It is reported that micro-organisms can become lodged in cracks and crevices if cutting boards are not properly sanitised.⁸² Faucets were highly contaminated, with levels above 300 and 10 CFU cm⁻² for MAB and Enterobacteriaceae respectively in five of the eight school canteens. Previous studies report that hand contact surfaces are more susceptible to contamination than food contact surfaces⁸³ and that microbial transfer by hands represents a potential cross-contamination route.³⁷

Recontamination via air could become an important issue if food products stand for a long time in areas exposed to airborne contamination. Some authors have found that micro-organisms such as *E. coli*,⁸⁴ *Salmonella*⁴⁵ and *Listeria*⁸⁵ have the ability to survive within air particles. Also, aerosolisation of micro-organisms seems to favour cross-contamination.^{45,51,86}

In our study, three representative zones were analysed: processing rooms, sinks and canteens. No significant differences among mean MAB counts in the three areas were found. Most of the school canteens evaluated showed high contamination levels of MAB that greatly exceeded 300 CFU m⁻³, and those areas where air contamination was below 300 CFU m⁻³ were classified as being of intermediate quality based on the scale of Al Dagal *et al.*⁴³ (grade B: 100–300 CFU m⁻³). Interestingly, no area was classified as being of excellent quality (grade A: <100 CFU m⁻³).

The MAB counts in school canteen E averaged 1208, 1087 and 1109 CFU m⁻³ in processing room, sink and canteen areas respectively. Lower MAB airborne contamination was reported (<300 CFU m⁻³) in a meat processing plant⁴³ and in long-term care home canteens.³⁴ Other reported levels were 10–1310 CFU m⁻³ in a dairy processing plant⁴⁴ and 133 CFU m⁻³ in a pork processing plant.⁴⁶ Pearce *et al.*⁴⁵ also reported >10³ CFU m⁻³ in dirty food processing facilities, while the microbial load was below 400 CFU m⁻³ in cleaned and refrigerated zones.

The high airborne contamination detected in this study could be partially attributed to the high number of workers in the processing areas. There were four or five food handlers in each school canteen, and it is known that one worker has the potential to generate between 240 and 2400 million particles in a working day.⁸⁷ In addition to human activity,^{46,88} it has previously been reported that aerosol formation and juxtaposition of dirty and clean areas also contribute to microbial contamination.^{44,47,89} Nevertheless, Pearce *et al.*⁴⁵ noted that higher counts of MAB were found in humid rooms (>10³ CFU m⁻³) 2 h after the beginning of processing operations.

Regarding *S. aureus* counts, higher levels were found in our study in comparison with those reported by Byrne *et al.*⁴⁶ in a pork processing plant, probably owing to the incapacity of this micro-organism to survive for a long time in aerosols.⁴⁴

The results provided in this study should help risk and food safety managers to better define control measures to be adopted in collective settings in order to prevent foodborne infections. Good manufacturing practices and HACCP principles must be followed, together with special training of food handlers. Finally, continuous improvement in catering food services is advisable in the preparation of RTE foods destined for high-risk populations such as children.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partly financed by the AGR-01879 excellence project (Andalusia Government), the AGL 2008-03298/ALI project (Spanish

Ministry of Science and Innovation), European ERDF funding and a grant awarded by the Spanish Agency of International Cooperation and Development (AECID).

REFERENCES

- Taylor E, A new method of HACCP for the catering and food service industry. *Food Control* **19**:126–134 (2008).
- Veiros MB, Proença RPC, Santos MCT, Kent-Smith L and Rocha A, Food safety practices in a Portuguese canteen. *Food Control* **20**:936–941 (2009).
- Santana NG, Almeida RCC, Ferreira JS and Almeida PF, Microbiological quality and safety of meals served to children and adoption of good manufacturing practices in public school catering in Brazil. *Food Control* **20**:255–261 (2009).
- Buccheri C, Mammìna C, Giammanco S, Giammanco M, La Guardia M and Casuccio A, Knowledge, attitudes and self-reported practices of food service staff in nursing homes and long-term care facilities. *Food Control* **21**:1367–1373 (2010).
- Portuguese Food Safety and Economic Agency (ASAE), *Technical Specification Audit of Food and Beverage*. ASAE, Lisbon (2006).
- Tirado C and Schmidt K, WHO surveillance program for control of foodborne infections and intoxications: preliminary results and trends across greater Europe. *J Infect* **43**:80–84 (2001).
- Nineteenth National Symposium of Meat and Food Safety. Veterinarian Food Safety Association (AVESA). National Epidemiology Centre, Zaragoza (2008).
- Lund BM and O'Brien SJ, Microbiological safety of food in hospitals and other healthcare settings. *J Hosp Infect* **73**:109–120 (2009).
- Lingaas E, Johnsen BO, Torfoss D, Dorenberg DH, Andersen CT, Müller F, et al, *Listeria monocytogenes* outbreak in a comprehensive cancer and transplantation centre. *Proc. 18th Eur. Congr. of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Barcelona, pp. 19–22 (2008).
- Sala MR, Cardeñosa N, Arias C, Llovet T, Recasens A, Dominguez A, et al, An outbreak of food poisoning due to a genogroup I norovirus. *Epidemiol Infect* **133**:187–191 (2005).
- Food and Drug Administration. FDA Trend Analysis Report on the Occurrence of Foodborne Illness Risk Factors in Selected Institutional Foodservice, Restaurant, and Retail Food Store Facility Types (1998–2008). Available at: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/RetailFoodProtection/FoodbornellnessandRiskFactorReduction/RetailFoodRiskFactorStudies/ucm223293.htm> Accessed Date: 29 September 2011.
- US Food and Drug Administration. Reducing Foodborne Illness Risk Factors in Food Service and Retail Establishments (2006). Available at: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/RetailFoodProtection/FoodbornellnessandRiskFactorReduction/ucm106205.htm> Accessed Date: 29 September 2011.
- Harrington RE, The role of employees in the spread of foodborne disease: food industry views of the problem and coping strategies. *Dairy Food Environ Sanitat* **12**:62–63 (1992).
- Vollaard AM, Ali S, Van Asten HA, Widjaja S, Visser LG, Surjadi C, et al, Risk factors for typhoid and paratyphoid fever in Jakarta, Indonesia. *J Am Med Assoc* **291**:2607–2615 (2004).
- Paulson DS, Hand-washing, gloving, and disease transmission by the food preparer. *Dairy Food Environ Sanitat* **20**:838–845 (2000).
- Taylor AK, Food protection: new developments in hand-washing. *Dairy Food Environ Sanitat* **20**:114–119 (2000).
- Michaels B, Hand-washing: an effective tool in the food safety arsenal. *Food Qual* **9**:45–53 (2002).
- Kerr KG, Seale K, Wallbran S, Rajgopal A and Bentham D, Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 on the hands of food-workers. *Br Food J* **105**:678–681 (2003).
- Sneed J, Strohhenn C, Gilmore SA and Mendonça A, Microbiological evaluation of foodservice contact surfaces in lowa assisted-living facilities. *J Am Diet Assoc* **104**:1722–1724 (2004).
- Albrecht JA, Sumner S and Henneman A, Food safety in child care facilities. *Dairy Food Environ Sanitat* **12**:740–743 (1992).
- Wirtanen G, Salo S and Mattila-Sandholm T, Microbial methods in evaluation of cleaning procedures, in *Proceedings of the 30th R3-Nordic Contamination Control Symposium*, ed. by Wirtanen G, Salo S and Mikkola A. VTT Offsetpaino, Espoo, pp. 207–218 (1999).
- Davidson CA, Griffith CJ, Peters AC and Fielding LM, Evaluation of two methods for monitoring surface cleanliness – ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing. *Luminescence* **14**:33–38 (1999).
- Manning CK, Food safety knowledge and attitudes of workers from institutional and temporary food service operations. *J Am Diet Assoc* **94**:895–897 (1994).
- Cohen E, Reichel A and Schwartz Z, On the efficacy of an in-house food sanitation training program: static measurements and practical conclusion. *J Hospit Tourism Res* **25**:5–16 (2001).
- Seaman P and Eves A, The management of food safety: the role of food hygiene training in the UK service sector. *Int J Hospit Manag* **25**:278–296 (2006).
- Acikel CH, Oğur R, Yaren H, Gocgeldi E, Ucar M and Kir T, The hygiene training of food handlers at a teaching hospital. *Food Control* **19**:186–190 (2008).
- Wright J and Feun L, Foodservice manager certification: an evaluation of its impact. *J Environ Health* **49**:12–15 (1986).
- Mathias RG, Riben PD, Campbell E, Wiens M, Cocksedge W, Hazlewood A, et al, The evaluation of the effectiveness of routine restaurant inspections and education of food handlers: restaurant inspection survey. *Can J Public Health* **85**:S61–S66 (1994).
- Powell SC and Attwell RW, The use of ATP bioluminescence as an objective measure of food hygiene standards. *Int J Environ Health Res* **7**:47–53 (1997).
- Roberts KR, Barrett BB, Howells AD, Shanklin CW, Pilling VK and Brannon L, Food safety training and foodservice employees' knowledge and behaviour. *Food Protect Trends* **28**:252–260 (2008).
- Castillo MTG, *Knowledge, Attitudes and Practices of Street Food Consumers in Manila*. Field Epidemiological Training Program. Department of Health, Manila (1994).
- Clayton D and Griffith C, Observation of food safety practices in catering using notational analysis. *Br Food J* **106**:211–227 (2004).
- Rodríguez M, Valero A, Carrasco E, Pérez-Rodríguez F, Posada GD and Zurera G, Hygienic conditions and microbiological status of chilled ready-to-eat products served in southern Spanish hospitals. *Food Control* **22**:874–882 (2011).
- Rodríguez M, Valero A, Posada-Izquierdo GD, Carrasco E and Zurera G, Evaluation of food staff practices and microbiological status of ready-to-eat foods in long-term care facilities in Andalusia region (Spain). *J Food Protect* **74**:1504–1512 (2011).
- Kennedy J and Wall P, Food safety challenges, in *Food Safety Handbook: Microbiological Challenges*, ed. by Storrs M, Devoluy MC and Cruveiller P. Biomérieux Education, France, pp. 8–19 (2007).
- Nörrung B and Buncic S, Microbial safety of meat in the European Union. *Meat Sci* **78**:14–24 (2008).
- Pérez-Rodríguez F, Valero A, Carrasco E, García RM and Zurera G, Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. *Trends Food Sci Technol* **19**:131–144 (2008).
- Legnani P, Leoni E, Berveglieri M, Mirolo G and Alvaro N, Hygienic control of mass catering establishments, microbiological monitoring of food and equipment. *Food Control* **15**:205–211 (2004).
- Da Silva-Malheiros P, Passos C, Casarin L, Serraglio L and Tondo EC, Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry meat to surfaces of stainless steel and polyethylene and their disinfection. *Food Control* **21**:298–301 (2010).
- Atlas R and Bartha R, *Microbial Ecology and Environmental Microbiology*. Pearson Education, Madrid (2002).
- Beumer RR and Kusumaningrum H, Kitchen hygiene daily life. *Int Biodeterior Biodegrad* **51**:299–302 (2003).
- Griffiths WD and DeCosemo GAL, The assessment of bioaerosols: a critical review. *J Aerosol Sci* **25**:1425–1458 (1994).
- Al Dagal M, Mo O, Fung DYC and Kastner C, A case study of the influence of microbial quality of air on product shelf life in a meat processing plant. *Dairy Food Environ Sanitat* **12**:69–70 (1992).
- Costa-Salustiano V, Andrade NJ, Cardoso BSC, Monteiro CAR and Kitakawa LSA, Microbiological air quality of processing areas in a dairy plant as evaluated by sedimentation technique and a one-stage air sampler. *Braz J Microbiol* **34**:255–259 (2003).
- Pearce RA, Sheridan JJ and Bolton DJ, Distribution of airborne microorganisms in commercial pork slaughter processes. *Int J Food Microbiol* **107**:186–191 (2006).
- Byrne B, Lyng J, Dunne G and Bolton DJ, An assessment of the microbial quality of the air within a pork processing plant. *Food Control* **19**:915–920 (2008).
- Prendergast DM, Daly DJ, Sheridan JJ, McDowell DA and Blair IS, The effect of abattoir design on aerial contamination levels and the relationship between aerial and carcass contamination levels in two Irish beef abattoirs. *Food Microbiol* **21**:589–596 (2004).

PUBLICACIÓN 2

PUBLICACIÓN 2: SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS LISTOS PARA EL CONSUMO SERVIDOS EN RESIDENCIAS GERIÁTRICAS EN ANDALUCÍA

EVALUATION OF FOOD HANDLER PRACTICES AND MICROBIOLOGICAL STATUS OF READY-TO-EAT FOODS IN LONG-TERM CARE FACILITIES IN ANDALUSIA REGION OF SPAIN

PUBLICACIÓN 2: SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS LISTOS PARA EL CONSUMO SERVIDOS EN RESIDENCIAS GERIÁTRICAS EN ANDALUCÍA

RESUMEN

El presente estudio se realizó con el objeto de evaluar las condiciones higiénico-sanitarias y las prácticas de manipulación de los alimentos en centros geriátricos de Andalucía; y de determinar la influencia de estos factores de riesgos sobre las condiciones microbiológicas e inocuidad de los platos de ensaladas y cárnicos cocidos RTE. Además, al igual que el estudio desarrollado en comedores escolares, se procedió a comprobar el estado microbiológico de las superficies de contacto con los alimentos y la calidad ambiental de las áreas más propensas a la contaminación de los alimentos. Finalmente, los datos obtenidos se utilizaron para proponer una serie de medidas correctoras conducentes a una mejora en la higiene y manipulación de los platos servidos en estos centros.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo durante el período de Septiembre de 2008 a Junio de 2009 y para ello se seleccionaron 6 centros geriátricos de Andalucía, y se planificaron 5 visitas por centro. La selección se realizó en base al volumen de alimento diario (>250 comidas) y la presencia de personal experto en el control de la calidad de los alimentos.

MUESTREO DE LOS ALIMENTOS

Se tomaron 2 muestras de ensaladas o de productos cárnicos cocidos por visita para un total de 60 muestras (en función de la disponibilidad en los menús de cada uno de los platos). Entre las muestras ensaladas, se analizaron distintos tipos de platos (como ensalada de lechuga, ensaladas mixtas, ensalada de tomate, ensaladas basadas en mayonesa, ensalada de arroz y ensalada de legumbres). El momento de la toma de muestras, al igual que en el caso de los comedores escolares, se correspondió con los últimos platos servidos, de forma que los recuentos microbiológicos estuvieran relacionados con la contaminación antes del consumo.

RESULTADOS

CUESTIONARIOS (CHECKLISTS)

De forma general, los resultados obtenidos en la primera parte de los cuestionarios (atributos medidos en escala de frecuencia con respuestas de si/no) demostraron

Condiciones higiénico-sanitarias de establecimientos de restauración colectiva y seguridad microbiológica de platos de ensalada y cárnicos cocidos dirigidos a poblaciones de riesgo

ciertas deficiencias en los hábitos de los manipuladores. Esto lo demuestra la frecuencia con la que se realizó el uso (23%) y el cambio de guantes (3%) en la mayoría de los geriátricos (Tabla 4, artículo publicado). El lavado de las manos fue otro de los atributos donde existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los centros y en ocasiones no se observó esta actividad durante la etapa de preparación de alimentos. No obstante, se cumplió con el uso de los gorros y no se evidenció el uso de joyas en la mayoría de los centros. Las tablas de corte y los utensilios de cocina fueron aceptables y no se observó el uso de los delantales para limpiarse las manos, ni de un mismo paño para la limpieza de distintas superficies.

En la segunda parte de las checklists (atributos medidos en escala semicuantitativa de 0–4), los resultados se consideraron aceptables puesto que la mayoría de establecimientos superaron los 2 puntos. No obstante, se detectaron deficiencias en uno de los centros, con respecto a la limpieza de manos y guantes, la limpieza de los uniformes y la correcta manipulación de los alimentos.

Los coeficientes de correlación de Pearson (r) revelaron correlaciones significativas ($p < 0,05$) entre los atributos semicuantitativos de los cuestionarios (Tabla 3, artículo publicado). Las correlaciones más significativas se establecieron entre la higiene de las cocinas y el grado de limpieza de superficies ($r = 0,791$); y entre la limpieza de los uniformes y la limpieza de manos y guantes ($r = 0,635$).

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS LISTOS PARA EL CONSUMO

Los recuentos más elevados de *AEM* se hallaron en las muestras de ensalada de lechuga (>6 log ufc/g), mientras que para el resto de las ensaladas los recuentos estuvieron por debajo de 5 log ufc/g. Por su parte, los productos cárnicos cocidos presentaron recuentos promedios máximos de $4,2 \pm 2$ log ufc/g.

Las ensaladas de lechuga presentaron niveles de contaminación más altos por *CT* ($5,4 \pm 0,2$ log ufc/g) y por *Staphylococcus coagulasa* positivos ($2,2 \pm 0,2$ log ufc/g) en comparación con los productos cárnicos cocidos que presentaron niveles microbianos generalmente bajos, aunque se hallaron recuentos muy cercanos a 2 log ufc/g.

E. coli sólo se detectó en las muestras de ensaladas (6,3%), concretamente en ensaladas mixtas y de lechuga, pero en la mayoría de los casos los recuentos se mantuvieron por debajo de 10 ufc/g. No se evidenció la presencia de patógenos en ninguna de las muestras analizadas.

Los registros de t/T indicaron que las materias primas fueron almacenadas a $5,6 \pm 3,1^{\circ}\text{C}$ durante la etapa de recepción. Durante el procesado los alimentos alcanzaron Temperaturas de hasta $20,6 \pm 4,9^{\circ}\text{C}$ y durante el servicio alcanzaron los $14,1 \pm 4,3^{\circ}\text{C}$.

Además se hallaron correlaciones significativas entre los recuentos de *AEM* y el uso inadecuado del delantal para la limpieza de las manos ($r = 0,376$). Otro de los hallazgos fue la correlación que existió entre la presencia de *E. coli* en ensaladas y la limpieza de manos y guantes ($r = - 0,363$) y el correcto lavado de las manos ($r = - 0,401$).

CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LAS SUPERFICIES EN CONTACTO CON LOS ALIMENTOS

De forma global, las mesas de trabajo presentaron recuentos bajos de *AEM* y de *Enterobacterias*, en algunos centros se hallaron niveles superiores a los 10 y 2 ufc/cm², respectivamente. En las tablas de corte se evidenciaron recuentos de *AEM* superiores a 300 ufc/m² y de *Enterobacterias* por debajo de 2 ufc/m² en todos los casos. Para el caso de los fregaderos, los recuentos detectados fueron generalmente aceptables, aunque se obtuvieron niveles de *AEM* superiores a 15 ufc/m². De entre todas las superficies analizadas, los grifos fueron las que presentaron mayores niveles de contaminación, tal y como se muestra en la Tabla 4 del artículo publicado.

Se encontraron correlaciones significativas entre los recuentos de *AEM* y de *Enterobacterias* hallados en las tablas de corte y la limpieza de las superficies ($r = - 0,478$ y $- 0,473$, respectivamente), y la correcta manipulación de los alimentos ($r = - 0,400$ y $- 0,580$, respectivamente). Asimismo, los recuentos de *Enterobacterias* sobre las tablas de corte ($r = - 0,455$) y los fregaderos ($r = - 0,430$) estuvieron correlacionados de forma significativa con la higiene de las cocinas ($p < 0,05$).

CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AIRE

Los recuentos de *AEM* estuvieron por debajo de 300 ufc/m³ en todas las zonas analizadas; no obstante fueron ligeramente más altos en las zonas de los fregaderos. Asimismo, los niveles más altos de *S. aureus* se hallaron en las zonas de los fregaderos y los comedores. Se establecieron correlaciones significativas entre los niveles de *AEM* y *S. aureus* hallados en las cocinas y la limpieza de manos y guantes ($r = - 0,46$ para *AEM* y $r = - 0,45$ para *S. aureus*), y la higiene de las cocinas ($r = - 0,36$ para *AEM* y $r = - 0,41$ para *S. aureus*).

Evaluation of Food Handler Practices and Microbiological Status of Ready-to-Eat Foods in Long-Term Care Facilities in the Andalusia Region of Spain

M. RODRÍGUEZ,* A. VALERO, G. D. POSADA-IZQUIERDO, E. CARRASCO, AND G. ZURERA

Department of Food Science and Technology, University of Cordoba, Campus de Rabanales, Edificio Darwin, 14014 Córdoba, Spain

MS 10-468: Received 28 October 2010/Accepted 4 February 2011

ABSTRACT

Food safety measures in long-term care facilities (LTCFs) are being improved by the introduction of quality control management systems during food production and by the implementation of good manufacturing practices. This study was conducted in LTCFs (geriatric homes) in Andalusia, Spain, during 2008 and 2009 to evaluate sanitary conditions and the microbiological quality and safety of salads and cooked meat products served. A regulation-based checklist was applied to the evaluated centers. Samples of ready-to-eat foods ($n = 60$) were examined for mesophilic aerobic bacteria (MAB), total coliforms, coagulase-positive staphylococci (CPS), *Escherichia coli*, *Listeria* spp., and *Salmonella*. In parallel, food contact surfaces (working tables, cutting boards, sinks, and faucets) were swabbed and analyzed for MAB and *Enterobacteriaceae*. The air quality in processing rooms, near sinks, and in canteens also was measured through an active air sampling method for MAB and *Staphylococcus* spp. The results obtained revealed some deficiencies regarding handling practices and sanitary conditions tested (i.e., use and change of gloves, hand washing, and cleanliness of work surfaces). The microbial safety of foods examined indicated the absence of pathogens. Average levels of coagulase-positive staphylococci were below 10^2 CFU/g, and prevalence of *E. coli* was 6.3% in samples collected. Surface counts were higher on cutting boards and faucets, indicating insufficient cleanliness procedures. This study provides a descriptive analysis of the sanitary conditions of food service systems in LTCF, and this information can help risk managers to better define control measures needed to prevent foodborne infections.

To better serve various population sectors, many food catering establishments provide ready-to-eat (RTE) meals. However, food safety and quality management systems must be in place to ensure that such meals do not compromise public health (24). Food safety measures have been focused on training of food handlers in appropriate hygiene practices and on improving the sanitary quality of meals (6, 47, 56). The use of checklists and/or questionnaires in food catering services is highly valuable for monitoring of hazard analysis and critical control point (HACCP) systems (41).

According to estimations made by the National Statistics Institute in Spain, the elderly population sector has been increasing in the last few years, reaching almost 6 million people in 2010 (1, 34). Unfortunately, studies results have confirmed that malnutrition problems exist in elderly people who live in long-term care facilities (LTCFs) (45, 57), and conditions in these facilities can lead to food safety concerns in some cases.

In Spain, 1,782 outbreaks (55%) of foodborne illness were attributed to food service systems during 2004 and 2007. Thus, the impact of prevention measures implemented in the last few years has not been as effective as expected (36).

People older than 80 years are at higher risk for infections, including foodborne illnesses, because of decreases in immune system function (51, 52). The large number of people eating daily at LTCFs makes the impact of foodborne illnesses greater there than in other catering establishments.

RTE foods such as salads and cooked meat products are in high demand by residents in LTCFs because of convenience (26). However, these foods can be subjected to poor handling practices and to time and temperature abuses during processing and distribution. Inadequate food preparation practices also can lead to cross-contamination (42). Transmission of enteric pathogens and other microbial hazards to RTE foods through air or contaminated utensils and food contact surfaces also has been widely reported (30, 31). Salads and cooked meat products may harbor high microbial loads because these foods are not subjected to further treatments that reduce the microbial contamination (38). Results of previous studies have indicated that although the food safety knowledge level may be high, food handling practices in LTCFs are not always consistent with accepted standards (6).

Our study was undertaken in six LTCFs in southern Spain where meals were served to elderly people, who are particularly susceptible to foodborne illness. The hygienic and sanitary conditions and handling practices of food

* Author for correspondence. Tel: +34-957 21 85 16; Fax: +34-957 21 20 00; E-mail: myrcazul@hotmail.com.

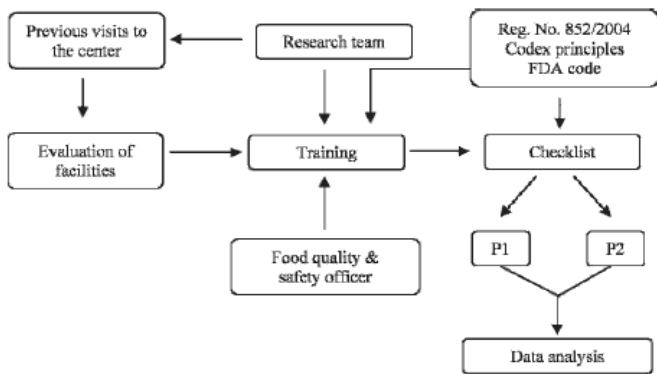


FIGURE 1. Design of the study methodology based on Regulation (EC) No 852/2004 on the hygiene of foodstuffs (15), the Recommended International Code of Practice (11), and Food Code principles (55).

handlers were evaluated to determine the influence of these factors on the microbial quality and safety of salads and cooked meat products. The microbial status of food contact surfaces (working tables, cutting boards, sinks, and faucets) and the environmental quality of potential food contamination areas (processing rooms, sinks, and canteens) were also determined. The information obtained was used to develop potential corrective measures for a better control of microbial contamination.

MATERIALS AND METHODS

This survey was conducted from September 2008 to June 2009 in six LTCFs (A through F) from the Andalusia region of Spain. The LTCFs were selected according to the number of meals served per day (>250) and the existence of a person responsible for food quality control. Each LTCF was visited five times during the study period.

Initial visits were made to each LTCF to determine the exact location, the types of services provided, the structure of the catering system, and the production flow. Subsequently, the

evaluator entered a training period in collaboration with members of our research team and with the food quality and safety officer in each center. The training period was used to standardize the criteria to be followed by the evaluator during evaluation of the food preparation process. With the information obtained, a checklist was developed based on the observance of principles embodied in international guidelines and regulations (11, 14). The design of the study is presented in Figure 1.

Checklist. Using the checklist, we collected data for 15 attributes categorized into two parts. Part I (P1) covered handlers' habits and kitchen equipment (attributes 1 to 9), based on "yes" (score of 1) or "no" (score of 0) answers to questions. Part II (P2) covered hygienic and sanitary conditions and food handling practices (attributes 10 to 15), which were given semiquantitative scores. The two parts of the checklist were evaluated independently because of the difference in the measure units for the attributes. A visual inspection was made by a trained evaluator during food preparation. Five checklists per LTCF were filled out (one checklist per visit). An example of a checklist form is provided in Figure 2.

In P1, attributes were measured as frequencies (i.e., occurrence of observed attribute). Scores were assigned when the attribute was classified as positive in each visit. For instance, a score of 0.2 means that the attribute was scored as positive on one of the five visits. The assumption was that positive scores for attributes 1 through 5, 8, and 9 were indicative of improved food safety. The nine P1 attributes and the criteria used for scoring were

1. Use of gloves. Handler used at least one pair of gloves.
2. Change of gloves. Handler changed gloves at least once during food preparation.
3. Correct hand washing. Handlers washed their hands by applying soap and water, rubbing the hands together vigorously, rinsing the hands with clean water, and thoroughly drying the hands with an air dryer and a single-use towel or a clean, unused towel.
4. Use of hair net. Handler used a hair net covering all hairs during food preparation.
5. Wearing jewelry. Handler wore rings, bracelets, watches, or any other object that could contact food (plain wedding bands were allowed).

FIGURE 2. Example of a checklist form.

General Information		Number of people served				
		Lunch/dinner time				
		Number of staff/people				
		Evaluator's name				
P1	Handler's habits	use of gloves	YES	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>
	Kitchen equipment	change of gloves	YES	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>
		correct hand washing	YES	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>
		use of hair net	YES	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>
		wearing jewelry	YES	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>
		use of apron for cleaning hands	YES	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>
		use of the same cloth for cleaning	YES	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>
		Proper cutting board/slicing machine	YES	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>
		Proper cooking utensils	YES	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>
P2	Hygienic-sanitary conditions	hands/gloves cleanliness				
	Handling practices	cleanliness of uniforms				
		correct food handling				
		cleanliness of working surfaces				
		cleanliness of cooking utensils and equipment				
	kitchen hygiene					
Temperatures		raw materials				
		final RTE food				
		Kitchen				
		Canteen				
		Refrigerator 1				
	Refrigerator 2					
	Refrigerator 3					
	Refrigerator 4					
Notes and observations						

6. Use of apron for cleaning hands. Observed at least once during food preparation.
7. Use of cloths for cleaning different surfaces. Observed at least once during food preparation.
8. Proper cutting board and slicing machine. Cutting boards were made of a polypropylene material, and slicing machines were made of stainless steel.
9. Proper cooking utensils. Cooking utensils were made of stainless steel.

For the P2 attributes, scores were assigned depending on the degree of cleanliness of handlers (including food handling) and of food preparation areas. These attributes (10 through 15) were measured on a scale from 0 to 4: 0, poor; 1, deficient; 2, acceptable; 3, good; 4, very good. The evaluation process for P2 attributes was based on the food hygiene requirements included in the Codex Alimentarius (11) and the principles embedded in the U.S. Food and Drug Administration Food Code (55). The six P2 attributes and the criteria used for scoring were

10. Hand and glove cleanliness. Hands of food handlers were correctly washed, rinsed, and dried and/or gloves were not washed, reused, or damaged.
11. Cleanliness of uniforms. Uniforms were completely cleaned (i.e., laundered), not stained or torn.
12. Correct food handling. Handler avoided cross-contamination, and the RTE food was adequately prepared and promptly refrigerated.
13. Cleanliness of working surfaces. Surfaces were washed and rinsed and visually free of dust, dirt, food residues, and other debris.
14. Cleanliness of cooking utensils and equipment. Utensils and equipment were washed and rinsed and visually free of dust, dirt, food residues, and other debris.
15. Kitchen hygiene. Design and layout permitted appropriate maintenance, cleaning, and disinfection and minimized airborne contamination. Attention was paid to good hygienic design and construction, appropriate location, and the provision of adequate facilities.

For all P2 attributes, the average values of each attribute were calculated and summed for each LTCF.

Food sampling. Samples of food were collected when the last tray was served to estimate the microbial load at the moment of consumption. RTE foods were selected based on their availability and representativeness in the menu provided per month at each LTCF. Two samples of salads or cooked meat products were collected per visit, for a total of 60 samples of RTE foods for the duration of the study. Samples were collected from lettuce salads (36.7%), cooked meat products (30.0%), mixed salads made of lettuce, tomato, and onion (13.3%), tomato salads (10.0%), mayonnaise-based deli salads (3.3%), rice salads (3.3%), and bean salads (3.3%). Temperatures data were taken with a food thermometer equipped with a special probe (HI 95809-1, Hanna Instruments, Woonsocket, RI) during storage of raw materials, during processing, and just before sample collection. Samples were placed in plastic sterile bags and kept refrigerated (0 to 4°C) during transportation to the laboratory (4 h after collection).

Microbial analyses of RTE foods. Samples (25 g) were diluted in 225 ml of buffered peptone water (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) and homogenized with a Stomacher 400 Circulator blender (Seward, Worthington, UK) for 2 min. When necessary, decimal dilutions were prepared in 0.85% physiologic saline solution (Panreac, Barcelona, Spain).

Populations of mesophilic aerobic bacteria (MAB) were determined by pour plating sample dilutions on plate count agar (PCA, Oxoid) and incubating the plates at 30°C for 48 h, following method ISO 4833:1991 (18). For analysis of total coliforms, violet red bile lactose agar was used as indicated by ISO 4832:1991 (19). Incubation was carried out at 30°C for 24 h. Coagulase-positive staphylococci (CPS) were analyzed according to ISO 6888-2:1999 (21). Samples were pour plated onto Baird Parker agar with rabbit plasma fibrinogen and incubated at 37°C for 24 to 48 h. The halo surrounding the black to gray colonies caused by production of free coagulase confirmed the presence of CPS. For enumeration of *Escherichia coli*, the ISO 7251:2005 method (23) was followed, based on the most-probable-number technique, using lauryl tryptone sulfate broth plus 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (LTS-MUG; Oxoid). Three dilutions of the initial sample were made: the first was 10 ml of 2 \times LTS-MUG plus 10 ml of sample, and the second and third were 9 ml of 1 \times LTS-MUG plus 1 ml of sample. The cultures were incubated at 37°C for 24 h. Gas production and fluorescence in tubes was considered an indication of presumptive *E. coli* colonies.

The presence of *Listeria* spp. and *Salmonella* also was investigated. For identification of *Listeria* spp., five presumptive colonies selected from Oxford and Palcam *Listeria* selective agars (Oxoid) were subcultured on tryptone soya agar (TSA; Oxoid) at 37°C for 24 h (ISO 11290-2:1998) (20). The following tests were performed on colonies isolated on TSA: catalase (3% H₂O₂ solution was prepared), motility in SIM medium (Oxoid), and Gram stain. For *Salmonella* detection (ISO 6579:2002) (22), the undiluted samples were incubated in buffered peptone water at 37°C for 24 h. After the preenrichment process, 0.1 ml of sample was transferred into Rappaport-Vassiliadis and selenite cystine broths (Oxoid) and incubated at 42°C for 24 h. Positive cultures were streaked on xylose lysine desoxycholate agar and incubated at 37°C for 24 to 48 h. Presumptive *Salmonella* colonies were identified as red with a bright black center.

Microbial analyses of working surfaces. On each visit and before meals were prepared, four working surfaces were evaluated: working tables, cutting boards, sinks, and faucets. The target surfaces were located in the processing rooms where salads and cooked meat products were to be prepared. MAB and *Enterobacteriaceae* counts were chosen as indicators of the effectiveness of cleaning and disinfection procedures. *Enterobacteriaceae* are often involved in cross-contamination events between surfaces, foods, and handlers (9, 33). Sterile polypropylene swabs (Nuovo Aptaca, Canelli, Italy) with Amies medium were used for surface sampling (working tables, cutting boards, and sinks). Each surface was swabbed in the area inside a sterile metal template (10 by 10 cm²), and the swab head (1 to 2 cm) was aseptically removed and immersed in a 7-ml tube of 1% buffered peptone water. For faucets, surfaces were swabbed to sample the approximate area that was in contact with hands, which was estimated as 225.1 \pm 21.1 cm² for men and 188.0 \pm 16.1 cm² for women (44). Samples were transported under refrigeration (2 to 5°C) to the laboratory.

For microbial enumeration, test tubes were shaken in a vortex (Heidoldh, Reax 2000, Kelheim, Germany) for 1 min, and 1 ml from each tube was pour plated onto PCA and violet red bile glucose agar (Oxoid) for determination of MAB and *Enterobacteriaceae*, respectively.

Air quality. For microbial air quality measurements, MAB and *Staphylococcus* were selected as microbial indicators because methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* are present in dust and airborne particles, which can be transmitted to foods (10). An air

TABLE 1. Average scores for part I (P1) and part II (P2) of the checklist for five visits to each of six long-term care facilities (A through F)

Attribute	Avg scores						Total avg
	A	B	C	D	E	F	
P1							
1. Use of gloves	0.0	0.0	0.0	0.2	0.6	0.6	0.23
2. Change of gloves	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.03
3. Correct hand washing	0.0	0.2	0.6	1.0	0.4	0.8	0.50
4. Use of hair net	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.8	0.97
5. Wearing jewelry	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.10
6. Use of apron for cleaning hands	0.2	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.10
7. Use of same cloth for cleaning	0.0	0.2	0.4	0.0	0.0	0.0	0.10
8. Proper cutboard material	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.00
9. Proper cooking utensils	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.00
P2							
10. Hand and glove cleanliness	2.0	1.4	2.4	3.0	2.0	2.4	2.20
11. Cleanliness of uniforms	2.4	1.6	2.6	3.6	2.2	3.8	2.70
12. Correct food handling	2.8	1.0	2.4	2.6	2.0	2.2	2.17
13. Cleanliness of work surfaces	2.0	2.0	3.2	3.4	2.0	3.4	2.67
14. Cleanliness of cooking utensils and equipment	2.4	2.2	3.8	4.0	3.0	3.6	3.17
15. Kitchen hygiene	2.6	2.4	3.0	3.4	2.0	3.0	2.73
Total score for P2	12.2	10.6	17.4	20	13.2	18.4	15.64

sampler (SAS Super 180, Scharlab, Barcelona, Spain) was used for counting the MAB and staphylococci (CFU per cubic meter of air). This equipment can be set to process a certain volume of air, in this case 500 liters, following the manufacturer's instructions. The air is blown onto a nutrient medium placed inside the apparatus. This active technique was selected because most guidelines use CFU per cubic meter as the standard unit for expressing air contamination (39). Three zones were chosen for air sampling: processing rooms where foods are prepared (as an indication of the cleanliness and disinfection procedures), sinks (as humid zones), and canteens where meals are served to consumers. MAB counts were determined on PCA incubated at 30°C for 48 h, and Baird Parker agar with egg yolk-tellurite emulsion (Oxoid) were used for determination of *Staphylococcus* spp. (incubation at 37°C for 24 h). Probable counts (Pr, statistical possibility of multiple particles passing through the same hole) were obtained using a conversion table, allowing calculation of counts in CFU per cubic meter. The equation included in the manufacturer's instructions was $X = (\text{Pr} \times 1,000)/V$, where Pr is the probable count obtained, V is the volume of sampled air, and X is the result in CFU per cubic meter of air.

Statistical analysis. Descriptive statistics for microbiological data and checklist scores were calculated with Excel (Microsoft, Redmond, WA). All statistical analyses were implemented in Statistica for Windows ver. 9.1 (Statsoft, Iberica, Lisbon, Portugal). Chi-square tests were used to identify significant differences between LTCFs regarding the P1 attributes of the checklist. The Pearson coefficient (*r*) was calculated to identify significant correlations between P2 attributes and microbiological data. Parametric tests (Student's *t* test, analysis of variance, and Duncan's test) at the 5% significance level were performed to determine whether there were significant differences between LTCFs regarding the microbiological data collected.

RESULTS

Checklist. In the six LTCF kitchens visited (A through F), handlers' habits were not always correct, as demonstrat-

ed by the average scores for P1 attributes (Table 1). One example was the use and changing of gloves; in three LTCFs (A, B, and C), handlers never used gloves. Change of gloves was observed during only one visit to facility E. Significant differences ($P < 0.05$) in hand washing were observed among the six LTCFs evaluated (Table 2). In 50% of the visits, hand washing was incorrect or absent during food preparation. However, other good hygienic practices were observed. Wearing of jewelry was observed only at facility B; the use of hair nets was frequent (97%), and cutting boards and cooking utensils were acceptable in all kitchens inspected. The use of the apron for cleaning hands and the use of the same cloth for cleaning various surfaces were not observed in facilities D, E, and F.

Mean scores obtained for P2 attributes (Table 3) were considered acceptable because they were higher than 2.0 for all LTCFs except facility B, which had an unacceptable score in attributes 10 (cleanliness of hands and gloves), 11

TABLE 2. Contingency table results for comparisons of scores for attributes from part I of the checklist evaluated at six long-term care facilities

Attribute	χ^2	P value
1. Use of gloves	10.000	0.075
2. Change of gloves	5.172	0.395
3. Correct hand washing	12.321	0.031
4. Use of hair net	5.172	0.395
5. Wearing jewelry	16.667	0.005
6. Use of apron for cleaning hands	7.778	0.169
7. Use of same cloth for cleaning	7.778	0.169
8. Proper cutboard material	— ^a	
9. Proper cooking utensils	— ^a	

^a Average scores for attributes 8 and 9 were the same for all six facilities.

TABLE 3. Mean and standard deviation scores and Pearson correlation coefficients (r) for the attributes of part II of the checklist for long-term care facilities

Attribute	Mean	SD	r^a				
			10	11	12	13	14
10. Hand and glove cleanliness	2.17	0.87					
11. Cleanliness of uniforms	2.70	1.09	0.635*				
12. Correct food handling	2.17	0.79	0.357	0.501*			
13. Cleanliness of work surfaces	2.67	1.09	0.385*	0.522*	0.385*		
14. Cleanliness of cooking utensils and equipment	3.27	0.87	0.348	0.270	0.084	0.424*	
15. Kitchen hygiene	2.73	0.69	0.418*	0.532*	0.399*	0.791*	0.467*

^a Asterisks indicate significant correlation ($P < 0.05$).

(cleanliness of uniforms), and 12 (correct food handling). Facilities D and F obtained the highest total scores (20 and 18.4, respectively; Table 1), highlighting the good handling and cleanliness conditions. Pearson correlation coefficients (r , Table 3) revealed significant relationships ($P < 0.05$) between P2 attributes of the checklist. The highest coefficients were obtained for the relationship between kitchen hygiene (attribute 15) and cleanliness of work surfaces (attribute 13) ($r = 0.791$) and between cleanliness of uniforms (attribute 11) and of hands and gloves (attribute 10) ($r = 0.635$).

Microbial analyses of food samples. Table 4 shows the results of microbial counts obtained at the six LTCFs (A through F). Mean MAB counts were higher for lettuce salads, especially at facilities A and C (6.9 ± 0.0 [SD] and 6.1 ± 0.1 log CFU/g, respectively). Most of the other salads had mean MAB counts below 5 log CFU/g, except at facilities A, B, and C. Cooked meat products had lower MAB counts, the highest mean level was found at facility E (4.2 ± 0.2 log CFU/g). For total coliforms and CPS, the highest mean counts were found at facility A in lettuce salads (5.4 ± 0.2 and 2.2 ± 0.2 log CFU/g, respectively). Microbial levels found in cooked meat products were generally low, although a mean close to 2 log CFU/g was obtained at facility D.

E. coli was found in samples of mixed salads and lettuce salads (6.3%) at facility B, but in all cases counts were lower than the detection limit of the technique (10 CFU/g). No *E. coli* contamination was found in cooked meat products. No other pathogens were found in any of the samples analyzed.

The mean (\pm SD) storage temperature of raw materials was $5.6 \pm 3.1^\circ\text{C}$. The mean environmental temperature during processing was $20.6 \pm 4.9^\circ\text{C}$, and the final RTE foods had a mean temperature of $14.1 \pm 4.3^\circ\text{C}$.

Correlation coefficients between microbial counts of RTE foods and checklist scores revealed a significant relationship ($P < 0.05$) between MAB counts and nonapproved cleaning methods such as the use of an apron for cleaning surfaces (attribute 6; $r = 0.376$). Another relevant finding was a significant negative correlation between the presence of *E. coli* and cleanliness of the hands and/or gloves (attribute 10; $r = -0.363$), cleanliness of uniforms (attribute 11; $r = -0.425$), and correct hand washing (attribute 3; $r = -0.401$).

Food contact surfaces. Surface counts were highly variable, suggesting irregular cleanliness procedures. Mean counts are shown in Table 5. For faucets, results are based on samples from the area corresponded to the zone in contact with the hands.

TABLE 4. Mesophilic aerobic bacteria (MAB), total coliforms (TC), and coagulase-positive staphylococci (CPS) in various RTE foods at six long-term care facilities (A through F)

RTE food type	Microbial group	Counts (log CFU/g) ^a					
		A	B	C	D	E	F
Lettuce salads	MAB	6.9 ± 0.0	3.9 ± 0.1	6.1 ± 0.1	4.0 ± 0.2	4.1 ± 0.3	4.9 ± 0.1
	TC	5.4 ± 0.2	2.1 ± 0.1	3.7 ± 0.1	2.7 ± 0.2	3.0 ± 0.0	2.8 ± 0.2
	CPS	2.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0	1.5 ± 0.6	0.8 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.9 ± 0.5
Mixed salads	MAB	NA	5.6 ± 0.1	5.0 ± 0.1	4.1 ± 0.1	NA	NA
	TC	NA	2.4 ± 0.1	2.6 ± 0.1	1.8 ± 0.1	NA	NA
	CPS	NA	1.4 ± 0.2	1.1 ± 0.4	1.5 ± 0.3	NA	NA
Other salads ^b	MAB	5.0 ± 0.1	5.4 ± 0.1	4.2 ± 0.0	NA	3.8 ± 0.0	NA
	TC	3.7 ± 0.2	2.5 ± 0.1	0.6 ± 0.2	NA	1.4 ± 0.1	NA
	CPS	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.0	0.4 ± 0.2	NA	1.6 ± 0.1	NA
Cooked meat products	MAB	2.4 ± 0.0	NA	2.3 ± 0.0	3.3 ± 0.3	4.2 ± 0.2	2.2 ± 0.0
	TC	0.0 ± 0.0	NA	1.0 ± 0.1	2.6 ± 0.2	1.0 ± 0.1	0.0 ± 0.0
	CPS	0.0 ± 0.0	NA	0.4 ± 0.1	1.9 ± 0.3	0.7 ± 0.4	1.3 ± 0.0

^a Counts are mean \pm standard deviation. NA, not available on the menu.

^b Other salads included rice salad, tomato salad, bean salad, and mayonnaise-based deli salad.

TABLE 5. *Mesophilic aerobic bacteria (MAB) and Enterobacteriaceae (Ent) on food contact surfaces at six long-term care facilities (A through F)*

LTCF	Mean \pm SD counts (CFU/cm ²) ^a													
	Working tables				Cutting boards				Sinks				Faucets ^b	
	MAB	Ent	MAB	Ent	MAB	Ent	MAB	Ent	MAB	Ent	MAB	Ent		
A	0.76 \pm 0.18 A	0.65 \pm 0.32 AB	10.76 \pm 2.10 A	0.99 \pm 0.10 B	1.96 \pm 0.53 A	0.76 \pm 0.18 B	27.80 \pm 6.66 B	1.05 \pm 0.11 AB						
B	7.55 \pm 0.72 AB	0.97 \pm 0.11 BC	46.34 \pm 14.39 B	1.95 \pm 0.36 C	4.68 \pm 1.08 B	1.10 \pm 0.12 C	10.47 \pm 8.66 A	1.21 \pm 0.15 AB						
C	13.30 \pm 12.51 B	2.06 \pm 0.35 C	10.38 \pm 6.05 A	1.65 \pm 0.21 C	8.17 \pm 1.81 B	0.79 \pm 0.17 B	>300 C	4.39 \pm 4.32 B						
D	3.77 \pm 1.23 AB	0.00 A	>300 C	0.00 A	12.02 \pm 8.04 B	0.00 A	>300 C	0.00 A						
E	0.49 \pm 0.30 A	0.00 A	>300 C	1.07 \pm 0.12 B	23.66 \pm 12.68 C	0.71 \pm 0.21 B	96.38 \pm 12.86 C	3.22 \pm 0.50 AB						
F	3.37 \pm 0.50 A	1.21 \pm 0.15 BC	3.45 \pm 0.57 A	1.01 \pm 0.10 B	16.22 \pm 1.55 BC	1.36 \pm 0.20 C	>300 C	2.48 \pm 0.33 AB						

^a Within a column, means with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

^b For faucets, results are based on samples from the area that corresponded to the zone in contact with hands.

For working tables, low mean counts were obtained for both indicators, except at facility C, with more than 10 and 2 CFU/cm² for MAB and *Enterobacteriaceae*, respectively. Cutting boards had high MAB counts at facilities B, D, and E, with two mean levels above 300 CFU/cm². Although *Enterobacteriaceae* were detected, levels were lower than 2 CFU/cm² in all cases. Microbial quality of sinks was generally acceptable, except at facilities E and F, which had mean MAB counts exceeding 15 CFU/cm². Faucets were the most contaminated surface studied (Table 5).

Significant correlations were found between microbial quality of surfaces and some of the P2 attributes of the checklist ($P < 0.05$). High levels of MAB and *Enterobacteriaceae* on cutting boards were negatively correlated with attribute 13, cleanliness of work surfaces ($r = -0.478$ and -0.473 , respectively), and attribute 12, correct food handling ($r = -0.400$ and -0.580 , respectively). Kitchen hygiene (attribute 15) was negatively correlated with *Enterobacteriaceae* levels on cutting boards ($r = -0.455$) and sinks ($r = -0.430$).

Air quality. Mean counts for MAB and *Staphylococcus* in the air are presented in Table 6. MAB counts remained below 300 CFU/m³, although they were slightly higher in humid zones such as sinks. Facilities A and C had the lowest mean MAB counts around sinks. *Staphylococcus* levels were higher around sinks and in canteens, but in general microbial counts were highly variable. Thus, no significant differences were found between the three zones evaluated ($P < 0.05$).

A negative correlation was found between MAB and *Staphylococcus* counts in LTCF kitchens and the scores obtained for attribute 10, cleanliness of gloves and hands ($r = -0.46$ for MAB and $r = -0.45$ for *Staphylococcus*), and attribute 15, kitchen hygiene ($r = -0.36$ for MAB and $r = -0.41$ for *Staphylococcus*).

The high variability in air quality observed between visits at all LTCFs was attributed to the heterogeneous microbial distributions in the air in the different food preparation and distribution areas.

DISCUSSION

Checklist evaluation. The results obtained from the checklist indicated substantial differences among the LTCFs visited. In several other studies, checklists or questionnaires have been used to identify critical control points and to conduct food safety and management evaluations (25, 28, 37, 41, 54, 56, 59). In general, LTCF kitchens were correctly equipped but some noncompliant behaviors of handlers were observed regarding, for example, use and change of gloves, use of aprons for cleaning hands, and wearing jewelry. These findings matched with those found by Veiros et al. (56) in Portuguese canteens, where only 24% of the attributes evaluated in checklists were classified as satisfactory. The scores on attributes evaluated in the checklist were correlated with microbial counts in foods because improper hygienic measures can increase bacterial transfer during food preparation. This contamination can favor bacterial spread when microfiber cloths are used for

TABLE 6. *Mesophilic aerobic bacteria (MAB) and Staphylococcus (ST) in the air of processing rooms, sinks, and canteens in six long-term care facilities (A through F)*

Sample area	Microbial group	Mean \pm SD counts (CFU/m ³)					
		A	B	C	D	E	F
Processing rooms	MAB	176 \pm 148	153 \pm 95	87 \pm 45	123 \pm 71	164 \pm 67	>300
	ST	21 \pm 6	19 \pm 13	14 \pm 6	24 \pm 22	27 \pm 14	38 \pm 4
Sinks	MAB	113 \pm 65	270 \pm 138	51 \pm 34	>300	>300	201 \pm 196
	ST	32 \pm 21	26 \pm 4	29 \pm 15	27 \pm 15	74 \pm 54	32 \pm 19
Canteens	MAB	287 \pm 152	262 \pm 228	133 \pm 57	36 \pm 21	93 \pm 58	164 \pm 77
	ST	76 \pm 70	46 \pm 35	55 \pm 48	18 \pm 16	34 \pm 33	72 \pm 70

cleaning, as reported by Bergen et al. (4). The use of proper hair nets was noted on only 23% of the observation occasions at LTCFs compared with 33% in another similar study performed in school canteens (8). Regarding the use of gloves, in our study the general trend observed was that food handlers did not use gloves regularly and hand washing was not always done correctly. These inappropriate behaviors can lead to the presence of pathogens or their indicators on surfaces, and these pathogens can survive for a relatively long time and could also be transmitted through the food chain (29). Improper food handling is responsible for 97% of foodborne illnesses associated with food service systems (16). Thus, identification of deficient practices should lead to the implementation of effective training methods for food handlers in food service systems. The results of several studies have confirmed that training of food handlers can be effective (6, 47, 56). However, training should be repeated over time to overcome the reluctance of food handlers to apply the acquired knowledge (15). Other factors influencing the hygiene of food handlers and equipment could be the number of meals served, the socioeconomic status of the geographical area, and the number and qualifications of the staff members (5, 16). In other studies (28, 48), three times as many foodborne disease outbreaks were associated with poor personal hygiene than with unsafe food sources. Solberg et al. (50) recommended periodic microbiological assessment of high-risk food service operations, in addition to visual inspection, for minimizing the risk of foodborne disease outbreaks. Based on our results, prevention measures should be encouraged among food handlers to increase the safety of meals served at LTCFs.

Assessment of microbiological safety and quality. Microbial safety of foods examined at these LTCFs indicated the absence of pathogens. However, samples that were positive for indicator bacteria such as *E. coli* were collected (6.3%). The RTE foods implicated were mixed salads and lettuce salads.

Currently, no Spanish legislation has addressed microbiological criteria in RTE foods. However, other researchers have recommended MAB analysis in these products as indicators of their microbiological status (3). Réglie-Poupet et al. (43) proposed microbiological limits of 5×10^6 CFU/g (6.7 log CFU/g) for MAB and 10^4 CFU/g (4 log CFU/g) for total coliforms in RTE foods at retail. In our study, only

four samples (6.67%) collected from the LTCFs failed to meet these criteria. In the United Kingdom, guidelines for RTE foods (17) state that CPS counts above 10^4 CFU/g are unsatisfactory. In our study, the highest CPS count in cooked meat products was 1.9 ± 0.3 log CFU/g from facility D (Table 4). However, no sample exceeded the microbial limit for CPS established in the United Kingdom guidelines.

These results corroborate those of other studies in catering establishments, where a certain percentage of samples exceeded the stipulated limits for spoilage and/or indicator microorganisms, thus revealing inadequate hygiene systems (47). Good hygiene is especially important in food service systems where many meals are prepared every day in a short period of time and employees are more likely to make errors in their food handling practices.

In our study, food contact surfaces with the highest microbial loads were cutting boards and faucets. Microbial limits for food contact surfaces have been proposed at 10 to 20 CFU/cm² (50). In another study, Sneed et al. (49) proposed a standard for food contact surfaces of less than 20 CFU/cm² for MAB and less than 10 CFU/cm² for *Enterobacteriaceae*. These authors reported high levels of MAB on durable resin cutting boards (>20 CFU/cm²), similar to those found in our study at facilities B, D, and E. Other researchers (35) reported lower average levels for MAB in cutting boards (10.16 CFU/4 cm²), but 6.7% of samples analyzed had levels above 50 CFU/4 cm². Microorganisms can become lodged in cracks and crevices of cutting boards that are not properly sanitized (53), and the humidity of cutting boards may favor detachment of bacteria from these food contact surfaces when they are swab sampled, enhancing bacterial recovery (32). Faucets at the LTCFs evaluated were highly contaminated, with levels above 300 CFU/cm² and 10 CFU/cm² for MAB and *Enterobacteriaceae*, respectively, in three of the six LTCFs. Others have reported that hand contact surfaces are more likely to be contaminated than are food contact surfaces (13) and that microbial transfer by hands is a potential method of cross-contamination (42).

Recontamination via air can become an important issue when food products stand for a long time in areas with the potential for airborne contamination. The number of microorganisms that enter the product via air depends on the settling velocity of the microorganisms, the level of microorganisms in the air, the exposure time, and the area of the product (58). Other researchers have reported that high

air contamination levels in processing plants or slaughterhouses are caused by aerosol formation, people in the area, and the overlap of dirty and clean areas (7). Pearce et al. (40) reported $>10^3$ CFU/m³ in dirty food processing facilities but <400 CFU/m³ in cleaned and refrigerated zones. Al-Dagal et al. (2) reported <300 CFU/m³ for MAB in a food processing meat plant when air quality was measured. However, levels of *S. aureus* were low (1 to 8 CFU/m³) probably because this microorganism does not survive for long periods in aerosols (46). In our study, the highest levels of *Staphylococcus* found in air were >70 CFU/m³ in canteens at facilities A and F (Table 6). Canteens were not isolated from external environments in all LTCFs evaluated. Others have reported similar counts for *Staphylococcus* in ventilation zones in feedstuff manufacturing factories (27) and in sewage treatment plants (12).

Results provided in this study should help risk and food safety managers to better define the control measures that should be adopted in collective settings to prevent foodborne infections. Handlers' practices and hygienic and sanitary conditions were not always appropriate; improper behaviors were observed regarding various practices such as hand and glove cleaning, use of aprons for cleaning, wearing jewelry, or infrequent change of gloves. Good manufacturing practices and HACCP principles should be followed, and special training should be provided for food handlers. Although the microbiological quality of RTE foods in the LTCFs evaluated was considered acceptable, care should be taken regarding cleaning and disinfection procedures, especially of those surfaces that can come into contact with foods or hands. Continuous improvement of catering food services is needed in the preparation of RTE foods served to high-risk populations such as elderly people.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partly financed by the AGR-01879 Excellence Project (Andalusia Government), the AGL 2008-03298/ALI project (Spanish Ministry of Science and Innovation), the European Regional Development Fund, and a grant awarded by the Spanish Agency for International Development Cooperation.

REFERENCES

- Abellán, A., G. Fernández-Mayoralas, V. Rodríguez, and F. Rojo. 1996. Statistical manual of the population ageing. Fundación Caja Madrid, Madrid.
- Al-Dagal, M., O. Mo, D. Y. C. Fung, and C. Kastner. 1992. A case study of the influence of microbial quality of air on product shelf life in a meat processing plant. *J. Dairy Food Environ. Sanit.* 12:69–70.
- Ayçiçek, H., B. Sarimehmetoğlu, and S. Cariroğlu. 2004. Assessment of the microbiological quality of meals sampled at the meal serving units of a military hospital in Ankara, Turkey. *Food Control* 15:379–384.
- Bergen, L. K., M. Meyer, M. Høg, B. Rubenhagen, and L. P. Andersen. 2009. Spread of bacteria on surfaces when cleaning with microfibre cloths. *J. Hosp. Infect.* 71:132–137.
- Bering, C. C. 2008. Condições higiênicas-sanitárias no preparo de refeições em creches comunitárias de Belo Horizonte, Minas Gerais. Tese de Mestre em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
- Buccheri, C., C. Mamma, S. Giammanco, M. Giammanco, M. La Guardia, and A. Casuccio. 2010. Knowledge, attitudes and self-reported practices of food service staff in nursing homes and long-term care facilities. *Food Control* 21:1367–1373.
- Byrne, B., J. Lyng, G. Dunne, and D. J. Bolton. 2008. An assessment of the microbial quality of the air within a pork processing plant. *Food Control* 19:915–920.
- Campos, C. A. K., S. A. M. Cardonha, L. B. Galvão-Pinheiro, R. N. Ferreira, P. R. Medeiros de Azevedo, and M. T. L. Stamford. 2009. Assessment of personal hygiene and practices of food handlers in municipal public schools of Natal, Brazil. *Food Control* 20:807–810.
- Chen, Y., K. M. Jackson, F. P. Chea, and D. W. Schaffner. 2001. Quantification and variability analysis of bacterial cross-contamination rates in common food service tasks. *J. Food Prot.* 64:72–80.
- Cimolai, N. 2008. The role of healthcare personnel in the maintenance and spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Public Health* 1:78–100.
- Codex Alimentarius Commission. 2003. Recommended international code of practice. General principles of food hygiene. CAC/RCP 1-1969, Rev. 4-2003. Codex Alimentarius Commission, Washington, DC.
- De Luca, G., F. Zanetti, A. C. Perari, and S. Stampi. 2001. Airborne coagulase negative staphylococci produced by a sewage treatment plant. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 204:231–238.
- DeVita, M. D., R. K. Wadhera, M. L. Theis, and S. C. Ingham. 2007. Assessing the potential of *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus* transfer to foods and customers via a survey of hands, hand-contact surfaces and food-contact surfaces at foodservice facilities. *J. Foodserv.* 18:76–79.
- European Commission. 2004. Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on the hygiene of foodstuffs. *Off. J. Eur. Union L* 139:1–54.
- Furnari, G., N. Molino, S. Bruno, G. Quaranta, P. Laurenti, and G. Ricciardi. 2002. Efficacy and critical implications of food handlers' professional training: analysis of an experience. *Ann. Ig.* 14(5):419–426. (In Italian.)
- Griffith, C. 2000. Food safety in catering establishments, p. 235–256. In J. M. Farber and E. C. D. Todd (ed.), *Safe handling of foods*. Marcel Dekker, New York.
- Health Protection Agency of United Kingdom. 2009. Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods placed on the market. Health Protection Agency, London.
- International Organization for Standardization. 1991. Microbiology. General guidance for the enumeration of micro-organisms. Colony count technique at 30°C. ISO 4833:1991. International Organization for Standardization, Geneva.
- International Organization for Standardization. 1991. Microbiology. General guidance for the enumeration of coliforms. Colony count technique. ISO 4832:1991. International Organization for Standardization, Geneva.
- International Organization for Standardization. 1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 2. Enumeration method. ISO 11290-2:1998/Amd 1: 2004. International Organization for Standardization, Geneva.
- International Organization for Standardization. 1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). Part 2. Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium. ISO 6888-2:1999. International Organization for Standardization, Geneva.
- International Organization for Standardization. 2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. ISO 6579:2002. International Organization for Standardization, Geneva.
- International Organization for Standardization. 2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli*. Most probable number technique. ISO 7251:2005. International Organization for Standardization, Geneva.
- Jacxsens, L., J. Kussaga, P. A. Luning, M. Van der Spiegel, F. Devlieghere, and M. Uyttendaele. 2009. A microbial assessment scheme to measure microbial performance of food safety management systems. *Int. J. Food Microbiol.* 134:113–125.

25. Jevšnik, M., V. Hlebec, and P. Raspor. 2008. Food safety knowledge and practices among food handlers in Slovenia. *Food Control* 19: 1107–1118.
26. Kennedy, J., and P. Wall. 2007. Food safety challenges, p. 8–19. In M. Storrs, M. C. Devoluy, and P. Cruveiller (ed.), *Food safety handbook: microbiological challenges*. bioMérieux Education, Marcy l'Etoile, France.
27. Kim, K. Y., H. T. Kim, D. Kim, J. Nakajima, and T. Higuchi. 2009. Distribution characteristics of airborne bacteria and fungi in the feedstuff-manufacturing factories. *J. Hazard. Mater.* 169:1054–1060.
28. Kuo, T., H. Dela Cruz, M. Redelings, L. V. Smith, R. Reporter, P. A. Simon, J. E. Fielding, and S. M. Teutsch. 2010. Use of a self-assessment questionnaire for food safety education in the home kitchen—Los Angeles County, California, 2006–2008. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 59(34):1098–1101.
29. Kusumaningrum, H. D., G. Riboldi, W. C. Hazeleger, and R. R. Beumer. 2003. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *Int. J. Food Microbiol.* 85:227–236.
30. Legnani, P., E. Leoni, M. Berveglieri, G. Mirolo, and N. Alvaro. 2004. Hygienic control of mass catering establishments, microbiological monitoring of food and equipment. *Food Control* 15:205–211.
31. Malheiros, P., C. Passos, L. Casarin, L. Serraglio, and E. C. Tondo. 2010. Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry meat to surfaces of stainless steel and polyethylene and their disinfection. *Food Control* 21:298–301.
32. Marples, R. R., and A. G. Towers. 1979. A laboratory model for the investigation of contact transfer of microorganisms. *J. Hyg.* 82:237–248.
33. Michaels, B., C. Keller, M. Blevins, G. Paoli, T. Ruthman, E. Todd, and C. J. Griffith. 2004. Prevention of food worker transmission of foodborne pathogens: risk assessment and evaluation of effective hygiene intervention strategies. *Food Serv. Technol.* 4:31–49.
34. Ministry of Labor and Social Affairs. 2001. Second national congress of elderly people. Instituto de Mayores y Servicios Sociales, Ministry of Labor and Social Affairs, Madrid.
35. Montville, R., and D. W. Schaffner. 2004. Statistical distributions describing microbial quality of surfaces and foods in food service operations. *J. Food Prot.* 67:162–167.
36. National Epidemiology Center, Carlos III Health Institute. 2008. XIX national symposium of meat and food safety, Zaragoza, Spain, 6 November 2008.
37. Nelson, J. M., R. Bednarczyk, J. Nadle, P. Clogher, J. Gillespie, A. Daniels, M. Platenga, A. Ingram, K. Edge, J. P. Furuno, and E. Scallan. 2008. FoodNet survey of food use and practices in long-term care facilities. *J. Food Prot.* 71:365–372.
38. Nörrung, B., and S. Buncic. 2008. Microbial safety of meat in the European Union. *Meat Sci.* 78:14–24.
39. Pasquarella, C., O. Pitzurra, and A. Savino. 2000. The index of microbial air contamination. *J. Hosp. Infect.* 46:241–256.
40. Pearce, R. A., J. J. Sheridan, and D. J. Bolton. 2006. Distribution of airborne microorganisms in commercial pork slaughter processes. *Int. J. Food Microbiol.* 107:186–191.
41. Pérez-Rodríguez, F., R. Castro, G. D. Posada-Izquierdo, A. Valero, E. Carrasco, R. M. García-Gimeno, and G. Zurera. 2010. Evaluation of hygiene practices and microbiological quality of cooked meat products during slicing and handling at retail. *Meat Sci.* 86:479–485.
42. Pérez-Rodríguez, F., A. Valero, E. Carrasco, R. M. García, and G. Zurera. 2008. Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 19:130–143.
43. Réglier-Poupet, C., R. Parain, P. Beauvais, H. Descamps, H. Gillet, J. Y. Le Peron, P. Berche, and A. Ferroni. 2005. Evaluation of the quality of hospital food from the kitchen to the patient. *J. Hosp. Infect.* 59:131–137.
44. Ren, S., X. Ni, H. Xu, J. Den, Y. Wang, J. Sun, Q. Kong, J. Zha, H. Jin, H. Zhao, and L. Shen. 2011. The relationship between hand area and hand contamination. *Am. J. Infect. Control* 39:66–68.
45. Saka, B., O. Kaya, G. B. Ozturk, N. Erten, and M. A. Karan. 2010. Malnutrition in the elderly and its relationship with other geriatric syndromes. *Clin. Nutr.* 29:745–748.
46. Salustiano, V. C., N. J. Andrade, S. C. C. Brandão, R. M. C. Azeredo, and S. A. K. Lima. 2003. Microbiological air quality of processing areas in a dairy plant as evaluated by sedimentation technique and a one-stage air sampler. *Braz. J. Microbiol.* 34:255–259.
47. Santana, N. G., R. C. C. Almeida, J. S. Ferreira, and P. F. Almeida. 2009. Microbiological quality and safety of meals served to children and adoption of good manufacturing practices in public school catering in Brazil. *Food Control* 20:255–261.
48. Sivapalasingam, S., C. R. Friedman, L. Cohen, and R. V. Tauxe. 2004. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *J. Food Prot.* 67: 2342–2353.
49. Sneed, J., C. Strohbehn, S. A. Gilmore, and A. Mendonca. 2004. Microbiological evaluation of foodservice contact surfaces in Iowa assisted-living facilities. *J. Am. Diet. Assoc.* 104:1722–1724.
50. Solberg, M., J. J. Buckalew, C. W. Chen, D. W. Schaffner, K. O'Neil, J. McDowell, L. S. Post, and M. Boderck. 1990. Microbial safety assurance system for foodservice facilities. *Food Technol.* 44:68–73.
51. Strausbaugh, L. J. 2001. Emerging health care-associated infections in the geriatric population. *Emerg. Infect. Dis.* 7:268–271.
52. Swanger, N., and D. G. Rutherford. 2004. Foodborne illness: the risk environment for chain restaurants in the United States. *Int. J. Hosp. Manage.* 23:71–85.
53. Todd, E. C. D., J. D. Greig, C. A. Bartleson, and B. S. Michaels. 2009. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 6. Transmission and survival of pathogens in the food processing and preparation environment. *J. Food Prot.* 72:202–219.
54. Tokuç, B., G. Ekuklu, U. Berberoglu, E. Bilge, and H. Dedeler. 2009. Knowledge, attitudes and self-reported practices of food service staff regarding food hygiene in Edirne, Turkey. *Food Control* 20:565–568.
55. U.S. Food and Drug Administration. 2005. Food code. Available at: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/RetailFoodProtection/FoodCode/FoodCode2005/default.htm>. Accessed 25 May 2010.
56. Veiros, M. B., R. P. C. Proença, M. C. T. Santos, L. Kent-Smith, and A. Rocha. 2009. Food safety practices in a Portuguese canteen. *Food Control* 20:936–941.
57. Villarreal, R. M., R. Sangrà, and A. F. Codina. 2009. Nutritional assessment of menus served in five geriatric homes and their adaptation to the recommended intakes for the elderly population. *Actividad Diet.* 13(2):51–58.
58. Whyte, W. 1986. Sterility assurance and models for assessing airborne bacterial contamination. *J. Parenter. Sci. Technol.* 40(5): 188–197.
59. Youn, S., and J. Sneed. 2003. Implementation of HACCP and prerequisite programs in school foodservice. *J. Am. Diet. Assoc.* 103: 55–60.

PUBLICACIÓN 3

PUBLICACIÓN 3: CONDICIONES HIGIÉNICAS Y SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS REFRIGERADOS LISTOS PARA EL CONSUMO SERVIDOS EN HOSPITALES DEL SUR DE ESPAÑA

HYGIENIC CONDITIONS AND MICROBIOLOGICAL STATUS OF CHILLED READY-TO-EAT PRODUCTS SERVED IN SOUTHERN SPANISH HOSPITALS

PUBLICACIÓN 3: CONDICIONES HIGIÉNICAS Y SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS REFRIGERADOS LISTOS PARA EL CONSUMO SERVIDOS EN HOSPITALES DEL SUR DE ESPAÑA

RESUMEN

El presente estudio se realizó con el objeto de analizar microbiológicamente los platos refrigerados de ensalada de lechuga y cárnicos cocidos RTE servidos en varios hospitales de Andalucía. Al igual que en los estudios realizados en comedores escolares y centros geriátricos, se evaluaron las prácticas de manipulación de los alimentos, el nivel de contaminación de las superficies de trabajo y del ambiente de las zonas de procesado y se llevó a cabo la valoración de los perfiles de t/T de refrigeración de los alimentos desde su recepción hasta el servicio a los consumidores. Los resultados obtenidos ayudaron a una mejor definición de las medidas de control a adoptar en estos establecimientos.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en 5 hospitales de Andalucía durante el período de Junio de 2008 a Septiembre de 2009. Los hospitales se seleccionaron de acuerdo al volumen de comida diaria (>1,000 comidas/día) y la presencia de personal experto en control de la calidad de los alimentos. Se realizaron un total de 5 visitas/centro.

MUESTREO DE LOS ALIMENTOS

Se tomaron 3 muestras tanto de ensalada de lechuga y como de jamón cocido para un total de 30 muestras por centro/por visita (15 muestras por cada alimento). El momento de la toma de muestras, al igual que los estudios realizados en los anteriores centros, se correspondió con los últimos platos servidos, de forma que los recuentos microbiológicos estuvieran relacionados con la contaminación antes del consumo.

Como se mencionó en la Publicación 1, los alimentos se analizaron para diferentes microorganismos indicadores. Para el caso de los hospitales, se consideraron los criterios relativos a los niveles de *Staphylococcus* coagulasa positivos indicados en la Guía de la Agencia para la Protección de la Salud del Reino Unido (HPA, 2009) (Riesgo Bajo de contaminación: <20 ufc/g, Moderado: entre 20 y 10⁴ ufc/g y Alto > 10⁴ ufc/g).

CRITERIOS DE REFERENCIA TOMADOS PARA DETERMINAR EL GRADO DE CONTAMINACIÓN DE LAS SUPERFICIES DE TRABAJO EN CONTACTO CON LOS ALIMENTOS

La higiene de las superficies se evaluó de acuerdo a las normas microbiológicas indicadas por Dancer (2004). Se consideraron aceptables aquellas superficies con recuentos de *AEM* inferiores a 5 ufc/cm² y *Enterobacterias* inferiores a 1 ufc/cm².

SEGUIMIENTO DEL TIEMPO/TEMPERATURA DE LOS PLATOS DESDE LA RECEPCIÓN HASTA EL CONSUMO

La Temperatura de los alimentos estudiados se midió con un termómetro equipado con una sonda especial para alimentos sólidos (HI 95809-1, Hanna Instruments, USA). Se efectuó la monitorización de los t/T de cada una de las etapas previas al consumo del plato. Para ello se confeccionó un diagrama de flujo en el que se dividieron las mediciones en 6 etapas: 1ª Etapa–Recepción (t₁/T₁); 2ª Etapa–Almacenamiento en cámaras frigoríficas (t₂/T₂); 3ª Etapa–Procesado (t₃/T₃); 4ª Etapa–Preparación de las bandejas o del alimento (t₄/T₄); 5ª Etapa– Distribución (t₅/T₅); 6ª Etapa–Servicio al último paciente (t₆/T₆). Cabe destacar que las mediciones se realizaron al final de cada etapa (Figura 1, del artículo publicado).

RESULTADOS

De forma general, los resultados de los cuestionarios indicaron una variabilidad en las prácticas de manipulación y las condiciones de higiene de los hospitales estudiados.

Los valoraciones obtenidas a partir de los atributos de frecuencias arrojaron que en todos los hospitales se cumplió con el uso de gorros y de equipos y utensilios adecuados, no obstante el uso y cambio de guantes varió significativamente entre los centros ($p < 0,05$). Cabe destacar que se evidenciaron hábitos inadecuados por parte de los manipuladores, como el uso de joyas, de los delantales para limpiarse las manos y de un mismo paño para limpiar diferentes superficies. La segunda parte del cuestionario relacionada con los atributos semicuantitativos indicó que existieron ciertas deficiencias en cuanto a las condiciones higiénico-sanitarias y las prácticas de manipulación de los alimentos, lo cual se tradujo en que sólo dos hospitales alcanzaron las mejores puntuaciones (en torno a los 20 puntos). Se evidenciaron correlaciones entre la limpieza de las superficies de trabajo y la higiene de las cocinas ($r = 0,83$) que a su vez se relacionaron con la correcta manipulación de los alimentos y la limpieza de equipos y utensilios de cocina (Tabla 4, artículo publicado).

CONDICIONES MICROBIOLÓGICAS DE LAS MUESTRAS DE ENSALADA DE LECHUGA Y JAMÓN COCIDO

Los resultados de los análisis microbiológicos se representan en la Figura 2 del artículo publicado.

En las muestras de ensaladas de lechuga los niveles de *AEM* estuvieron por debajo de 5 log ufc/g. Los recuentos de *CT* no superaron los 4 log ufc/g y oscilaron desde 1,05 ± 0,65 log ufc/g hasta >3 log ufc/g. Los recuentos de *Staphylococcus* coagulasa positivos no superaron los 4 log ufc/g y el nivel promedio más alto fue de 1,60 ± 0,64 log ufc/g.

Las muestras de jamón cocido presentaron recuentos promedio más bajos de *AEM* y *CT* (en este caso menores de 1 log ufc/g). Sin embargo, los niveles de contaminación por *Staphylococcus* coagulasa positivos fueron más altos, probablemente relacionados con fenómenos de contaminación cruzada durante la manipulación y/o distribución del producto. Todas las muestras de jamón cocido presentaron un riesgo Moderado de contaminación por *Staphylococcus* coagulasa positivos ya que los recuentos superaron las 20 ufc/g (HPA, 2009); incluso hubo casos donde las muestras presentaron recuentos superiores de 2 log ufc/g. Los coeficientes de correlación indicaron una correlación negativa entre la limpieza de las manos y guantes y la concentración final de *Staphylococcus* coagulasa positivos en las muestras de jamón cocido, lo que corrobora la relación que hay entre la presencia del microorganismo y las condiciones de higiene durante la manipulación y distribución.

E. coli se aisló de cinco muestras de ensalada de lechuga y los recuentos fueron inferiores a 10 ufc/g. No se detectaron patógenos como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* sp en ninguna de las muestras.

CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LAS SUPERFICIES DE CONTACTO CON LOS ALIMENTOS

Las superficies de trabajo también presentaron recuentos variables, lo que sugirió que los procedimientos de limpieza no fueron regulares (Tabla 5 del artículo publicado).

En la mayoría de los hospitales, las mesas de trabajo presentaron recuentos promedio de *AEM* inferiores a 5 ufc/cm²; correspondiéndose el recuento más alto con 5,75 ± 1,32 ufc/cm². Asimismo, los recuentos de *Enterobacterias* no superaron 1 ufc/cm².

De las superficies analizadas, las tablas de corte presentaron los recuentos microbianos más altos. Los resultados del estudio arrojaron recuentos altos de *AEM* (95,50 ± 7,24 ufc/cm²) y de *Enterobacterias* (entre 1,05 ± 1,02 y 6,76 ± 3,39 ufc/cm²),

ello cual indica que las condiciones de limpieza e higiene de estas superficies no fueron adecuadas. Así, existieron correlaciones negativas entre los niveles de contaminación hallados por *AEM* y *Enterobacterias* en las tablas de corte, y la limpieza de los equipos y utensilios de cocina ($r = -0,64$ y $-0,65$, respectivamente), así como con la higiene de las cocinas ($r = -0,73$ y $-0,74$, respectivamente).

Los recuentos de *AEM* hallados en fregaderos se consideraron aceptables para la mayoría de los hospitales, sólo en un hospital se hallaron recuentos mayores de 5 ufc/cm². Los grifos presentaron recuentos promedio de *AEM* entre $8,51 \pm 8,13$ y $20,89 \pm 8,13$ ufc/unidad y de *Enterobacterias* entre $1 \pm 1,02$ y $2,04 \pm 2,19$ ufc/unidad. No se hallaron diferencias significativas entre los recuentos hallados en fregaderos y grifos ($p > 0,05$).

CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AIRE

Los resultados fueron muy variables, probablemente a la distribución heterogénea de los microorganismos en el ambiente de las zonas evaluadas. Más del 20% de las muestras se clasificaron como Deficientes (>300 ufc/m³), mientras que el 73,33% se consideraron de Intermedias. Se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los recuentos hallados en la zona de las cocinas que alcanzaron valores de $374,67 \pm 165,72$ ufc/m³. Los niveles de contaminación por *S. aureus* no variaron significativamente entre los hospitales, y en zona de las cocinas ($63,33 \pm 24,31$ ufc/m³) y los fregaderos ($54,67 \pm 34,08$ ufc/m³) se evidenciaron los recuentos promedios más altos.

MONITORIZACIÓN DE LOS TIEMPOS/TEMPERATURAS DE LAS MUESTRAS DE ENSALADAS DE LECHUGA Y JAMÓN COCIDO

El tiempo total utilizado desde la recepción de la materia prima hasta la distribución de los alimentos varió significativamente entre 10–50h para todos los hospitales evaluados. En todos los casos, el tiempo transcurrido entre el procesado y la distribución de los alimentos preparados fluctuó entre 3–4h. La Temperatura de los alimentos incrementó a partir de la etapa de procesado y las ensaladas de lechuga se sometieron a Temperaturas ligeramente más altas que el jamón cocido, con oscilaciones entre 12–20°C.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont

Hygienic conditions and microbiological status of chilled Ready-To-Eat products served in Southern Spanish hospitals

M. Rodriguez, A. Valero*, E. Carrasco, F. Pérez-Rodríguez, G.D. Posada, G. Zurera

Department of Food Science and Technology, University of Cordoba, Campus de Rabanales, Edificio Darwin –14014 Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 May 2010

Accepted 9 November 2010

Keywords:

Hospital food services

Lettuce salad

Cooked ham

Checklist

Hygienic conditions

Microbiological quality

ABSTRACT

Chilled Ready-To-Eat (RTE) foods are of concern in hospital foodservices because they can support microbial growth when subjected to time/temperature abuses during processing and distribution together with poor handling practices. This study was conducted in five different hospitals (A–E) of Southern Spain during 2008–2009 to perform an evaluation of their sanitary conditions and microbiological quality of two RTE meals: lettuce salads and cooked ham. A checklist based on hygiene principles embedded in Food European legislation was developed and applied in each hospital. In parallel, microbiological analysis of food contact surfaces, air quality and time/temperature measurements along the distribution chain were carried out. RTE samples ($n = 150$) were examined for mesophilic aerobic bacteria (MAB), total coliforms, coagulase-positive Staphylococci (CPS), *Escherichia coli*, *Listeria* spp. and *Salmonella* spp. Differences were found between hospitals regarding handling practices and cleanliness of working surfaces. Cooked ham samples presented lower counts of MAB and total coliforms ($<10^3$ and <10 cfu/g respectively) than lettuce salads (10^4 to 10^5 and 10 to 10^4 cfu/g respectively), although concentration of CPS was higher in cooked ham samples reaching maximum levels close to 10^3 cfu/g. Neither *Listeria* spp. nor *Salmonella* spp. were detected in any food sample. Prevalence of *E. coli* was low (3%). Surface counts and air quality presented high variability among the different hospitals evaluated. It was concluded that good manufacturing practices and HACCP principles should be followed together with special training of food handlers. This study can help risk managers to better define the control measures to be adopted in healthcare settings in order to prevent foodborne infections.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Hospital foodservices have become highly relevant in the last few years in both public and private centres. According to the Spanish Statistics Institute, there were 4,8 million of hospitalizations in Spain during 2007. In Southern Spanish hospitals, occupancy rate was 80.67%, entailing an important volume of meals served per day (more than 53,000 serving/day) as indicated by the regional official reports (Statistical Memory of Andalusia Government, 2007). This represents between 6 and 10% of the global hospitals' budget. This fact is in parallel to improvements on healthcare settings and catering businesses based on the implementation of the principles of Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) (Taylor, 2008).

Most of the efforts have been conducted to increase the microbiological food safety of served meals, what constitutes a priority given that hospitalised people are highly susceptible to become ill when exposed to foodborne agents. Chilled Ready-To-

Eat (RTE) foods are of concern because they can be subjected to time/temperature abuses during processing and distribution together with poor handling practices. It is well recognized that vegetable salads and cooked meat products are more susceptible to present microbial contamination since they are not subjected to further treatments that could eliminate or reduce microbial load. Despite this, RTE foods are still served to patients as they contain valuable nutritional properties.

Several foodborne outbreaks have been reported in healthcare settings (Bolduc et al., 2004; Lingaas et al., 2008) associated to *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in salads, sandwiches, cheeses and deli meats. An outbreak caused by norovirus was reported in a hospital cafeteria in Spain attributed to the consumption of salads and sandwiches (Sala et al., 2005). These outbreaks could be related to some factors concerning food safety and food hygiene. Inside hospital central kitchens, several routes of microbial transmission to prepared meals could be present.

Contamination of working surfaces, equipment or deficient handling practices can contribute to increase the presence of microbial indicators such as *E. coli* or *Staphylococcus aureus* in RTE foods (Legnani, Leoni, Berveglieri, Mirolo, & Alvaro, 2004). Thus,

* Corresponding author. Tel.: +34 957 21 85 16; fax: +34- 957 21 20 00.
E-mail address: bt2vadia@uco.es (A. Valero).

special attention should be paid to food hygiene and compliance with HACCP system in order to prevent food outbreaks in collective-eating places (Lund & O'Brien, 2009). Cross-contamination through working surfaces is widely reported, specially the cases of transmission of enteric pathogens and other microbial hazards such as *L. monocytogenes* or *S. aureus* to RTE foods (Keskinen, Todd, & Ryser, 2008; Malheiros, Passos, Casarin, Serraglio, & Tondo, 2010). Recontamination phenomena through air can occur, for instance, by spraying during cleaning, which can generate aerosol formation (Den Aantrekker, Boom, Zwietering, & Van Schothorst, 2003). This is particularly relevant in preparation zones or during preparation of trays in conveyor belts, where prepared meals are exposed to air contamination. Besides, it is demonstrated that hospitals can constitute environmental reservoirs in air of methicillin-resistant *S. aureus* species, which are a significant cause of mortality and morbidity in susceptible patients (Sexton, Clarke, O'Neill, Dillane, & Humphreys, 2006). To date, there is few available data with regards to microbial contamination of air in hospital food production areas.

Other additional factors involved in food outbreaks in hospitals are improper holding times/temperatures along the food chain. In the case of chilled RTE foods, they are often prepared in advance before consumption and left out at abuse temperatures before distribution, (Rosset, Cornu, Noël, Morelli, & Poumeyrol, 2004). Delays during preparation of trays and distribution to hospital wards are relatively common, thus temperatures of chilled foods could increase, allowing bacterial growth (Réglier-Poupet et al., 2005).

Currently, lack of knowledge of factors that can potentially influence microbial contamination of chilled RTE foods served in Spanish hospitals is detected. This study was undertaken to determine the microbiological quality of lettuce salads and cooked ham served in Southern Spanish hospitals. At the same time, an evaluation of food handling practices, contamination of working surfaces and environmental contamination of processing areas were performed, in order to provide a description of the existing hygienic conditions along elaboration, preparation of trays and distribution. Finally, time/temperature profiles from reception of raw materials to consumption were recorded to study their impact on food safety.

2. Material and methods

This survey was conducted from June 2008 to September 2009, involving five different hospitals (A–E) from Andalusia region (Southern Spain). These hospitals were selected according to the number of meals served per day (>1000 meals/day) and the existence of a person in charge of food quality control in the hospitals. Each hospital was periodically visited five times along the duration of the experiment.

Previously, each hospital was visited in order to know the location, the types of services provided, the structure of the catering systems and the production flows. With the information obtained, a checklist was constructed based on the observance of principles and rules of European Union regulations (No. 852/2004), Codex Alimentarius (2003) and expert's opinion of the people responsible in the hospitals.

2.1. Checklist

In the checklist performed, we intended to evaluate 15 attributes structured in two parts (I) handlers' habits and kitchen equipment, basing on yes/no questions (attributes a–i), and (II) hygienic-sanitary conditions and handling practices including semi-quantitative scores (attributes j–o). A visual inspection was made by a trained evaluator while handlers were preparing the meals. Five checklists per hospital studied were filled out.

The two parts were evaluated independently since the attributes belonging to part I were considered as frequencies (occurrence of observed attribute), while those corresponding to part II were evaluated following a scale from 0 to 4 (0-poor, 1-deficient, 2-acceptable, 3-good and 4-very good).

The attributes evaluated and classification criteria of the checklist are represented in Table 1. A description about how the evaluation process per attributed was studied in the part I is detailed as follows:

- Use of gloves (a)/change of gloves (b): if we observed that the handler used one pair of gloves and changed them at least once during food preparation
- Correct hand washing (c): if the handler washed all surface of his hands with a disinfectant soap, cleaning and drying them conveniently.
- Use of cap (d): if we observed that the handler used a cap that covered all the hair along food preparation
- Wearing jewellery (e): if the handler used rings, bracelets, watches or any other object that contact with the food
- Use of apron for cleaning hands (f)/use of clothes for cleaning different surfaces (g): if we observed these poor handling habits at least once during food preparation
- Proper cutting board, slicing machine (h)/proper cooking utensils (i): if the cutting board was made of a plastic/polypropylene material and if the slicing machines and cooking utensils were made of stainless steel.

Concerning the part II of the checklist (attributes j–o), different scores were assigned depending on the cleanliness degree of the handler (including food handling) and the food preparation area. The part II of the checklist was expressed numerically as the sum of the average values collected in the five visits per hospital.

2.2. Food sampling

Samples were collected just after the last patient serving in order to estimate the microbial load that can potentially imply higher risk at the moment of consumption. Three samples of both RTE foods (lettuce salads and cooked ham) were taken per visit, so a total of 30 samples (15 lettuce salads and 15 cooked hams) per hospital were analyzed, with the exception of hospital A, where only lettuce salads were collected as cooked meat products were

Table 1

Attributes evaluated and classification criteria followed in the checklists, concerning handlers' habits and kitchen equipment (I) and hygienic-sanitary conditions and handling practices (II).

Code	Attributes evaluated
Part I (0/1) ^a	
a	Use of gloves
b	Change of gloves
c	Correct hand washing
d	Use of cap
e	Wearing jewellery
f	Use of apron for cleaning hands
g	Use of clothes for cleaning different surfaces
h	Proper cutting board/slicing machine
i	Proper cooking utensils
Part II (0–4) ^b	
j	Hands/gloves cleanliness
k	Cleanliness of uniforms
l	Correct food handling
m	Cleanliness of working surfaces
n	Cleanliness of cooking utensils and equipment
o	Kitchen hygiene

^a 0 = no; 1 = yes.

^b 0 = poor; 1 = deficient; 2 = acceptable; 3 = good; 4 = very good.

not served to patients in the 5 visits carried out in this study. Subsequently, samples were placed in plastic sterile containers, and kept refrigerated (0–4 °C) during transportation to the laboratory (4 h from collection).

2.3. Microbial analyses

2.3.1. Lettuce salads and cooked ham

Previous to analysis, samples (25 g) were diluted in 225 mL of buffered peptone water (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK) and homogenised by using Stomacher 400 Circulator blender (Seward, Worthing West Sussex, UK) for 2 min. When necessary, decimal dilutions were prepared in 0.85% physiologic saline solution (Panreac). The microbiological methods followed were those published by ISO (International Organization for Standardization).

Mesophilic aerobic bacteria (MAB) were determined by pour plating on Plate Count Agar (PCA, Oxoid) incubating at 30 °C for 48 h (ISO 4833:1991). For analysis of total coliforms, Violet Red Bile Lactose agar (VRBL) was used as indicated by ISO 4832:1991. Incubation was carried out at 30 °C during 24 h. Coagulase-positive staphylococci (CPS) were analyzed according to ISO 6888-2:1999. Samples were poured plated in Baird Parker Agar with Rabbit Plasma Fibrinogen (RPF) incubating at 37 °C for 24 h. The halo surrounding black to grey colonies due to free coagulase production was confirmed as presence of CPS in the sample. For enumeration of *E. coli* the ISO 7251:2005 was followed, based on the Most Probable Number technique (MPN) in Lauryl Tryptone Sulfate broth (LTS) + MUG (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK). Three dilutions of the initial sample were made, the first one filled with 10 ml of LTS broth at double concentration plus 10 ml of sample, while the subsequent dilutions were filled with 9 ml of LTS at simple concentration plus 1 ml of sample. The incubation was at 37 °C for 24 h. Gas production and fluorescence in tubes was confirmed as presumptive positives of *E. coli*.

Finally presence of *Listeria* spp. and *Salmonella* spp. were also investigated. For identification of *Listeria* spp., five presumptive colonies selected from Oxford and Palcam *Listeria* Selective agar (Oxoid), were sub-cultured on Tryptone–Soya Agar (TSA, Oxoid) at 37 °C for 24 h (ISO 11290-2-1998). The following tests were performed on colonies isolated in TSA: catalase test (3% H₂O₂ solution was prepared), motility test in SIM medium (Oxoid) and Gram stain test. Afterwards, the presumptive colonies of *Listeria* were confirmed by means of API *Listeria* identification galleries (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France). Manufacturer's instructions were followed, and APILAB PLUS software was used. For *Salmonella* detection (ISO 6579:2002), the undiluted samples were incubated in buffered peptone water at 37 °C for 24 h. Upon the completion of the pre-enrichment process, 0.1 mL was transferred into Rappaport–Vassiliadis and Selenite–Cystine broths (Oxoid), incubating at 42 °C during 24 h. Then, positive cultures were streaked on Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) agar incubating at 37 °C for 24–48 h. *Salmonella* spp. will be detected by the presence of red colonies with a bright black center.

2.3.2. Microbial status in working surfaces

Four different working surfaces were monitored in hospitals preparation rooms, previous to elaboration of meals: working tables, cutting boards, sinks and faucets. The bacteria groups MAB and Enterobacteriaceae were chosen as indicators of surface cleanliness and disinfection procedures. Each surface was swabbed using a 10 × 10 cm² sterile template. Then, the swab was streaked and immersed in 7 mL tubes of 1% buffered peptone water. Once homogenised, the swab head was aseptically cut remaining inside the test tube. Finally, samples were transported in refrigeration to the laboratory.

For microbial enumeration, test tubes were shaken in a vortex during 1 min, and 1 mL from each tube was plated on PCA and Violet Red Bile Glucose agar (VRBG, Oxoid) for determination of MAB and Enterobacteriaceae respectively.

2.3.3. Microbial air quality

Air samples were taken from each hospital during food processing. The bacteria groups MAB and *Staphylococcus* spp. were selected as microbial indicators of air quality. An active method was used for counting the number of cfu per m³ of air. This methodology allows determine a known volume of air, blown to a nutrient medium which is placed inside an apparatus. Despite the high variability provided by this technique, it was selected instead of passive sampling, since most of standard guidelines refer to cfu/m³ for expressing air contamination (Pasquarella, Pitzurra, & Savino, 2000). Three zones were chosen for sampling: processing rooms where chilled foods are prepared (as an indication of the cleanliness and disinfection procedures), sinks (as humid zones) and conveyor belts where preparation of trays is located (since this could potentially be a high-risk area). An air sampler (SAS Super 180™, Scharlab Barcelona, Spain) was used; the volume was set to 500 L of air. MAB were determined in PCA (Oxoid) incubating at 30 °C for 48 h, while Baird Parker with egg-yolk tellurite emulsion agar (Oxoid) were chosen for determination of *Staphylococcus* spp. (incubation at 37 °C for 24 h). Probable counts (Pr, statistical possibility of multiples particles passing through the same hole) were obtained using a conversion table, and Pr served to calculate counts in cfu/m³.

$$X = \frac{\text{Pr} \times 1000}{V} \quad (1)$$

where Pr is the probable count obtained, V is the volume of sampled air and X is the result in cfu/m³ of air.

2.4. Time/temperature measurements

Temperatures of raw materials (lettuce and cooked ham) and processed RTE foods (salads and sliced cooked ham) were measured along the process chain with a food thermometer equipped with a special probe (HI 95809-1, Hanna Instruments, USA). The diagram flow of Fig. 1 represents the steps along the course of the foods studied where time and temperature were measured. Raw materials are checked in and stored by outsource food suppliers. On the day of consumption, raw materials are kept in cold stores in hospitals until processing. After processing, RTE foods are stored in cold rooms and/or cold stores. Then, foods are placed on trays, which are put into food carts and carried to wards to finally be served to patients. Food time/temperature (t/T) was measured after finalisation of six steps: (t₁/T₁) reception (first storage); (t₂/T₂) storage in cold stores; (t₃/T₃) processing; (t₄/T₄) preparation of trays; (t₅/T₅) delivery; (t₆/T₆) after the last patient was served.

2.5. Statistical analysis

Descriptive statistics for microbiological data, checklist scores and time/temperature data were calculated with Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, Wash). Chi-square coefficient was calculated in a contingency table in order to study the significant differences among the five hospitals regarding the attributes of the part I of the checklist. In addition, Pearson coefficient was used to find significant correlations between the part II of the checklist and microbiological data. Finally, parametric analyses (*t* student test and Variance Analysis) at a 95% confidence level were performed to study if there were significant differences among the five hospitals regarding microbiological data collected. All statistical analyses were implemented in Statistica for Windows v9.1 (Statsoft Iberica, Portugal).

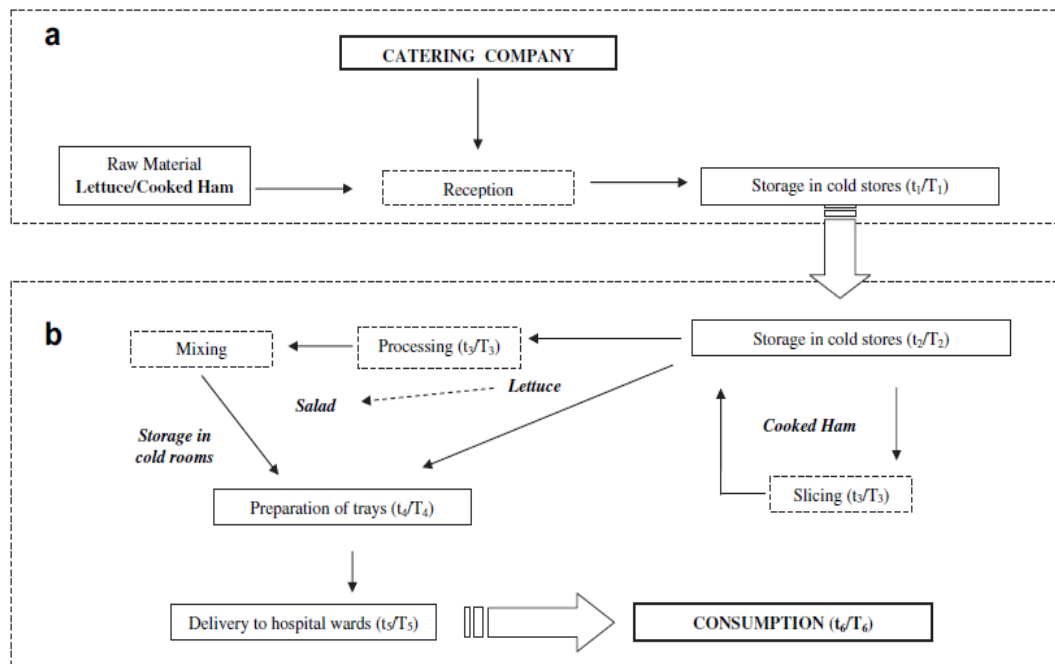


Fig. 1. Flow diagram representing the course of salad and cooked ham meals within hired companies and hospitals. a) Liability of the catering company; b) liability of the hospital. Time/temperature measurements (t/T) are expressed between brackets.

3. Results

3.1. Checklist

From the checklists results, the average scores of five visits obtained in parts I and II of checklists and total scores of the five hospitals were calculated. These results, presented in Table 2, confirmed the existing variability in both handling practices and sanitary conditions in the visited centres.

Results from the part I of the checklist were treated as frequencies since they were based on yes/no questions. Although all handlers used a cap while handling (attribute d) and all cutting boards, slicing machines and cooking utensils were considered appropriate (attributes h and i), some differences were observed in attributes related with handler's habits. In order to evaluate these differences, chi-square values were calculated from contingency tables. In Table 3 it is shown that the use and change of gloves were

significantly different in the five hospitals ($P < 0.05$) being the frequency higher in the hospitals C, D and E. It is worthy to mention that improper habits were occasionally observed among food handlers, such as wearing jewellery, use of apron for cleaning hands, and use of clothes for cleaning food contact surfaces, which could result in cross-contamination events. These practices should be avoided following the European Regulation No. 852/2004 and the Hygienic Prerequisites established in Official guidelines of Andalusia region.

Total scores from the part II of the checklist were obtained as the sum of the mean values collected in the five visits per hospital. In Table 2 it can be seen that the hospitals A and D obtained the best punctuation (23.2 and 19.2 respectively) while the hospital E had the worst score (14.6). From the information of the part II of the checklist, Pearson correlation coefficients were calculated to study the significant differences among the hospitals (Table 4). The strongest correlation was found between cleanliness of working surfaces (m) and kitchen hygiene (o) (0.83). Likewise, it is shown that these attributes were related to the correct handling (l) or the cleanliness of cooking utensils and equipment (n).

Table 2
Average scores of five visits obtained in parts I and II of checklists and total scores of the five hospitals evaluated.

Attribute	A	B	C	D	E
Frequencies part I (0–1)					
a	0.8	0.4	1.0	1.0	1.0
b	0.4	0.0	1.0	1.0	0.6
c	1.0	0.6	1.0	1.0	0.8
d	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
e	0.0	0.2	1.0	0.4	0.8
f	0.8	0.0	1.0	1.0	0.6
g	0.6	0.0	0.0	0.0	0.2
h	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
i	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Average scores part II					
j	3.8	2.6	3.0	4.0	2.8
k	4.0	3	3.0	2.0	3.0
l	3.8	2.6	2.0	3.0	1.8
m	3.8	2.8	3.0	3.4	2.2
n	3.8	3.4	3.0	3.4	2.4
o	4.0	3.0	3.0	3.4	2.4
Total scores part II	23.2	17.4	17	19.2	14.6

Table 3
Results obtained from the contingency tables (Chi-square coefficient ($P < 0.05$)) for each attribute belonging to the part I of the checklist in relation to the five hospitals evaluated.

Attribute	Chi-square	P value
a	13.636	0.009
b	18.59	0.001
c	6.091	0.195
d	–	^a
e	18.59	0.001
f	18.333	<0.001
g	19.048	<0.001
h	–	–
i	–	–

^a The average scores were the same in the five hospitals evaluated.

Table 4

Numerical values of Pearson correlation coefficient among the attributes of the part II of the checklist. Numbers in bold and italic indicate significant correlation ($P < 0.05$).

Attribute	Mean	Std. Dev.	j	k	l	m	n	o
j	3.08	0.67	–	–0.12	0.53	0.55	0.20	0.64
k	2.75	0.87	–0.12	–	–0.12	–0.25	–0.27	–0.25
l	2.42	0.67	0.53	–0.12	–	0.64	0.27	0.64
m	2.92	0.51	0.55	–0.25	0.64	–	0.66	0.83
n	3.17	0.58	0.2	–0.27	0.27	0.66	–	0.74
o	3.00	0.43	0.64	–0.25	0.64	0.83	0.74	–

3.2. Microbiological quality of lettuce salads and cooked ham samples

Results obtained from microbial analyses are represented in Fig. 2. It should be remarked that in hospital A, only lettuce salads could be collected since cooked ham was not included in the menus.

Regarding lettuce salads, the results indicated that the average counts of MAB and total coliforms were below 10^5 cfu/g and 10^4 cfu/g, respectively (Fig. 2a). MAB counts were higher in the hospitals C and E in comparison to the rest of hospitals. This is in agreement with the total scores obtained in the part II of the checklist, since the hospital E presented the lowest punctuation (14.6). On the contrary, the hospital A presented the lowest counts of MAB (3.91 ± 1.17 log cfu/g), being the best punctuated in the part II of the checklist (23.2). There were also significant differences in total coliforms counts between hospital A (1.05 ± 0.65 log cfu/g) and the rest of hospitals evaluated, which obtained counts above 3 log cfu/g (Fig. 2a). Regarding concentration of CPS, we followed

the guidelines provided by the Health Protection Agency of United Kingdom (HPA, 2009). Basing on these recommendations, the risk associated to CPS was divided in three levels: low (< 20 cfu/g), moderate (20 – 10^4 cfu/g) and high ($> 10^4$ cfu/g). None of the lettuce salads analyzed exceeded 10^4 cfu/g, even in the hospitals B and D, no positive samples of CPS were found in lettuce salad. However, the hospital E presented the highest mean concentration of CPS (1.60 ± 0.64 log cfu/g, Fig. 2a). In this hospital, 12 out of 15 samples were classified as moderate risk.

Cooked ham samples, presented lower counts of MAB and total coliforms (microbial counts were lower than 1 log cfu/g in all hospitals evaluated) than lettuce salads, but CPS concentration increased, what can be related to cross-contamination events when handling and/or distribution conditions are not adequate. All cooked ham samples were classified as moderate risk following the HPA guidelines since the concentration exceeded 20 cfu/cm². In Fig. 2b, it can be seen that the hospital D presented significant lower counts of MAB and CPS in comparison to the rest of hospitals (~ 1 log cfu/g). The hospital B had the highest concentration of CPS (> 2 log cfu/g). However, this concentration was not significantly different to that obtained for the hospitals C and E. Negative significant correlation was found between the cleanliness of hands/gloves and the final CPS concentration in cooked ham (-0.76). This supports the fact that cooked ham can be subjected to CPS contamination when handling and/or distribution conditions are not adequate.

Concerning *E. coli*, five positive samples of lettuce salad were found in hospital C, although microbial counts were lower than 10 cfu/g. The pathogens investigated, i.e. *Listeria* spp. and *Salmonella* spp. were not detected in the samples analyzed.

3.3. Food contact surfaces

Four food contact surfaces (working tables, cutting boards, sinks and faucets) were examined regarding two microbial parameters: MAB and Enterobacteriaceae. Surface counts presented high variability thus denoting non-regular cleanliness procedures. Results obtained are presented in Table 5. It should be remarked that in the case of faucets, results are not comparable with those of the other surfaces, since faucet results were based on the area sampled, (i.e. the area corresponded to the zone in contact with hands). The microbiological standards for hand-contact surfaces stated by Dancer (2004) were followed to assess the acceptability of the food surfaces analyzed (MAB counts should be lower than 5 cfu/cm² and indicator microorganisms should be below 1 cfu/cm²).

The average MAB counts for working tables were below 5 cfu/cm² in all cases excepting for the hospital C (5.75 ± 1.32 cfu/cm²). Likewise, average counts of Enterobacteriaceae were below 1 cfu/cm² in all working tables examined (Table 5).

Higher loads of microorganisms (MAB and Enterobacteriaceae) were found in cutting boards. Indeed, cutting boards were not considered acceptable for MAB for the hospitals A and C which had counts above 8 cfu/cm². A high MAB concentration was found in hospital A (> 90 cfu/cm²), indicating a deficient cleaning process and/or hygienic conditions of cutting boards. For Enterobacteriaceae, all cutting boards examined exceeded 1 cfu/cm² although in the case of the hospital D, the average count was significantly lower than the average total concentration of the five hospitals (Table 3). Concerning the checklist attributes, significant negative correlations were found between cleanliness of utensils and equipment and concentration of MAB and Enterobacteriaceae in cutting boards (-0.64 and -0.65 respectively). This relationship was also found significant for kitchen hygiene (-0.73 and -0.74 respectively).

No significant differences were noted between surface counts in sinks and faucets in the five hospitals. The sink surfaces analyzed were acceptable excepting for hospital C, where a MAB

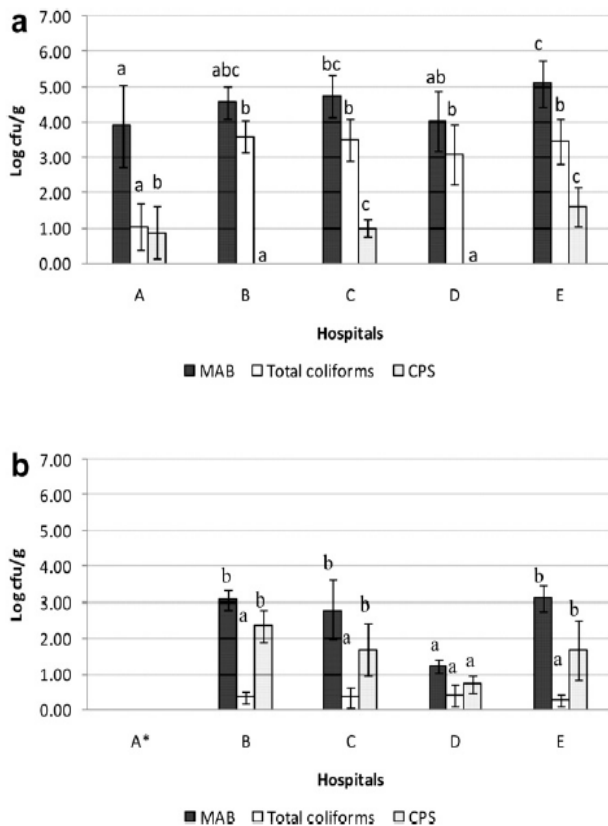


Fig. 2. Average microbial concentration and standard deviation obtained for Mesophilic Aerobic Bacteria (MAB), total coliforms, and coagulase-positive Staphylococci (CPS) expressed as log cfu/g in the five hospitals evaluated for lettuce salads (a) and cooked ham (b) samples. * Cooked ham was not analyzed in this hospital. Bars (i.e. means) with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

Table 5
Microbial concentration and standard deviation obtained of Mesophilic Aerobic Bacteria (MAB), and Enterobacteriaceae (Ent) in the food contact surfaces evaluated.

Hospital	Working table (cfu/cm ²)		Cutting board (cfu/cm ²)		Sink (cfu/cm ²)		Faucet (cfu/unit)	
	MAB	Ent	MAB	Ent	MAB	Ent	MAB	Ent
A*	2.24 ± 5.62 ^a	0.66 ± 1.63 ^a	95.50 ± 7.24 ^{ab}	6.76 ± 3.39 ^b	2.14 ± 5.25 ^a	1.62 ± 2.63 ^a	14.45 ± 6.76 ^a	2.04 ± 2.19 ^a
B	3.63 ± 5.01 ^a	0.23 ± 0.32 ^a	3.80 ± 9.77 ^a	1.48 ± 2.09 ^{ab}	2.09 ± 3.16 ^a	1.20 ± 1.62 ^a	6.76 ± 6.61 ^a	0
C	5.75 ± 1.32 ^a	0.70 ± 1.29 ^a	8.91 ± 4.68 ^{ab}	1.86 ± 2.00 ^{ab}	3.89 ± 5.75 ^a	1.17 ± 1.23 ^a	8.51 ± 8.13 ^a	2.19 ± 3.24 ^a
D	1.15 ± 1.12 ^a	0	1.55 ± 1.86 ^a	1.05 ± 1.02 ^a	1.45 ± 1.07 ^a	1.48 ± 1.41 ^a	13.49 ± 15.85 ^a	0
E	1.29 ± 1.29 ^a	0.05 ± 0.12 ^a	1.51 ± 7.94 ^a	1.51 ± 3.02 ^{ab}	5.37 ± 3.16 ^a	1.07 ± 1.17 ^a	20.89 ± 8.13 ^a	1.00 ± 1.02 ^a
Total**	2.00 ± 3.55 ^a	0.26 ± 0.78 ^a	13.18 ± 11.09 ^b	2.40 ± 3.16 ^b	2.75 ± 4.57 ^a	1.29 ± 1.82 ^a	12.02 ± 7.08 ^a	1.41 ± 2.09 ^a

*Data for A, B, C, D and E in the same column with no letters in common are significantly ($P < 0.05$) different.

**Total data in the same row with non-letter in common are significantly ($P < 0.05$) different.

concentration above 5 cfu/cm² was found. Finally, faucets analyzed presented higher counts for MAB and Enterobacteriaceae in hospitals E and C, respectively.

3.4. Air contamination

Three critical zones were considered in this study as potential areas contaminated by air: processing rooms (kitchens), humid zones (sinks) and rooms for preparation of trays. The average counts together with their standard deviation for MAB and *S. aureus* are represented in Figs. 3 and 4. The microbial quality of the air was then graded using established guidelines (Al-Dagal, Mo, Fung, & Kastner, 1992). Grade A (excellent) was 100 cfu/m³ or less, grade B (intermediate) was 100–300 cfu/m³ and grade C (poor) was over 300 cfu/m³. The results obtained showed that 20% of the samples were classified as poor (>300 cfu/m³), while 73.33% of samples were catalogued as intermediate. Significant differences in air counts were only observed for MAB in processing rooms, being higher in the hospitals B (374.67 ± 165.72 cfu/m³) and A (208.00 ± 24.31 cfu/m³). Regarding *S. aureus*, no significant differences were obtained but the higher concentrations were observed in the hospital B in processing rooms (63.33 ± 24.31 cfu/m³) and sinks (54.67 ± 34.08 cfu/m³) as well as in the hospital E (39.67 ± 34.03 and 50.00 ± 19.29 cfu/m³ in processing rooms and sinks respectively). In general, high intra-variability was observed in all hospitals, likely due to the heterogeneous microbial distribution in air in the different food preparation areas evaluated.

3.5. Monitoring time–temperature of lettuce salads and cooked ham samples

In order to check if foods were maintained at an appropriate temperature from reception of raw materials to consumption, time/temperature data were recorded along reception, storage, processing, preparation of trays, delivery and consumption, as can be observed in Fig. 5. Differences in times recorded were observed, being around 50 h in hospitals A and B, 20–30 h in hospitals C and D, and less than 10 h in hospital E. In all cases, times between processing and distribution of prepared meals ranged from 3 to 4 h. It can be seen that temperatures of lettuce salads were slightly higher than cooked ham samples, oscillating between 12 and 20 °C before serving.

4. Discussion

4.1. Checklist evaluation

In general, hospital kitchens were correctly equipped but sometimes inadequate attitudes of handlers were observed, especially gloves change, use of apron and cloths for cleaning, or wearing jewellery. These findings are in agreement with the study of Veiros,

Pronça, Santos, Kent-Smith, and Rocha (2009), who found that only 24% of the attributes evaluated in checklist were classified as conformed. Lues and Van Torder (2007) analyzed the presence of indicator microorganisms on hands and aprons of food handlers. They found that coliforms were present on 40% of food handler's hands and on 26% of aprons. Besides, *S. aureus* and *E. coli* were present and a positive correlation was found between microbial counts in hands and aprons, thus suggesting the possibility of associated contamination events. In our study, regarding use of gloves, the trend generally observed was that food handlers used gloves, but not changed them frequently. This can lead to a false awareness of hygiene, which could result in cross-contamination events (Pérez-Rodríguez, Valero, Carrasco, García-Gimeno, & Zurera, 2005). Other studies have shown that washing hands efficiently together with the use and change of gloves can significantly reduce the microbial load present in hands, surfaces and in prepared meals (Martínez-Tomé, Vera & Murcia, 2000; Michaels et al., 2004).

In other cases it is preferred to implement an effective training of food handlers. Most published studies performed in collective-eating places have evaluated the training of handlers by filling out a normalised questionnaire on Good Manufacturing Practices (GMP). Afterwards they verify the success of training by detection of improvements in hygienic conditions and/or microbiological quality of prepared foods. (Acikel et al., 2008; Veiros et al., 2009). These studies globally concluded that training of food handlers can be effectively proposed (Santana, Almeida, Ferreira, & Almeida, 2009). Acikel et al. (2008) obtained significant differences between pre-training and post-training in wearing jewellery ($P < 0.05$) although these results were not obtained with other deficient practices. It is recognized that training should be repeated over time to minimize the reluctance of food handlers to apply the acquired knowledge (Furnari et al., 2002).

On the other hand, significant negative correlations were found between microbial counts of CPS in cooked ham and cleanliness of hands/gloves. Microbial risk associated to high levels of CPS in the final food product would increase proportionally to the initial concentration detected and the likelihood of subsequent growth in the absence of appropriate levels of control. Besides, despite the low prevalence of *E. coli* found in samples collected, transmission of *E. coli* from handlers to prepared meals has been recognized (Michaels et al., 2004), thus implementation of preventive measures in healthcare settings is fully justified.

4.2. Assessment of the microbiological quality

On the basis of the results obtained, it was concluded that the microbiological safety of the samples analyzed indicated the absence of pathogens and the low percentage of positive *E. coli* samples (3%). Currently, there is not any current official Spanish regulation regarding microbiological criteria for RTE foods. However, other international guidelines recommend MAB analysis

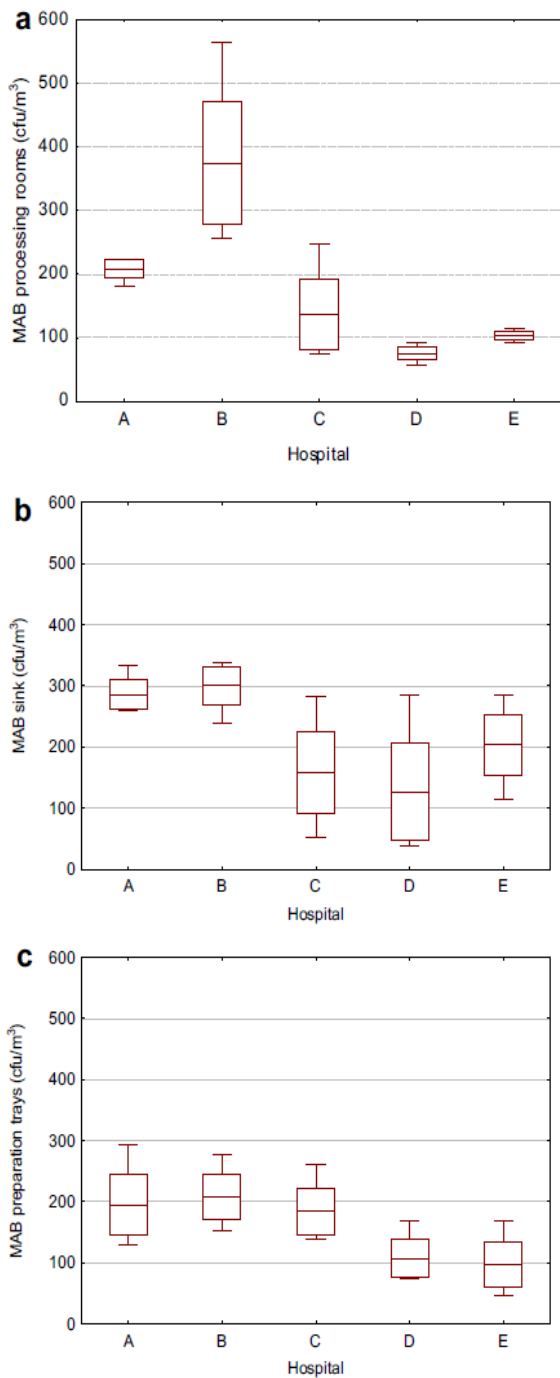


Fig. 3. Air concentration of Mesophilic Aerobic Bacteria (MAB) expressed as cfu/m^3 in processing rooms (a), sinks (b) and preparation of trays zones (c) in the five hospitals evaluated.

in these kinds of products as indicators of their microbiological status. At this respect, counts of MAB above $5 \log \text{cfu/g}$ have been considered as a potential risk for the presence of pathogens (Ayçiçek, Sarimehmetoğlu, & Cariroğlu, 2004). In our study, it was found an average count of $5.09 \log \text{cfu/g}$ in lettuce salads in hospital E, while in the others average MAB level remained below this value. However, counts of MAB above this limit were detected in all hospitals in at least one sample, being related to an improper hygiene and/or distribution process. Other guidelines (Gilbert et al., 2000) recommend limits for MAB in cooked meat products, but they are higher than the counts encountered in our study (around

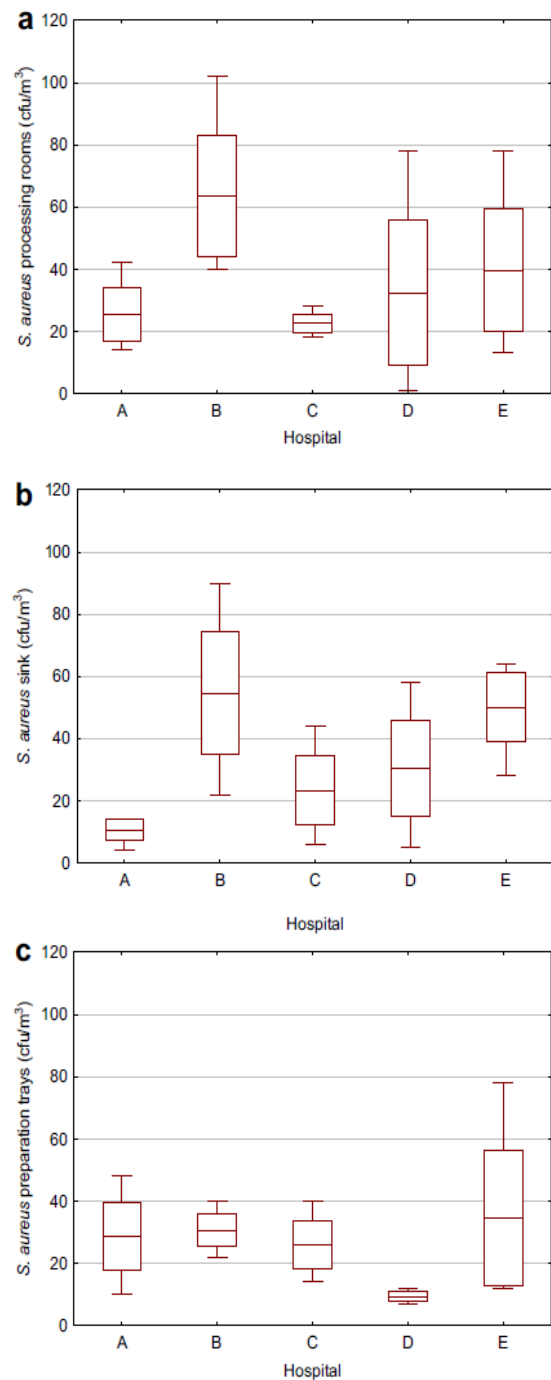


Fig. 4. Air concentration of *S. aureus* expressed as cfu/m^3 in processing rooms (a), sinks (b) and preparation of trays zones (c) in the five hospitals evaluated.

$5 \log \text{cfu/g}$). Our study highlighted that total coliforms can potentially reach high counts in vegetable products (levels were above $3 \log \text{cfu/g}$, excepting hospital A), which are catalogued as unsatisfactory according to microbiological limits established in other countries (Réglier-Poupet et al., 2005). Raw vegetables from harvest usually contain a high microbial load, and decontamination processes applied do not ensure an effective reduction of microbiological contamination in RTE salads. These results corroborate what other studies have shown in catering establishments, where a certain percentage of samples exceeded the stipulated limits for spoilage and/or indicator microorganisms, thus revealing deficient

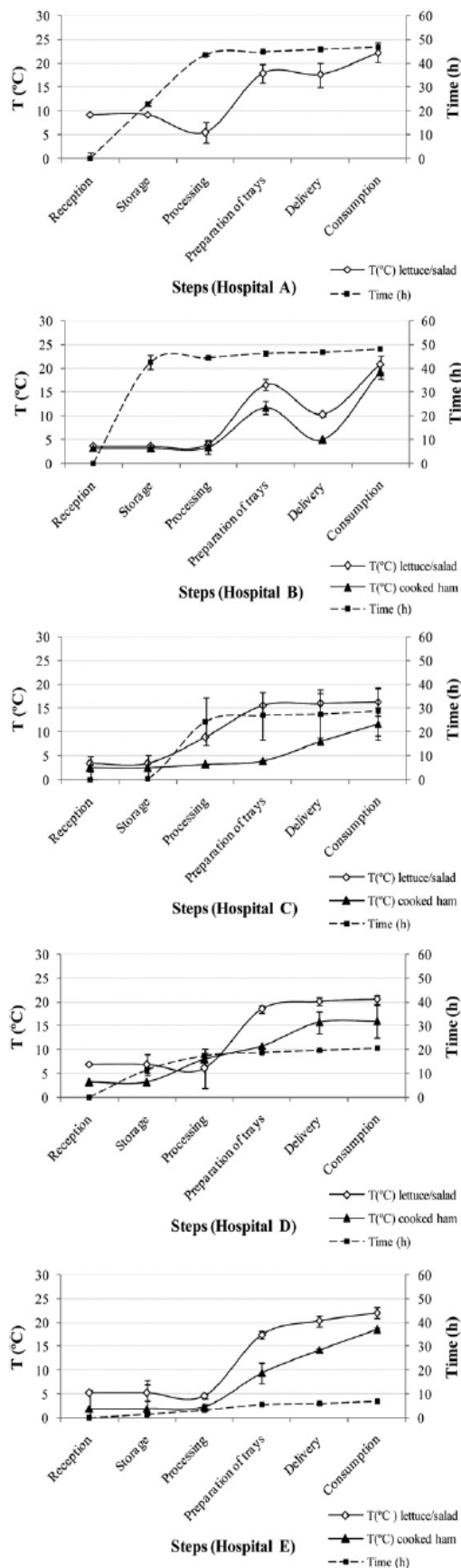


Fig. 5. Evolution of time and temperatures of lettuce salads and cooked ham samples along the food chain in the five hospitals evaluated.

hygiene (Santana et al., 2009). This fact is especially relevant in collective-eating places, where a high amount of meals are prepared every day in a short period of time, and handlers could fall for improper handling practices. In our study, CPS was detected in 54% of the samples analyzed. Despite none of the samples analyzed were considered unacceptable, 80% of lettuce salads from hospital E and 66% of cooked ham samples from all hospitals were of intermediate quality. This contamination is attributed to human origin and introduced by poor handling practices. Nevertheless, counts did not exceed the level to produce enterotoxin, which is around $5 \log \text{ cfu/g}$ (USDA, 1992). Microbial contamination due to CPS from handlers to food products can occur through sneezing, talking, laughing, falling hair, or using soiled coats (Clark, Rylander, & Larsson, 1983).

Our results demonstrated that cutting boards can harbour a high microbial load if they are not properly cleaned or when they are excessively worn out. Also, microbial transfer by hands has been reported as a potential cross-contamination route (Pérez-Rodríguez, Valero, Carrasco, García, & Zurera, 2008). In fact, scientific studies report that hand-contact surfaces are more susceptible to be contaminated than food contact surfaces (DeVita, Wadhwa, Theis, & Ingham, 2007). This was corroborated by the high counts of MAB and Enterobacteriaceae found in faucets (more than 100 cfu/unit in hospital E).

Recontamination via air should be also considered if food products stand for a long time exposed to airborne contamination areas. The number of microorganisms that enters the product via air depends on the settling velocity of the microorganisms, but also on the concentration of microorganisms in the air, and the exposure time and area of the product (Whyte, 1986). Other studies made in processing plants or slaughterhouses report that high air contamination levels are caused by aerosol formation, people in the area and junction of dirty and clean areas (Byrne, Lyng, Dunne, & Bolton, 2008). To our knowledge, no research has been developed in hospitals describing air contamination routes, thus the information generated in our study could be used to implement further management measures in other healthcare settings with the aim of reducing airborne contamination.

4.3. Course of lettuce salads and cooked ham samples

In this study, we monitored the chill chain of lettuce salads and cooked ham from reception to consumption, since a disruption of this chain could pose high-risk of reaching unacceptable microbial levels if proper holding conditions are not followed. The Official Spanish Decree 3484/2000 regarding hygienic rules for preparation, distribution and sale of RTE foods states that RTE foods subjected to controlled temperature should be stored below $8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ if shelf-life of these foods is lower than 24 h, and below $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for more than 24 h shelf-life period. Storage temperatures found in our study fulfilled these requirements considering that the shelf-life is lower than 24 h.

Food temperatures increased from processing, although the time until serving was short in all hospitals. Time delays (3–4 h) from processing to consumption matched the results obtained by Réglier-Poupet et al. (2005) in French hospitals, although in their study, it was concluded that an important delay between delivery of the first food cart and delivery of the last one, can increase internal food temperature, thus allowing bacteria growth. In hospital B, the average temperature of lettuce salads increased in $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ from delivery to consumption due to the exposure of the product to an abuse temperature (Fig. 5). In many cases, short times are enough to ensure an appropriate microbiological quality, but it would be necessary that each hospital implements monitoring systems for time and temperature along the food chain.

5. Conclusions

The systematic approach proposed in this study helps risk and food safety managers to better define the control measures to be adopted in healthcare settings in order to prevent foodborne infections. Handler's practices and hygienic-sanitary conditions were acceptable, but some improper habits were observed (use of apron for cleaning, wearing jewellery or infrequent change of gloves). Good manufacturing practices and HACCP principles should be followed together with special training of food handlers. Although microbiological quality of lettuce salads and cooked ham has been considered satisfactory, special care should be taken regarding indicator microorganisms such as CPS or *E. coli*. Control of time and temperature along the food chain might prevent microbial growth until risk levels. Other measures, such as excluding key high-risk foods to immunocompromised patients, would also be advisable.

Acknowledgments

This work was partly financed by the AGR-01879 Excellence Project (Andalusia Government) and the AGR-170 Research Group, HIBRO, 'Plan Andaluz de Investigación, Desarrollo e Innovación' (PAIDI) and by European ERDF funding. Food Quality Responsibles of the Regional Hospitals Reina Sofia, Carlos Haya, Virgen Macarena, Virgen del Rocío and Puerta del Mar are acknowledged for their valuable contributions in this work.

References

- Acikel, C. H., Ogur, R., Yaren, H., Gocgeldi, E., Ucar, M., & Kir, T. (2008). The hygiene training of food handlers at a teaching hospital. *Food Control*, *19*(2), 186–190.
- Al-Dagal, M., Mo, O., Fung, D. Y. C., & Kastner, C. (1992). A case study of the influence of microbial quality of air on product shelf life in a meat processing plant. *Journal of Dairy Food and Environmental Sanitation*, *12*, 69–70.
- Ayçiçek, H., Sarimehmetoğlu, B., & Cariroğlu, S. (2004). Assessment of the microbiological quality of meals sampled at the meal serving units of a military hospital in Ankara, Turkey. *Food Control*, *15*, 379–384.
- Bolduc, D., Srouf, L. F., Sweet, L., Neathy, A., Galanis, E., Isaacs, S., et al. (2004). Severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in health care institutions in Charlottetown, Prince Edward Island, fall. *Canada Communicable Disease Report*, *30*, 81–88.
- Byrne, B., Lyng, J., Dunne, G., & Bolton, D. J. (2008). An assessment of the microbial quality of the air within a pork processing plant. *Food Control*, *19*, 915–920.
- Clark, S., Rylander, R., & Larsson, L. (1983). Airborne bacteria, endotoxins and fungi in dust in poultry and swine confinements buildings. *American Industrial Hygiene Association Journal*, *44*, 537–541.
- Codex Alimentarius Commission. (2003). Recommended International Code of Practice. General Principles of Food Hygiene. CAC/RCP 1-1969, Rev. 4-2003. Codex Alimentarius Commission, Washington, DC, E.U.
- Dancer, S. J. (2004). How do we assess hospital cleaning? A proposal for microbiological standards for surface hygiene in hospitals. *Journal of Hospital Infection*, *56*, 10–15.
- Den Aantrekker, E. D., Boom, R. M., Zwietering, M. H., & Van Schothorst, M. (2003). Quantifying recontamination through factory environments – a review. *International Journal of Food Microbiology*, *80*, 117–130.
- DeVita, M. D., Wadhwa, R. K., Theis, M. L., & Ingham, S. C. (2007). Assessing the potential of *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus* transfer to foods and customers via a survey of hands, hand-contact surfaces and food-contact surfaces at foodservice facilities. *Journal of Foodservice*, *18*, 76–79.
- Furnari, G., Molino, N., Bruno, S., Quaranta, G., Laurenti, P., & Ricciardi, G. (2002). Efficacy and critical implementation of food handlers' professional training: analysis of an experience. *Annali di Igiene*, *14*(5), 419–426.
- Gilbert, R. J., de Louvois, J., Donovan, T., Little, C., Nye, K., Ribeiro, C. D., et al. (2000). Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat foods sampled at the point of sale. *Communicable Disease and Public Health*, *3*, 163–167.
- Health Protection Agency of United Kingdom. (November 2009). *Guidelines for assessing the microbiological safety of Ready-to-Eat foods placed on the market*. London.
- Keskinen, L. A., Todd, E. C. D., & Ryser, E. T. (2008). Impact of bacterial stress and biofilm-forming ability on transfer of surface-dried *Listeria monocytogenes* during slicing of delicatessen meats. *International Journal of Food Microbiology*, *127*(3), 298–304.
- Legnani, P., Leoni, E., Berveglieri, M., Mirolo, G., & Alvaro, N. (2004). Hygienic control of mass catering establishments, microbiological monitoring of food and equipment. *Food Control*, *15*, 205–211.
- Lingaas, E., Johnsen, B. O., Torfoss, D., Dorenberg, D. H., Andersen, C. T., Müller, F., et al. (2008). *Listeria monocytogenes* outbreak in a comprehensive cancer and transplantation centre. In *18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Barcelona, Spain, 19–22 April 2008, Presentation O44.
- Lues, J. F. R., & Van Tonder, I. (2007). The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. *Food Control*, *18*(4), 326–332.
- Lund, B. M., & O'Brien, S. J. (2009). Microbiological safety of food in hospitals and other healthcare settings. *Journal of Hospital Infection*, *73*, 109–120.
- Malheiros, P., Passos, C., Casarin, L., Serraglio, L., & Tondo, E. C. (2010). Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry meat to surfaces of stainless steel and polyethylene and their disinfection. *Food Control*, *21*(3), 298–301.
- Martínez-Tomé, M., Vera, A. M., & Murcia, M. (2000). Improving the control of food production in catering establishments with particular reference to the safety of salads. *Food Control*, *11*, 437–445.
- Michaels, B., Keller, C., Blevins, M., Paoli, G., Ruthman, T., Todd, E., & Griffith, C. J. (2004). Prevention of food worker transmission of foodborne pathogens: risk assessment and evaluation of effective hygiene intervention strategies. *Food Service Technology*, *4*, 31–49.
- Pasquarella, C., Pitzurra, O., & Savino, A. (2000). The index of microbial air contamination. *Journal of Hospital Infection*, *46*, 241–256.
- Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Carrasco, E., García, R. M., & Zurera, G. (2008). Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. *Trends in Food Science and Technology*, *19*, 130–143.
- Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Carrasco, E., García-Gimeno, R. M., & Zurera, G. (2005). Exposure assessment as a tool to support decisions in a risk management scheme: evaluation of different scenarios of cross-contamination for *Listeria monocytogenes* in deli-meat products. In *Paper presented at the COST 920*, Dubrovnik, Croatia.
- Real Decreto 3484/2000, de 29 de diciembre, por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas.
- Réglier-Poupet, C., Parain, R., Beauvais, P., Descamps, H., Gillet, H., Le Peron, J. Y., et al. (2005). Evaluation of the quality of hospital food from the kitchen to the patient. *Journal of Hospital Infection*, *59*, 131–137.
- Regulation (EC) No. 852/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on the hygiene of foodstuffs.
- Rosset, P., Cornu, M., Noël, V., Morelli, E., & Poumeyrol, G. (2004). Time-temperature profiles of chilled ready-to-eat foods in school catering and probabilistic analysis of *Listeria monocytogenes* growth. *International Journal of Food Microbiology*, *96*, 49–59.
- Sala, M. R., Cardeñosa, N., Arias, C., Llovet, T., Recasens, A., Domínguez, A., et al. (2005). An outbreak of food poisoning due to a genogroup I norovirus. *Epidemiology and Infection*, *133*, 187–191.
- Santana, N. G., Almeida, R. C. C., Ferreira, J. S., & Almeida, P. F. (2009). Microbiological quality and safety of meals served to children and adoption of good manufacturing practices in public school catering in Brazil. *Food Control*, *20*, 255–261.
- Sexton, T., Clarke, P., O'Neill, E., Dillane, T., & Humphreys, H. (2006). Environmental reservoirs of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in isolation rooms: correlation with patient isolates and implications for hospital hygiene. *Journal of Hospital Infection*, *62*(2), 187–194.
- Statistical Memory of Andalusia Government (2007). Information and Evaluation Service. Department of Statistics, Seville, Regional Health Ministry.
- Taylor, E. (2008). A new method of HACCP for the catering and food service industry. *Food Control*, *19*, 126–134.
- US Food and Drug Administration. (1992). *Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins*. Rockville, Maryland, USA: Center for Food Safety and Applied Nutrition, US Food and Drug Administration. <http://vm.cfsan.fda.gov/~mov/chap3.html>.
- Veiros, M. B., Proença, R. P. C., Santos, M. C. T., Kent-Smith, L., & Rocha, A. (2009). Food safety practices in a Portuguese canteen. *Food Control*, *20*, 936–941.
- Whyte, W. (1986). Sterility assurance and models for assessing airborne bacterial contamination. *Journal of Parenteral Science and Technology*, *40*(5), 188–197.

PUBLICACIÓN 4

PUBLICACIÓN 4: ESTUDIOS DE PROBABILIDAD Y TIEMPO DE CRECIMIENTO DE SEROTIPOS PATÓGENOS DE *ESCHERICHIA COLI* MEDIANTE TÉCNICAS TURBIDIMÉTRICAS

STUDYING THE GROWTH BOUNDARY AND SUBSEQUENT TIME TO GROWTH OF PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* SEROTYPES BY TURBIDITY MEASUREMENTS

PUBLICACIÓN 4: ESTUDIOS DE PROBABILIDAD Y TIEMPO DE CRECIMIENTO DE SEROTIPOS PATÓGENOS DE *ESCHERICHIA COLI* MEDIANTE TÉCNICAS TURBIDIMÉTRICAS

RESUMEN

En los estudios realizados en los establecimientos de restauración colectiva de comedores escolares centros geriátricos y hospitales se demostró la presencia de *Escherichia coli* en ensaladas vegetales RTE. Estos resultados fueron el punto de partida para el desarrollo del presente estudio que tuvo como objetivos, evaluar la cinética de crecimiento de 4 serotipos patogénicos de *E. coli* (O55:H6, O59:H21, O158:H23 y O157:H7) en caldo, en función de los factores medioambientales como el nivel de inóculo, la Temperatura, el pH y la a_w ; seleccionar el serotipo de *E. coli* de mayor resistencia para desarrollar los modelos de Probabilidad de crecimiento; y describir el comportamiento cinético del serotipo en cuestión mediante la cuantificación de los tiempos de detección. La presente Publicación proporciona una visión del comportamiento de *E. coli* bajo determinadas condiciones medioambientales, a la vez que puede constituir una base científica para la toma de desiciones en una industria alimentaria.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se dividió en tres etapas fundamentales:

ESTUDIO PRELIMINAR DEL COMPORTAMIENTO DE LOS SEROTIPOS PATOGÉNICOS DE *E. COLI* MEDIANTE MEDICIONES TURBIDIMÉTRICAS.

Los serotipos utilizados fueron proporcionados por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y fueron aislados de alimentos contaminados.

- ✓ *E. coli* O55:H6 (NCTC 8959)
- ✓ *E. coli* O59:H21 (ATCC 10536)
- ✓ *E. coli* 158:H23 (NCTC 10974)
- ✓ *E. coli* O157:H7 (ATCC 35150)

El estudio de los serotipos de *E. coli* se efectuó en caldo de Triptona Soya (TSB, Oxoid), teniendo en cuenta tres Temperaturas de incubación (8, 12 y 16°C), dos niveles de pH (7,0 y 5,5), dos niveles iniciales de contaminación (2 y 4 log ufc/ml) y un valor único de a_w (0,997). Se estudiaron un total de 12 condiciones por serotipo, y

se sembraron tres réplicas por condición en Agar Triptona Bilis-X Glucorónido (TBX, Oxoid).

El crecimiento de las cepas de *E. coli* se monitorizó a través del espectrofotómetro Bioscreen C[®] (Labsystems, Finlandia) a 600nm durante 30 días. Para ello se utilizaron placas microtiter de 10x10 pocillos, que se prepararon a razón de 200µl de caldo de TSB/50µl de inóculo. En aquellos pocillos donde hubo una turbidez del medio se consideraron como positivos (crecimiento), mientras que en aquellos donde no se apreció o no hubo una turbidez completa, se comprobaron mediante la siembra en Agar de recuento en placa (PCA); en estos casos se consideró crecimiento si existía un aumento de 1 log ufc/ml con respecto al nivel de inóculo inicial.

SELECCIÓN DEL SEROTIPO MÁS RESISTENTE Y ESTUDIO DE PROBABILIDAD DE CRECIMIENTO

A través del Bioscreen C[®] se obtuvieron los valores de absorbancia (*ABS*) con respecto al tiempo. A la *ABS* de los pocillos inoculados se le restó la *ABS* de los no inoculados llamados “blancos” (alrededor de 0,10 unidades) obteniéndose los datos necesarios para la representación de las curvas de crecimiento. El modelo Primario de Baranyi y Roberts (1994) se ajustó a los datos de crecimiento de *ABS* mediante el programa DMFit (v.2.1–Instituto de Investigación de alimentos, Norwich, UK), para la obtención de los parámetros cinéticos como tasa de absorbancia ($\mu_{abs, h^{-1}}$) y el tiempo de latencia ($\lambda_{abs, h}$). El análisis de varianza (SPSS v. 9.0–Chicago, Illinois, USA) y la prueba F, se utilizaron para evaluar el efecto individual de los diferentes factores (Temperatura, pH y nivel de inóculo) sobre los parámetros de crecimiento obtenidos. La selección del mejor serotipo se realizó en base a la mayor velocidad de crecimiento en condiciones óptimas y su mejor adaptación en condiciones limitantes y fue elegido para realizar los modelos de Probabilidad de crecimiento (C/NC).

Para el establecimiento de los modelos Probabilidad de crecimiento, se utilizó un Diseño Factorial Completo teniendo en cuenta 3 valores de Temperatura (8, 12 y 16°C) y 3 niveles de inóculo (4; 3 y 2 ufc/ml) en función de 9 niveles de pH (7,0–5,0) y 5 valores de a_w (0,997–0,960). Los datos se identificaron como 1 y 0 en función de si se observó o no crecimiento, estableciéndose como punto de corte de C/NC el criterio de $P = 0,01$. Las variables independientes (pH y a_w) fueron escaladas (pH' y a_w') en un rango entre 0,1–0,9 para homogenizar las varianzas y evitar las diferencias de magnitud entre ellas (Ecuación 1, artículo publicado) y se relacionaron con la Probabilidad de crecimiento (P) mediante un modelo Secundario polinómico de Regresión Logística (Ecuación 2, artículo publicado).

Se obtuvieron 9 modelos de Regresión Logística que fueron ajustados por el programa estadístico SPSS (v. 15.0, Chicago, Illinois, USA). La bondad de ajuste de los modelos se evaluó a través de los índices de error: R^2 (coeficiente de determinación), la prueba estadística de Hosmer–Lemeshow y el coeficiente c (% de casos correctamente clasificados por el modelo) con el objeto de determinar el ajuste de los datos observados a las predicciones generadas por los modelos.

CÁLCULO DE LOS TIEMPOS DE DETECCIÓN (t_d)

Se calculó el t_d en aquellas condiciones donde se observó el crecimiento de *E. coli*, teniendo en cuenta que el t_d es el tiempo necesario para que la población microbiana alcance una concentración correspondiente con un nivel mínimo detectable de *ABS*, conocido como límite de detección. El límite de detección se estableció a partir de las medidas de *ABS* generadas en Bioscreen C[®] como la suma del promedio de los valores de los blancos más 3 veces su desviación estándar (Vermeulen y col., 2007). La variabilidad de los valores de t_d se cuantificó por medio de la desviación estándar representada a través de histograma para cada una de las Temperaturas utilizadas.

RESULTADOS

INVESTIGACIÓN DE LOS SEROTIPOS DE *E. COLI*

En la primera fase del estudio, los resultados demostraron diferencias significativas respecto a la cinética de crecimiento, entre los serotipos estudiados (Tabla 1, artículo publicado).

A 8°C–pH 5,5, el serotipo de *E. coli* O59:H21 no fue capaz de crecer mientras que *E. coli* O157:H7 sólo lo hizo a 4 log ufc/ml, ello significa la posible influencia del nivel de inóculo sobre μ_{abs} . Los serotipos mejor adaptados fueron *E. coli* O158:H23 y O55:H26 capaces de crecer a las dos concentraciones de inóculo estudiadas.

En términos generales, los serotipos O158:H23 y O157:H7 mostraron un crecimiento más rápido que los demás. El crecimiento de ambos serotipos fue ligeramente influenciado por el pH (5,50) a Temperaturas de 8 y 12°C, lo cual sugiere que la acción conjunta de las bajas Temperaturas y el estrés ácido se traducen en valores bajos de μ_{abs} .

Por otro lado, la influencia individual de los factores como la Temperatura, el pH y nivel de inóculo sobre los parámetros de crecimiento de *ABS*, fue expuesto en la Tabla 2 del artículo publicado.

El análisis de varianza arrojó que los valores de Temperatura utilizados influyeron significativamente sobre el crecimiento de los serotipos, pero no así para *E. coli* O157:H7 donde no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$). Cabe señalar que en condiciones limitantes para el crecimiento (8°C) todos los serotipos mostraron diferencias significativas respecto a λ_{abs} .

De entre todos los serotipos estudiados, *E. coli* O158:H23 presentó un crecimiento más rápido y mejor adaptación a condiciones de estrés y por tanto fue la cepa seleccionada para el desarrollo de los modelos de C/NC.

MODELOS DE PROBABILIDAD DE CRECIMIENTO.

La Figura 1 del artículo publicado, muestra las respuestas de C/NC de la cepa de *E. coli* O158:H23 teniendo en cuenta la a_w frente al pH, a las Temperaturas y niveles de inóculo estudiados.

Las estimaciones del modelo de Regresión Logística indicaron que a 8°C y pH 5,00, no hubo crecimiento de *E. coli* O158:H23 bajo ninguna condición de a_w y nivel de inóculo. Sin embargo, el crecimiento ocurrió a medida que aumentaron los niveles de pH ($> 5,25$) y a_w ($> 0,990$). A 12 y 16°C , el crecimiento se observó a niveles bajos de pH ($5,00$ – 12 y 16°C) y de a_w ($0,980$ – 12°C y $0,970$ – 16°C).

Los resultados estadísticos revelaron que existió una bondad de ajuste razonable de los datos estimados por el modelo a los datos de crecimiento observados de la cepa *E. coli* O158:H23 (Tablas 3 y 4 del artículo publicado).

Por otra parte, se demostró que el nivel de inóculo afectó sustancialmente al pH mínimo de crecimiento (Figura 2, del artículo publicado). Bajo las condiciones de 8°C – a_w 0,990, el pH mínimo de crecimiento fue menor ($4 \log \text{ ufc/ml}$ –pH 5,33; $2 \log \text{ ufc/ml}$ –pH 5,54). Por el contrario, a 12°C – a_w 0,980 y a 16°C – a_w 0,970, el pH mínimo de crecimiento aumentó para todos los niveles de inóculos. Esto significa que el efecto de la Temperatura y la a_w es más fuerte en el rango de 8 – 12°C que para el rango de 12 – 16°C .

EFFECTOS DE LOS FACTORES AMBIENTALES SOBRE LOS VALORES DEL TIEMPO DE DETECCIÓN

En la tercera fase del estudio, el crecimiento cinético de la cepa fue descrito mediante el uso de los valores del t_d (h). En resumen, el t_d aumentó a niveles bajos de Temperatura, pH y a_w . A mayor Temperatura (16°C) la influencia del pH fue menor en el rango desde $7,0/5,25$ puesto que el t_d fluctuó entre $32,20/45,57\text{h}$, mientras que en el rango de $5,25/5,0$ el t_d aumentó a $72,52$ h. A 12°C se observó un incremento

significativo del t_d a partir de los valores de pH 5,50/5,0 (118,26/375,19h). A 8°C el incremento se observó desde valores de pH 5,75/5,25 (231,12–327,92h). Asimismo, se observó una mayor variabilidad de los t_d a Temperaturas de 8 y 12°C y niveles bajo de pH.

Cabe destacar la marcada influencia del nivel de inóculo inicial sobre el t_d cuando las condiciones son más limitantes para el crecimiento. A 8°C–pH 5,50 y valores de a_w desde 0,999 a 0,990, se produjo un incremento del t_d de 8,53h (4 log ufc/ml), de 52,59h (3 log ufc/ml) y de 85,57h (2 log ufc/ml). Nuestro estudio demostró que a 16°C–pH 7– a_w 0,997, el t_d se mantuvo entre 29,16 y 36,48h, lo cual indica que bajo condiciones favorables el nivel de inóculo tiene muy poco efecto sobre el t_d

La variabilidad obtenida en los valores de t_d a 8°C reflejó en una mayor dispersión de los datos representados en los histogramas (Figura 4, del artículo publicado). Ello sugiere que las Temperaturas cercanas a las de refrigeración provocan una mayor variabilidad en el comportamiento de *E. coli*.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fm

Studying the growth boundary and subsequent time to growth of pathogenic *Escherichia coli* serotypes by turbidity measurements

A. Valero*, M. Rodríguez, E. Carrasco, F. Pérez-Rodríguez, R.M. García-Gimeno, G. Zurera

Department of Food Science and Technology, University of Cordoba, Campus de Rabanales, Edificio Darwin, 14014 Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 January 2010

Received in revised form

26 April 2010

Accepted 27 April 2010

Available online 5 May 2010

Keywords:

Growth/no growth models

Escherichia coli

Detection time

Inoculum level

Absorbance measurements

ABSTRACT

The presence of *Escherichia coli* in contaminated food products is commonly attributed to faecal contamination when they are improperly handled and/or when inactivation treatments fail. Adaptation of *E. coli* at low pH and a_w levels can vary at different temperatures depending on the serotype, thus more detailed studies are needed. In this work, a screening to assess the growth of four pathogenic serotypes of *E. coli* (O55:H6; O59:H21; O158:H23 and O157:H7) was performed. Subsequently, boundary models were elaborated with the fastest serotype selected at different temperatures (8, 12 and 16 °C), and inoculum levels (2, 3 and 4 log cfu/mL) as function of pH (7.00–5.00) and a_w (0.999–0.960). Finally, the growth kinetics of *E. coli* was described in the conditions that allowed growth. Results obtained showed that the serotypes O157:H7 and O59:H21 did not grow at more stringent conditions (8 °C; pH 5.50), while the *E. coli* O158:H23 was the best adapted, resulting in faster growth. The logistic regression models presented a good adjustment to data observed since more than 96.7% of cases were correctly classified. The growth interface was shifted to more limited conditions as the inoculum size was higher. Detection times (t_d , h) and their variability were higher at low levels of the environmental factors studied. This work provides insight on the growth kinetics of *E. coli* at various environmental conditions.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Enteropathogenic *Escherichia coli* comprise different serotypes that can be present in contaminated foods causing several human illnesses. Its pathogenicity primarily depends on the virulence genes acquired. Most of these serotypes are capable to produce Shiga-like toxins and/or other heat labile or heat stable toxins that can potentially cause diarrhoeal diseases in humans. Enterohaemorrhagic *E. coli* can also cause haemolytic uraemic syndrome which has a relatively high mortality rate (5–15%) (Chu and Hemphill, 2004). Besides, some serotypes of enterotoxigenic *E. coli* can also produce a cytotoxin to Vero cells (VTEC *E. coli*).

Infections caused by VTEC serotypes are of low prevalence (overall EU total of 1.2 cases per 100,000 people in the EU) (EFSA, 2006); but the high infectivity and seriousness of disease justifies the consideration of these microorganisms as important foodborne pathogens. Outbreaks attributed to *E. coli* serotypes within the EU increased by 38.3% in 2007 compared to 2006 being the largest number of human cases (39.4%) originated from outbreaks in catering services or restaurants (EFSA, 2009).

Generally, *E. coli* can be present in foods from animal origin, such as pork, beef or poultry products (Carney et al., 2006), tap water (Solomon et al., 2002) or in fresh-cut leafy greens vegetables such as cabbage, lettuce or spinach (Bharathi et al., 2001). They can enter the food chain through cross-contamination or recontamination phenomena (Pérez-Rodríguez et al., 2007) or through the irrigation with contaminated water, which may result in the internalization of certain *E. coli* serotypes in vegetables (Sivapalasingam et al., 2004).

Also, it has been reported the acid resistance and subsequent adaptation of several *E. coli* serotypes as a result of their presence in low-pH foods and in the runoff fluids that remain in meat industries after applying disinfection treatments with organic acids in meat carcasses (Samelis and Sofos, 2003; Stopforth et al., 2007).

Particularly, *E. coli* O157:H7 is of great interest due to the severity of the illnesses caused and its low infective dose, around 100 cells (Strachan et al., 2005). However, other non-O157 serotypes have been associated to human infections (Blanco et al., 2004) through the ingestion of risk food products, such as fermented and minced meats or raw milk (Scavia et al., 2005). It is recognized that these outbreaks could be under-reported because surveillance is mainly based on laboratory methods specific for *E. coli* O157 (Possé et al., 2007). Besides, characterization, survival and growth behaviour of non-O157 serotypes in foods have not been yet sufficiently studied.

* Corresponding author. Tel.: +34 957 21 20 57; fax: +34 957 21 20 00.
E-mail address: bt2vadia@uco.es (A. Valero).

A comparison between different serotypes in order to know more accurately the survival and growth capacity of *E. coli* at optimal and limiting environmental conditions simulating food matrices could be of high interest.

In this sense, predictive models have been defined as a powerful tool to describe microbial behaviour in foods. Specifically, boundary models can be used to determine the chance of microorganisms growing at specific levels of environmental factors. Therefore, these models are greatly relevant in the safety of foods which can be contaminated with food pathogens (Vermeulen et al., 2007). Traditionally, the output of these models, i.e. probability of growth (P), has been set up in fail-dangerous cut off points (0.5) that could lead to unacceptable predictions for food industries in the case of pathogens (50% chance of growth). Salter et al. (2000) stated that the level of probability can be set depending on the level of safety required. They concluded that safer cut off point probability levels would produce a shift in the growth/no growth boundary to limiting levels of environmental factors (temperature and a_w). Therefore, setting low levels of P are necessary in order to provide more accurate growth interfaces.

Among many other factors, the position of the growth/no growth boundary is affected by the inoculum level as is shown in some studies (Masana and Baranyi, 2000; Koutsoumanis and Sofos, 2005). Skandamis et al. (2007) found that the interface was shifted to low levels of environmental conditions when the inoculum level was high. Similar results were published by Bidlas et al. (2008), suggesting that the inoculum effect can be modelled independently, and the growth/no growth boundary is only influenced by the inoculum size. However, the potential growth of low inoculum levels at limiting conditions can be associated to different sources of variability attributed to their physiological state, molecular cell mechanisms that induce growth, or composition of the media. Unfavourable conditions to grow induced by low levels of environmental factors such as temperature, pH or water activity increase the variability of cells to start growing.

The main purpose of this work was to study the behaviour of *E. coli* serotypes in the growth/no growth domain as a function of four different factors: inoculum level, temperature, pH and a_w . A screening to assess the growth of four *E. coli* serotypes (O55:H6; O59:H21; O158:H23 and O157:H7) was performed at different temperatures, pH and inoculum levels by turbidimetric measurements. Afterwards, the fastest serotype was selected to perform boundary models against pH and a_w at different temperatures and inoculum levels. Finally the detection time (t_d) was calculated in the conditions in which growth was observed.

2. Material and methods

2.1. Serotypes and inoculum

In a preliminary phase, a screening of four different *E. coli* serotypes was performed in order to select the fastest one to elaborate the boundary models. All serotypes have been isolated from contaminated foods and can cause diverse human diseases:

- *E. coli* O55:H6 (NCTC 8959): has been isolated from contaminated foods, presenting virulence properties such as plasmids and genes for the pilin subunit of the bundle-forming pilus which are related to the local adherence to live tissues and DNA hybridization (Pelayo et al., 1999).
- *E. coli* O59:H21 (ATCC 10536): is an entero-toxicogenic serotype that has been associated to human disease (Arthur et al., 2002).
- *E. coli* O158:H23 (NCTC 10974): has been catalogued as an entero-pathogenic serotype associated to outbreaks of infantile enteritis (Rowe et al., 1974).

- *E. coli* O157:H7 (ATCC 35150): is a Verocytotoxigenic serotype that has been involved in several food outbreaks causing 76 million cases of human illness and up to 5,000 deaths annually in the US (Frenzen et al., 2005).

The serotypes were obtained from the Spanish Type Culture Collection (CECT, Burjassot, Valencia) and rehydrated as indicated by the manufacturer's instructions. All serotypes showed a typical growth on McConkey-Sorbitol and on Tryptone Bile X-Glucuronide Medium, TBX agar (Oxoid, UK).

Three days before the experiment, stock cultures of each serotype were transferred to a tube containing 10 mL of Tryptone Soya Broth (TSB, Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK) and incubated at 37 °C for 24 h. From this, 1 mL was sub-cultured into a tube containing 10 mL of TSB and incubated at 37 °C for 24 h. One more time, *E. coli* strains were sub-cultured in a 50 mL flask until the early stationary phase was reached (18 h).

2.2. Experimental design

2.2.1. Screening of the serotypes

The screening of *E. coli* serotypes was performed in modified culture media at three temperatures (8, 12, 16 °C), two levels of pH (7.00 and 5.50), two inoculum levels (2 and 4 log cfu/mL) at a fixed value of a_w (0.999). Therefore, 12 different environmental conditions were selected for each serotype, and three replicates were performed per condition tested.

2.2.2. Boundary models

A full factorial design was followed for the elaboration of the boundary models with nine levels of pH (7.00, 6.75, 6.50, 6.25, 6.00, 5.75, 5.50, 5.25 and 5.00) and five levels of a_w (0.999, 0.990, 0.980, 0.970 and 0.960). Each model was performed at three different temperatures (8, 12, 16 °C) and inoculum levels (2, 3 and 4 log cfu/mL). Thus, 45 conditions of pH and a_w were studied per temperature and inoculum level, obtaining finally nine boundary models.

2.3. Media preparation

Water activity levels were set by adding the necessary quantities of sodium chloride (Panreac, 131659) to Tryptone Soya Broth (TSB, Oxoid, UK) 100 mL flasks. The sodium chloride percentage was calculated considering the salt content of the initial TSB broth (5.0 g/L). a_w was subsequently measured with Aqualab model 3TE (Decagon Devices, Inc., Pullman, Washington, USA).

Adjustment of pH was made with a 1 M HCl solution (Panreac, 181021), and 1 M NaOH solution (Panreac, 181691) when necessary, and pH values were measured with a pH/mv-meter digit 501 (Crison, Barcelona, Spain). Once modified, all media were filter-sterilized through 0.22 µm sterile filters (Millipore, Madrid Spain) and they were kept in refrigeration until inoculation. Before inoculation, a_w and pH values were checked.

2.4. Inoculation procedure and assessment of growth

When the early stationary phase was reached by the inocula (~18 h), the 50 mL flasks were decimal diluted in 9 mL tubes of physiologic saline solution at 0.85% until obtaining a concentration of 5×10^2 ; 5×10^3 and 5×10^4 cfu/mL. Afterwards, a number of microtiter wells per condition (3 wells for screening, and 8 wells for growth/no growth models development) were filled up with 200 µL of the modified media, and inoculated with 50 µL of the diluted cultures, reaching the desired concentration; i.e. 10^2 , 10^3 or 10^4 cfu/mL per well. In addition, 2 wells per condition studied

Table 1

Mean values and standard deviation (SD) of absorbance growth rates (μ_{abs} , h^{-1}) and time of constant absorbance (λ_{abs} , h) obtained in the screening of four *E. coli* serotypes at 8, 12 and 16 °C (2 and 4 log cfu/mL).

Serotype	T (°C)	IL ^a	pH	μ_{abs} (h^{-1}) \pm SD	λ_{abs} \pm SD
O59:H21	8	2	5.5	NG ^b	NG
O59:H21	8	4	5.5	NG	NG
O59:H21	12	2	5.5	0.002 \pm 0.001	217.813 \pm 19.964
O59:H21	12	4	5.5	0.003 \pm 0.001	191.322 \pm 10.682
O59:H21	16	2	5.5	0.011 \pm 0.001	114.872 \pm 0.715
O59:H21	16	4	5.5	0.012 \pm 0.000	83.886 \pm 1.352
O59:H21	8	2	7.0	0.001 \pm 0.000	256.238 \pm 14.155
O59:H21	8	4	7.0	0.003 \pm 0.000	217.252 \pm 5.060
O59:H21	12	2	7.0	0.003 \pm 0.000	266.784 \pm 33.463
O59:H21	12	4	7.0	0.009 \pm 0.002	174.240 \pm 23.533
O59:H21	16	2	7.0	0.012 \pm 0.002	97.898 \pm 3.174
O59:H21	16	4	7.0	0.013 \pm 0.002	42.897 \pm 2.819
O55:H6	8	2	5.5	0.002 \pm 0.000	333.723 \pm 37.582
O55:H6	8	4	5.5	0.004 \pm 0.000	207.513 \pm 6.109
O55:H6	12	2	5.5	0.009 \pm 0.003	115.435 \pm 6.673
O55:H6	12	4	5.5	0.009 \pm 0.002	91.386 \pm 12.692
O55:H6	16	2	5.5	0.017 \pm 0.001	75.543 \pm 3.064
O55:H6	16	4	5.5	0.021 \pm 0.001	61.046 \pm 0.471
O55:H6	8	2	7.0	0.002 \pm 0.001	308.232 \pm 29.012
O55:H6	8	4	7.0	0.003 \pm 0.000	220.497 \pm 8.958
O55:H6	12	2	7.0	0.013 \pm 0.000	93.791 \pm 0.000
O55:H6	12	4	7.0	0.016 \pm 0.003	75.938 \pm 7.627
O55:H6	16	2	7.0	0.034 \pm 0.002	55.752 \pm 0.337
O55:H6	16	4	7.0	0.034 \pm 0.004	34.967 \pm 1.869
O158:H23	8	2	5.5	0.006 \pm 0.002	291.130 \pm 25.437
O158:H23	8	4	5.5	0.006 \pm 0.002	179.370 \pm 30.154
O158:H23	12	2	5.5	0.008 \pm 0.003	117.706 \pm 14.514
O158:H23	12	4	5.5	0.007 \pm 0.002	74.765 \pm 14.734
O158:H23	16	2	5.5	0.025 \pm 0.003	74.870 \pm 2.510
O158:H23	16	4	5.5	0.022 \pm 0.001	59.507 \pm 1.311
O158:H23	8	2	7.0	0.007 \pm 0.001	203.163 \pm 4.489
O158:H23	8	4	7.0	0.006 \pm 0.000	123.489 \pm 35.936
O158:H23	12	2	7.0	0.023 \pm 0.004	92.511 \pm 3.513
O158:H23	12	4	7.0	0.028 \pm 0.001	62.476 \pm 1.703
O158:H23	16	2	7.0	0.024 \pm 0.002	31.535 \pm 1.390
O158:H23	16	4	7.0	0.033 \pm 0.002	16.779 \pm 0.575
O157:H7	8	2	5.5	NG	NG
O157:H7	8	4	5.5	0.002 \pm 0.000	319.447 \pm 21.872
O157:H7	12	2	5.5	0.002 \pm 0.001	125.891 \pm 17.416
O157:H7	12	4	5.5	0.004 \pm 0.001	72.122 \pm 10.272
O157:H7	16	2	5.5	0.011 \pm 0.002	76.799 \pm 14.267
O157:H7	16	4	5.5	0.022 \pm 0.002	68.044 \pm 0.285
O157:H7	8	2	7.0	0.007 \pm 0.000	233.250 \pm 2.944
O157:H7	8	4	7.0	0.008 \pm 0.000	155.170 \pm 4.203
O157:H7	12	2	7.0	0.020 \pm 0.003	102.265 \pm 5.761
O157:H7	12	4	7.0	0.032 \pm 0.005	54.210 \pm 4.681
O157:H7	16	2	7.0	0.030 \pm 0.002	44.965 \pm 1.668
O157:H7	16	4	7.0	0.038 \pm 0.004	23.609 \pm 3.728

^a Inoculum level (log cfu/mL).

^b No growth was observed.

the indirect measurement method followed, since the correlation between absorbance and cell concentration is dependent on temperature, pH and a_w . In this case, the notorious influence of the pH at 8 and 12 °C could be attributed to acid conditions at pH 5.5. At these acid conditions, glucose is less efficiently converted to biomass and that exhaustion of energy substrate may define the acidity limit for growth (Krist et al., 1998). Therefore, low temperatures together with acid stress can be translated in low values of absorbance growth rate, although this effect should be evaluated for different serotypes since it was more notorious for *E. coli* O157:H7 and O158:H23.

Globally, the serotype O158:H23 presented the fastest growth with little influence of pH and high values of growth rate, being both features desirable for selection of a serotype as a case test from a safety perspective.

In order to study the individual effects of temperature, pH and inoculum level on absorbance growth parameters (μ_{abs} and λ_{abs}), an ANOVA analysis was followed. Results are summarized in Table 2. Temperature was found to be a significant factor influencing both μ_{abs} and λ_{abs} , with the exception of the serotype O157:H7 for μ_{abs} (p -value > 0.05). Inoculum level and pH were non-significant for all serotypes studied. Nevertheless, in relation to the inoculum level, is it worth to note that at limiting conditions (8 °C) all serotypes showed differences in λ_{abs} .

There has been little examination of serotype variation in food microbiology literature. Gill et al. (2007) studied the behaviour of eight cold-adapted *E. coli* strains at refrigeration temperatures. They stated that a range of minimal temperatures (instead of one value of temperature) for growth should be established given that this minimum temperature was highly dependent on the serotype used, in agreement with our results. Other studies were focused on *E. coli* O157:H7. At this respect, Palumbo et al. (1995) examined 16 *E. coli* O157:H7 serotypes, finding that the variation in the time required to achieve a 3-log growth, ranged from 4 to 46 days at minimal growth temperatures (7.3–9.2 °C). Coleman et al. (2003) studied the influence of inoculum density and agitation on several strains of *E. coli* O157:H7. They found that at 10 °C, a significant effect of the inoculum level was obtained, being this effect negligible at 19 °C or 37 °C. Whiting and Golden (2002) studied the behaviour of 17 strains of *E. coli* O157:H7 in BHI broth adjusted to pH 5.3, NaCl 1.5% and 15 °C. They also encountered differences among serotypes, with λ_{abs} ranging between 13.7 and 55.6 h, and μ_{abs} between 0.055 and 0.106 h^{-1} .

As commented in the material and methods section, μ_{abs} and λ_{abs} were obtained through an indirect method based on turbidimetry. However, they can be correlated with data based on cell counts. In the case of growth rate, Dalgaard et al. (1994) stated that turbidimetric estimates are not the same as those estimates from cell count data, although this deviation is systematic. They proposed that μ_{abs} should be multiplied by a conversion factor of 1.1 in order to obtain the real maximum growth rate. Augustin et al. (1999) concluded that absorbance growth rate is underestimated, but the use of a conversion factor is also advisable, especially at cell levels above the detection limit of the absorbance measuring equipment. Other methodologies applied are the use of calibration curves (Francois et al., 2005) where a linear relationship is observed between absorbance and cell count growth rates. However, care

Table 2

Results obtained in ANOVA analysis and F -tests for the serotypes and environmental factors studied.

Variables	μ_{abs} (h^{-1})		λ_{abs} (h)	
	F -test	p	F -test	p
<i>E. coli</i> O59:H21				
T (°C)	17.432	0.002	18.569	0.002
pH	0.001	0.971	0.211	0.658
IL ^a	0.478	0.509	1.002	0.356
<i>E. coli</i> O55:H6				
T (°C)	18.187	0.001	33.721	<0.001
pH	1.116	0.316	0.067	0.801
IL ^a	0.067	0.802	0.657	0.437
<i>E. coli</i> O158:H23				
T (°C)	8.707	0.008	12.373	0.003
pH	1.874	0.201	0.946	0.354
IL ^a	0.062	0.808	1.171	0.305
<i>E. coli</i> O157:H7				
T (°C)	2.742	0.124	13.555	0.003
pH	4.33	0.067	0.289	0.604
IL ^a	0.186	0.676	<0.001	0.984

^a Inoculum level (log cfu/mL).

should be taken because environmental factors, such as pH can produce a shift in the calibration curves (Valero et al., 2006). Regarding lag phase, accurate estimations based on absorbance require some cell count data, since it is not possible to obtain reliable estimations with only the absorbance growth curves (Augustin et al., 1999). However, the primary model used can influence this relationship, as Baty et al. (2002) stated that differences between primary models are larger than the differences between absorbance and cell count data.

In our study we did not intend to obtain accurate estimations of growth parameters of *E. coli* based on cell count data, but to establish a fair comparison between different serotypes through absorbance measurements. Although it is recognized that absorbance methods imply a source of error (especially when estimating lag phase) it is also reported that turbidity measurements are a valid approach in comparison to cell count method to evaluate microbial growth (Dalgaard and Koutsoumanis, 2001). The results presented here showed a valid comparison of different serotypes of *E. coli* in order to provide a mere description of growth kinetics and a selection of the fastest one to perform the growth/no growth models.

In the light of results and related literature information, growth/no growth models should be developed on the basis of the most adaptive serotype to grow in order to provide safe predictions. Among the serotypes tested, *E. coli* O158:H23 showed greater 'ready-to-grow' capacity than the others, thus it was selected for model development.

3.2. Boundary models

3.2.1. Estimated coefficients and model's adjustment

Nine logistic regression models were performed as a function of pH and a_w at different temperatures and inoculum levels. Estimation of the coefficients of the logistic regression model and their corresponding goodness of fit statistics and *p*-values, are represented in Tables 3 and 4 respectively. From Table 4, statistics obtained indicate a reasonable goodness of fit of the models, mainly due to the high values of R^2 (>0.968) and the low values of the Hosmer–Lemeshow statistic (<0.001). Transformation of the variables improved the adjustment of the logistic functions to data observed, since the percentages of correct classified cases was higher than 96.7% for all models performed. These values are also in accordance with other logistic regression models of *E. coli* (Salter et al., 2000; McKellar et al., 2002; Skandamis et al., 2007).

It can also be seen in Table 4 that no false negative cases (i.e. growth observed while no growth is predicted) were obtained. This fact is in part due to the low cut off point probability set in the boundary model, i.e. 0.01, which predicted growth when

probability was higher than 0.01. This approach contrasts with that adopted in previous boundary models published, since most of them were based on the establishment of a cut off point of 0.5. In those cases, model predictions below 0.5 are considered as no growth, and lower values of probability of growth (between 0.1 and 0.5) are classified as no growth, thus fail-dangerous estimates could be obtained. From a food safety point of view, it is unacceptable that the chance of growth at certain conditions is set to 50%. Therefore, in this study, a cut off point of 0.01 is proposed in order to obtain safer predictions.

3.2.2. Influence of environmental factors on growth/no growth interface

The observed growth/no growth responses against pH and a_w at the different temperatures and inoculum levels tested, are represented in Fig. 1. In general predictions obtained presented a good adjustment to observations. As expected, at low temperatures high levels of pH and a_w were required to enable growth of *E. coli*. In turn, when increasing temperature, growth was observed at lower levels of pH (5.00 at 12 °C and 16 °C) and a_w (0.980 at 12 °C and 0.970 at 16 °C). Salter et al. (2000) reported that the minimum value of a_w that allowed growth of *E. coli* was 0.948 in the 25–30 °C temperature range; below this temperature range, the minimum a_w allowing growth increased.

On the other hand, no growth was observed at 8 °C and pH 5.00 at all a_w and inoculum levels. Model predictions indicated that at 12 °C, a reduction of a_w (0.990) and pH (5.23) was necessary to inhibit growth (4 log cfu/mL). At 16 °C, *E. coli* predictions indicated no growth below pH 5.12 and a_w 0.980 (4 log cfu/mL). Generally, lower limits of pH and a_w that inhibit growth of *E. coli* are reported in scientific literature. Presser et al. (1998) found that at optimal a_w , *E. coli* was not able to grow below pH 4 at 10 °C. When a_w decreased (0.965) the limit value of pH at 10 °C was 5.7. These results, however, are not directly comparable with those encountered in our study since higher inoculum levels and different *E. coli* serotypes were used.

3.2.3. Effect of inoculum level on growth limits

There were differences in growth limits of *E. coli* at the three inoculum levels tested. Table 5 shows the conditions in which a binary response (growth/no growth) was obtained. The number of binary response conditions was higher for 2 and 3 log cfu/mL than for 4 log cfu/mL. This fact can be because the increased variability in initiating growth, which is associated to low levels of microorganisms. In general, higher pH and a_w levels enhanced the growth of *E. coli* (higher number of replicates grown). These cases of binary growth and no growth responses comprised the 4.2% of the

Table 3
Estimated coefficients of the boundary models performed.

Variables	8 °C			12 °C			16 °C		
	2 log cfu/mL	3 log cfu/mL	4 log cfu/mL	2 log cfu/mL	3 log cfu/mL	4 log cfu/mL	2 log cfu/mL	3 log cfu/mL	4 log cfu/mL
a_0	-4.742×10^2 (0.035)	-4.879×10^1 (0.023)	-7.217×10^1 (0.033)	-4.996×10^2 (0.007)	-2.452×10^2 (0.014)	-4.317×10^2 (0.031)	-2.439×10^2 (0.049)	-2.392×10^2 (0.036)	-2.392×10^2 (0.036)
a_1 (pH ¹)	NS ^a	-4.023×10^2 (0.028)	-5.023×10^2 (0.033)	NS	NS	6.253×10^2 (0.031)	NS	1.695×10^2 (0.024)	1.695×10^2 (0.024)
a_2 (a_w^1)	1.002×10^3 (0.034)	NS	NS	4.579×10^2 (0.007)	1.968×10^2 (0.015)	4.521×10^2 (0.031)	3.032×10^2 (0.049)	3.584×10^2 (0.029)	3.584×10^2 (0.029)
a_3 (pH ¹ × a_w^1)	2.119×10^2 (0.032)	7.996×10^2 (0.030)	1.106×10^3 (0.035)	1.541×10^3 (0.007)	-7.998×10^2 (0.015)	NS	8.932×10^2 (0.049)	3.773×10^2 (0.018)	3.773×10^2 (0.018)
a_4 (pH ¹²)	NS	NS	NS	-5.242×10^2 (0.007)	-2.721×10^2 (0.033)	-4.441×10^2 (0.031)	NS	NS	NS
a_5 (a_w^{12})	-5.772×10^2 (0.033)	NS	NS	-5.816×10^1 (0.006)	NS	NS	NS	NS	NS

^a NS = not significant at 95% confidence level.

Table 4
Goodness of fit statistics obtained for the boundary models.

	8 °C			12 °C			16 °C		
	2 log cfu/mL	3 log cfu/mL	4 log cfu/mL	2 log cfu/mL	3 log cfu/mL	4 log cfu/mL	2 log cfu/mL	3 log cfu/mL	4 log cfu/mL
HL ^a	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
c (%) ^b	96.7	99.7	100	96.7	97.8	98.3	99.7	100	100
FP (%) ^c	3.3	0.3	0	3.3	1.2	1.7	0.3	0	0
FN (%) ^d	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R ²	0.979	0.993	0.999	0.968	0.968	0.975	0.993	1.000	1.000

^a Hosmer–Lemeshow statistic.

^b Percentage of cases correctly classified.

^c False positive cases.

^d False negative cases.

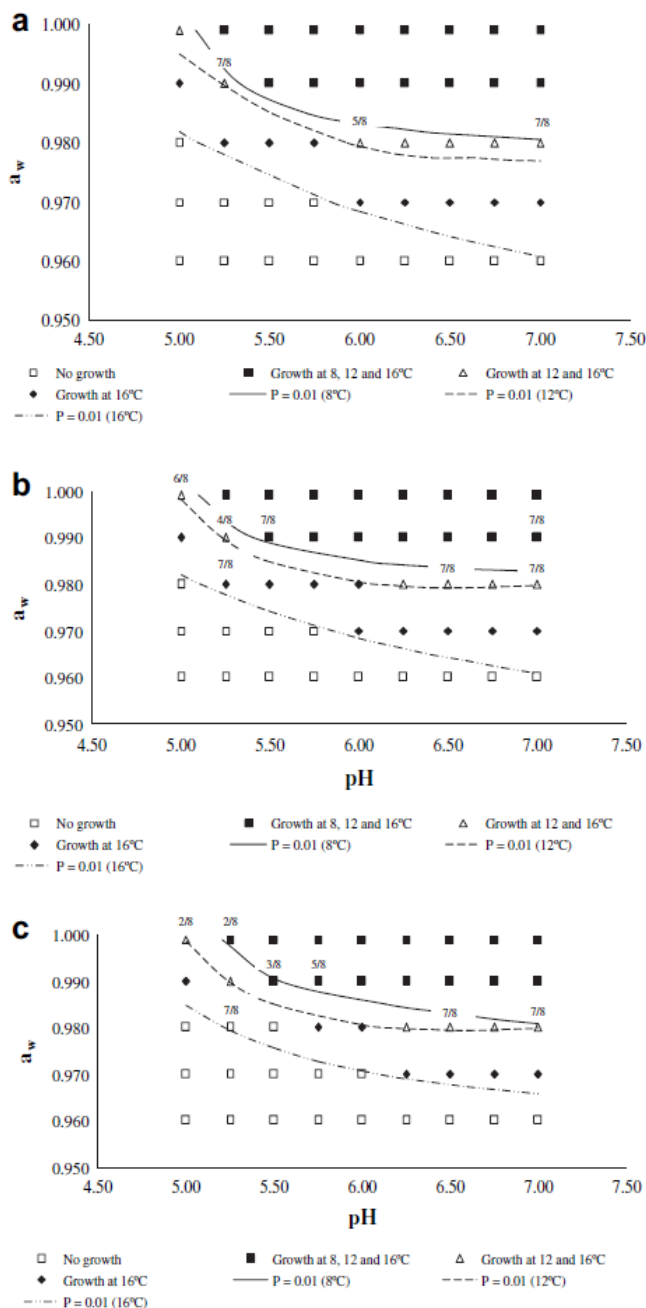


Fig. 1. Comparison of observed responses and predicted growth/no growth interfaces at 8, 12 and 16 °C for the three inocula levels studied: (a) 2 log cfu/mL, (b) 3 log cfu/mL and (c) 4 log cfu/mL. The cut-off probability of the models was fixed at 0.01.

total conditions studied. In the rest of conditions all replicates showed either growth or no growth. Similar percentages were obtained by Skandamis et al. (2007); (2.5–4.3%) or by McKellar et al. (2002); (3.1%).

Inoculum size substantially affected the minimal pH allowing growth, as can be observed in Fig. 2. At 8 °C; a_w 0.990 (Fig. 2a), it can be noted that the higher the inoculum size, the lower the minimal pH allowing growth (minimal pH of 5.33 and 5.54 for inoculum levels of 4 and 2 log cfu/mL respectively). At 12 °C; a_w 0.980 and 16 °C; a_w 0.970, the minimal pH allowing growth was higher for all inoculum levels than at 8 °C, with Fig. 2b and c showing a shift in the curves. At 12 °C; a_w 0.980, similar minimal pH was identified at inoculum levels of 2 and 3 log cfu/mL, while at 16 °C; a_w 0.970, the minimal pH was identical at inoculum levels of 3 and 4 log cfu/mL. Because of the general similar location of curves along the x-axis in Fig. 2b and c in comparison with Fig. 2a, it can be concluded that temperature and a_w effect was stronger in the range 8–12 °C, than in the range 12–16 °C, as equal a_w differences (0.01 difference) were presented between Fig. 2a–c.

Besides in Fig. 2b, it can be observed a slight difference in growth limits between 2 and 3 log cfu/mL, while at 16 °C, higher inoculum levels (3–4 log cfu/mL) presented negligible differences, being those sufficiently explained by the same boundary model. These results support the findings of Skandamis et al. (2007) who modelled the effect of inoculum level on growth interface of *E. coli* O157:H7. They concluded that at high inoculum levels the inhibitory intensity of additional environmental factors applied should be higher at mild growth conditions, which could be explained by the

Table 5
Environmental conditions where a binary response (both growth and no growth) was observed.

T °C	IL ^a	pH	a_w	No. replicates grown
12	4	7.00	0.980	7/8
12	4	6.00	0.980	5/8
12	4	5.25	0.990	7/8
8	3	7.00	0.990	7/8
8	3	5.50	0.990	7/8
12	3	7.00	0.980	7/8
12	3	6.50	0.980	7/8
12	3	5.25	0.990	4/8
12	3	5.00	0.999	6/8
16	3	5.25	0.980	7/8
8	2	5.75	0.990	5/8
8	2	5.50	0.990	3/8
8	2	5.25	0.999	2/8
12	2	7.00	0.980	7/8
12	2	6.50	0.980	7/8
12	2	5.00	0.999	2/8
16	2	5.25	0.980	7/8

^a Inoculum level (log cfu/mL).

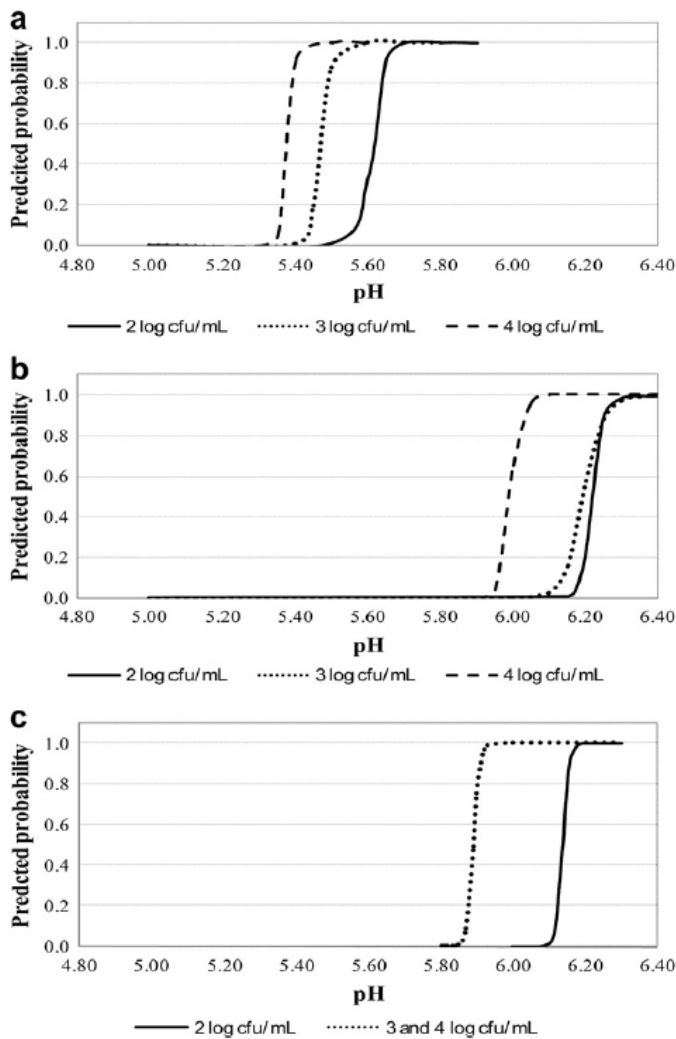


Fig. 2. Predicted probabilities against pH obtained from the growth/no growth models at 2, 3 and 4 log cfu/mL. (a) 8 °C; a_w 0.990; (b) 12 °C; a_w 0.980; (c) 16 °C; a_w 0.970.

fact that at high inoculum levels, there will be more probability of finding cells in the proper physiological state to initiate growth (Baranyi, 1998). Indeed, our observed data with inoculum levels of 3 and 4 log cfu/mL at 16 °C, showed a very similar behaviour of the *E. coli* serotypes studied, as mentioned above. This similar behaviour could be due to the enhancement of the 'ready-to-grow' capacity of the media used to develop the model, i.e., culture media, instead of food matrix. Furthermore, the magnitude of the inoculum levels tested (2–4 log cfu/mL) was narrow in comparison to other published studies, what produced minor differences among the different inocula.

3.2.4. Comparison with published independent data

The results of the comparison of our growth/no growth models with independent data are summarized in Table 6. It can be seen that in most of cases (26/30), predictions matched with observations in both culture media and food matrices. In 3 out of 4 cases, predictions given by the growth/no growth models were fail-safe, i.e. they predicted growth ($P > 0.01$) when no growth was observed, and only in one case (sliced cooked ham) the logistic models predicted no growth when growth was observed. These model predictions should be used with caution when evaluating its performance through the comparison with other studies.

Difficulties in comparing our results are attributed to differences in the serotype used (most of collected results belong to *E. coli* O157:H7, or to mixed VTEC serotypes), the inoculum levels tested (which are generally lower than other published studies) and the presence of additional environmental factors. Also microbial growth in a food matrix is assumed to be slower than in culture medium (Te Giffel and Zwietering, 1999), thus producing conservative estimations in some cases. Even so, the logistic models performed in our study showed a good agreement with the observed results suggesting their potential applicability in a food safety management process.

3.3. Effect of environmental factors on values of t_d at the different inoculum levels

The kinetic behaviour of the selected serotype of *E. coli* was quantified by means of the t_d in the conditions resulted in growth. Values of t_d were calculated through establishing a detection limit; it was the increase of absorbance that just produced a detectable level of turbidity. Overall, the values of t_d were higher at low levels of temperature, pH and a_w . Fig. 3 represents t_d (h) against pH at 8, 12 and 16 °C (3 log cfu/mL; a_w 0.999). At 16 °C the influence of pH was lower in the range 7.00–5.25 (t_d fluctuated from 32.20 to 45.57 h respectively) than in the pH range 5.25–5.00, where the t_d increased up to 75.52 h. A significant increase of the t_d was also obtained at 12 °C from pH 5.50 to pH 5.00 (118.26–375.19 h) and at 8 °C, from pH 5.75 to pH 5.25 (231.12–327.92 h). It can be also seen in Fig. 3 that the global variability of t_d increased at 8 °C and 12 °C at low pH.

It should be also highlighted that the increase of t_d was markedly influenced by the inoculum level used at harsher conditions. For example, at 8 °C (pH 5.50) the decrease of a_w from 0.999 to 0.990 resulted in an increase of t_d in 8,533 h (4 log cfu/mL), 52,599 h (3 log cfu/mL) and 85,575 h (2 log cfu/mL). Bidlas et al. (2008) studied the effect of inoculum size on the t_d for strain *E. coli* ATCC 25922. Their results showed that a shift from pH 6.50 to 4.83 resulted in an increase of t_d by a factor of 2.5 (5.4 log cfu/mL), while at low inoculum levels (3.6 log cfu/mL), this ratio increased up to 4.06. According to our results, at 8 °C; a_w 0.990 t_d greatly increased at levels of pH below 5.75. Nevertheless, a slight increase was noted from pH 6.50 to pH 7.00 at the three inocula level studied which suggests that the optimum pH for growth of *E. coli* can be situated in the range 6.50–6.75.

Results obtained indicated that the values of t_d largely increased near the growth/no growth region. For instance at 12 °C (4 log cfu/mL; pH 7.00) the transition from a_w 0.990 to 0.980 involved an increase in the t_d from 70.568 to 199.57 h. This latter condition was presented in Table 5, in which replicates showed a binary response (growth and no growth). The same result occurred at 12 °C (4 log cfu/mL; pH 6.00) in the transition of a_w from 0.990 to 0.980, where the t_d increased from 71.603 to 341.463 h. These results are in line with those obtained in other studies. Vermeulen et al. (2007) studied the influence of environmental conditions on the growth of *Listeria monocytogenes*. They concluded that at each a_w there was an increase in t_d as pH decreased. On the contrary, at high a_w values, there was not an abrupt increase at any pH, which corresponded with the higher growth probabilities. Buchanan et al. (1993) suggested that the inoculum level did not influence the values of growth parameters at optimal conditions. In addition, in our study, at 16 °C (pH 7.00; a_w 0.999), the t_d remained between 29.16 and 36.48 h indicating that the inoculum level had little effect on the t_d at favourable conditions for growth.

The increase in the values of t_d at limiting conditions is also related to its high variability associated, which becomes higher at low inoculum levels. This is probably because the longer variation

Table 6
Comparison of growth responses of *E. coli* from the growth/no growth models and from published studies in culture media and food matrices.

Source	Serotype	T (°C)	pH	a_w	Salt (%)	IL ^f	Experimental matrix	Growth	Growth (P _{pred}) ^h
FSA ^a	O157:H7	8	7.0	0.997	0.5	6	Culture medium	Yes	Yes ⁱ
FSA	O157:H7	8	7.0	0.977	4.0	6	Culture medium	No	No
USDA-ARS ^b	O157:H7	8	6.0	0.989	2.0	6	Culture medium	Yes	Yes
USDA-ARS	O157:H7	8	5.5	0.971	5.0	—	Culture medium	No	No
USDA-ARS	O157:H7	8	6.5	0.971	5.0	—	Culture medium	No	No
Le Marc et al., 2005	—	8	5.0	0.970	—	—	Data from Combase ^g	No	No
Salter et al., 2000	Mixed VTEC ^e	8	7.0	0.997	—	—	Culture medium	Yes	Yes
FSA	Mixed VTEC	8	6.8	0.970	—	—	Chocolate souffle	No	No
Bredholt et al., 1999	O157:H7	8	6.0	0.970	2.5–3	2–3	Sliced cooked ham	Yes	No
FSA	Mixed VTEC	8	6.2	0.999	—	—	Crispy salad	No	Yes
Buchanan and Bagi, 1994	O157:H7	12	5.5	0.980	3.5	5.2	Culture medium	No	No
Buchanan and Bagi, 1997	O157:H7	12	6.5	0.978	—	5.2	Culture medium	Yes	Yes
Kauppi et al., 1996	O157:H7	12	6.7	0.986	—	—	Milk	Yes	Yes
FSA	Mixed VTEC	12	6.7	0.993	1.3	—	Brie cheese	Yes	Yes
Symprevius ^c	—	12	5.9	0.994	1.1	7	Cheese	No	Yes
USDA-ARS	O157:H7	12	6.5	0.971	5.0	—	Culture medium	No	No
USDA-ARS	O157:H7	12	6.0	0.990	2.0	—	Culture medium	Yes	Yes
FSA	Mixed VTEC	12	5.7	0.980	1.1	—	Fresh puff pastry	No	No
Le Marc et al., 2005	—	12	5.5	0.965	—	—	Data from Combase	No	No
FSA	Mixed VTEC	12	6.2	0.999	—	—	Crispy salad	Yes	Yes
AFSCE ^d	R31	16	7.0	0.997	—	—	Culture medium	Yes	Yes
FSA	O157:H7	16	5.8	0.969	—	—	Sandwich filling	No	No
FSA	O157:H7	16	6.3	0.996	—	—	Sandwich filling	Yes	Yes
FSA	O157:H7	16	5.4	0.997	—	—	Sandwich filling	Yes	Yes
FSA	O157:H7	16	6.1	0.971	—	—	Sandwich filling	Yes	Yes
FSA	O157:H7	16	5.8	0.984	—	—	Sandwich filling	Yes	Yes
Kasrazadeh and Genigeorgis, 1995	O157:H7	16	6.5	0.970	0.5	—	Milk	Yes	Yes
Kasrazadeh and Genigeorgis, 1995	O157:H7	16	6.0	0.970	0.5	—	Milk	No	Yes
Le Marc et al., 2005	—	16	5.3	0.965	—	—	Data from Combase	No	No
Le Marc et al., 2005	—	16	5.0	0.970	—	—	Data from Combase	No	No

^a Institute of Food Research (Norwich, UK).

^b United States Department of Agriculture.

^c Symprevius database (<http://www.symprevius.net/>).

^d Australian Food Safety Centre of Excellence (Tasmania, Australia).

^e Verotoxigenic *E. coli*.

^f Inoculum level (log cfu/mL or g).

^g Combase database (<http://www.combase.cc/>).

^h Predicted probabilities of the growth/no growth models at the three inoculum levels studied (2, 3 and 4 log cfu/mL).

ⁱ Growth was considered if P_{pred} > 0.01.

in lag phases. This fact was reflected in the shape of distributions of the standard deviations of t_d at 8, 12 and 16 °C (Fig. 4). The histogram obtained at 8 °C was broader which meant that the variability was shifted to the right side of the graph (30% of the values were around 20). At 12 and 16 °C, the histograms were shifted to the left side, being the probabilities associated to low values of standard deviation of t_d . Indeed at 16 °C, more than 90% of the values of

standard deviation were below 4. The dependency of lag time on inoculum size is reported in other studies (Augustin et al., 2000; Robinson et al., 2001) being corroborated latterly by the deviation in the individual lag phase distributions performed at limiting conditions (Guillier et al., 2005; Métris et al., 2006). In our study, we confirmed that the mean values of the t_d and their variability associated specially increased at bordering the growth/no growth interface estimated from the logistic regression models.

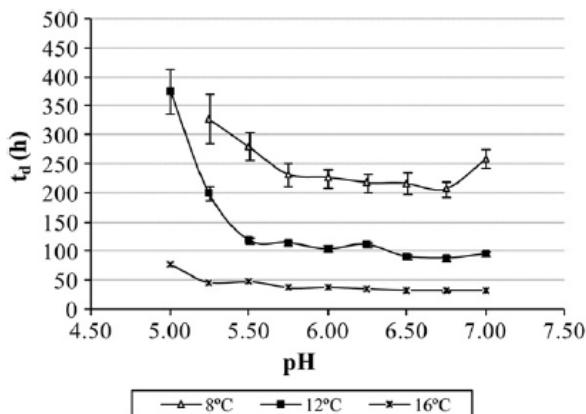


Fig. 3. Mean values and standard deviation of detection times (t_d , h) obtained at 8, 12 and 16 °C as a function of pH. Inoculum level = 3 log cfu/mL; a_w = 0.999.

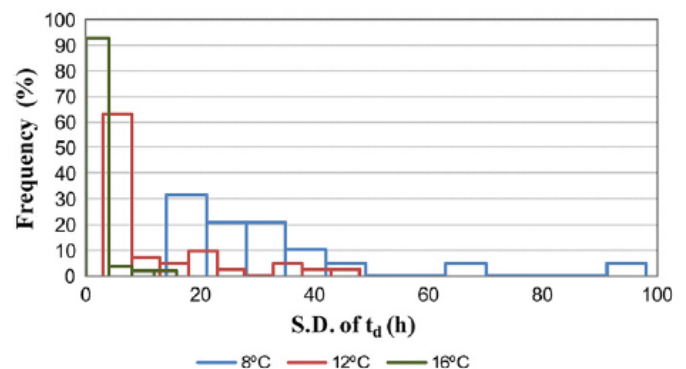


Fig. 4. Histograms representing the variability associated to values of t_d (h) as a function of temperature (8, 12 and 16 °C). S.D. = standard deviation.

3.4. Potential applications of the results obtained in food industries

Alternative industrial applications of the results presented in this study (i.e. screening of *E. coli*, followed by the determination of growth limits and subsequent growth kinetics of a selected serotype), can be clearly of great interest for catering food services of chilled minimally processed foods (i.e. mayonnaise-based deli salads, cooked meat products) that can be contaminated with *E. coli* if handling procedures, processing treatments and storage conditions are not appropriate. This is particularly relevant regarding the food safety in hospitals and other healthcare settings, where *E. coli* has been recognized as a microbiological hazard in these types of food (Lund and O'Brien, 2009). Mattick et al. (2003) have demonstrated that cross-contamination events can occur through food contact surfaces in foodservice kitchens if processing conditions are properly controlled. Indeed, chilled minimally processed foods are often prepared in advance before consumption and then left out at ambient temperature before distribution, which would allow for bacterial growth (Rosset et al., 2004). Finally, abuse duration of refrigerated storage time is a common practice followed in school-lunch facilities and other catering establishments (Gallay, 2002). The predictions obtained by the logistic regression models together with t_d data at different environmental conditions, allow to determine the influence of various contamination levels of *E. coli* on both probability of growth and subsequent growth kinetics at 8 °C (refrigeration temperature), 12 and 16 °C (temperatures commonly found during distribution of chilled processed foods in catering services). The results found in this study have shown that the initial level of *E. coli* did not exert a great influence in the growth ability (since a narrow shift in growth/no growth interface was obtained) but in the growth extent, especially at limiting environmental conditions. It was demonstrated that the values of t_d largely varied at 8 °C (pH 5.50; a_w 0.990) between 4 (263.88 h), 3 (332.15 h) and 2 log cfu/mL (380.00 h). Therefore, high contamination levels of *E. coli* clearly determine that its growth will occur in a shorter time, by what appropriate cleaning and disinfection treatments should be applied in order to guarantee the microbiological safety of the final products.

4. Conclusions

In this study, substantial differences were observed among the *E. coli* serotypes tested at both inoculum levels (4 and 2 log cfu/mL), given the disparity of the obtained values for absorbance parameters. Because the O158:H23 serotype presented faster growth than the others, it was selected to develop the boundary models.

The logistic regression models sufficiently explained the observed data, providing a good adjustment in all cases. The shift of the cut off point to 0.01 originated a model with safer and more realistic estimations of growth of *E. coli* from an industrial/food safety point of view. Regarding values of t_d , they were higher when the inoculum level was lower. Likewise, it was confirmed an increase of the variability associated to these values at low temperatures, pH, and a_w . On the other hand, the inoculum level produced a slight shift in the growth interface, as confirmed by other studies. Given that foods contaminated usually present low *E. coli* concentration, moderate levels of pH and a_w are sufficient to inhibit its growth. In our study it was shown that this effect was enhanced by applying refrigeration temperatures (8 °C). However, it was also highlighted the importance to know the growth ability of *E. coli* serotypes at higher inoculum levels when poor microbiological quality of raw materials and/or improper handling and processing conditions are presented. The developed models presented here may be viewed as tools that provide growth data of different *E. coli* serotypes combined with an estimation of the

growth/no growth interface and subsequent growth kinetics at various environmental conditions which may be valuable to be included in a risk assessment framework.

Acknowledgments

This work was partly financed by the AGR-01879 Excellence Project (Andalusia Government) and the AGR-170 Research Group, HIBRO, of 'Plan Andaluz de Investigación, Desarrollo e Innovación' (PAIDI) and by European ERDF funding.

References

- Augustin, J.C., Brouillaud-Delattre, A., Rosso, L., Carlier, V., 2000. Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1706–1710.
- Augustin, J.C., Rosso, L., Carlier, V., 1999. Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements. *J. Microbiol. Methods* 38, 137–146.
- Baranyi, J., 1998. Comparison of stochastic and deterministic concepts of bacterial lag. *J. Theor. Bacteriol.* 192, 403–408.
- Baranyi, J., Roberts, T.A., 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 3–4.
- Baty, F., Flandrois, J.P., Delignette-Muller, M.L., 2002. Modelling the lag time of *Listeria monocytogenes* from viable count enumeration and optical density data. *Appl. Env. Microbiol.* 68, 5816–5825.
- Bharathi, S., Ramesh, M.N., Varadaraj, M.C., 2001. Predicting the behavioral pattern of *Escherichia coli* in minimally processed vegetables. *Food Control* 12, 275–284.
- Bidlas, E., Du, T., Lambert, R.J.W., 2008. An explanation for the effect of inoculum size on MIC and the growth/no growth interface. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 140–152.
- Blanco, M., Padola, N.L., Kruger, A., Sanz, M.E., Blanco, J.E., Gonzalez, E.A., Dahbi, G., Mora, A., Bernardez, M.L., Etcheverria, A.I., Arroyo, G.H., Lucchesi, P.M., Parma, A.E., Blanco, J., 2004. Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *Int. Microbiol.* 7 (4), 269–276.
- Bredholt, S., Nesbakken, T., Holck, A., 1999. Protective cultures inhibit growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in cooked, sliced, vacuum- and gas-packaged meat. *Int. J. Food Microbiol.* 53, 43–52.
- Buchanan, R.L., Bagi, L.K., 1994. Expansion of response surface models for the growth of *Escherichia coli* O157:H7 to include sodium nitrite as a variable. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 317–332.
- Buchanan, R.L., Bagi, L.K., 1997. Effect of water activity and humectants identity on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.* 14, 413–423.
- Buchanan, R.L., Bagi, L.K., Goins, R.V., Phillips, J.G., 1993. Response surface models for the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.* 10, 303–315.
- Carney, E., O'Brien, S.B., Sheridan, J.J., McDowell, D.A., Blair, I.S., Duffy, G., 2006. Prevalence and level of *Escherichia coli* O157 on beef trimmings, carcasses and boned head meat at a beef slaughter plant. *Food Microbiol.* 23 (1), 52–59.
- Chu, P., Hemphill, R.R., 2004. Acquired hemolytic anemia. In: Tintinalli, J.E., Kelen, G.D., Stacpzyński Emergency Medicine, J.S. (Eds.), *A Comprehensive Study Guide*, sixth ed. McGraw-Hill, New York, NY, ISBN 0-07-138875-3.
- Coleman, M.E., Tamplin, M.L., Phillips, J.G., Marmer, B.S., 2003. Influence of agitation, inoculum density, pH and strain on the growth parameters of *Escherichia coli* O157:H7-relevance to risk assessment. *Int. J. Food Microbiol.* 83, 147–160.
- Dalgaard, P., Koutsoumanis, K., 2001. Comparison of maximum specific growth rate and lag times estimated from absorbance and cell count data by different mathematical models. *J. Microbiol. Methods* 43, 183–196.
- Dalgaard, P., Ross, T., Kamperman, L., Neumeyer, K., McMeekin, T.A., 1994. Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and cell count data. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 391–404.
- EFSA, 2006. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2005. *EFSA J.* 94, 1–288.
- EFSA, 2009. The community summary report on food-borne outbreaks in the European union in 2007. *EFSA J.* 271, 1–102.
- Francois, K., Devlieghere, F., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Cools, I., Van Impe, J.F., Debevere, J., 2005. Environmental factors influence the relation between optical density and cell count for *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* 99, 1503–1515.
- Frenzen, P.D., Drake, A., Angulo, F.J., 2005. Economic cost of illness due to *Escherichia coli* O157 infections in the United States. *J. Food Prot.* 68, 2623–2630.
- Gallay, A., 2002. Toxines microbiennes dans les toxi-infections alimentaires collectives déclarées en France. In: Congress of the French Society of Microbiology, November 2002, Paris.
- Gill, C.O., Badoni, M., Jones, T.H., 2007. Behaviours of log phase cultures of eight strains of *Escherichia coli* incubated at temperatures of 2, 6, 8 and 10 °C. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 200–206.
- Guillier, L., Pardon, P., Augustin, J.C., 2005. Influence of stress on individual lag time distributions of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2940–2948.

- ISO, 2006. ISO TS 19036 Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Guidelines for the Estimation of Measurement Uncertainty for Quantitative Determinations.
- Kasrazadeh, M., Genigeorgis, C., 1995. Potential growth and control of *Escherichia coli* O157:H7 in soft Hispanic type cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 25, 289–300.
- Kauppi, K.L., Tatini, S.R., Harrell, F., Feng, P., 1996. Influence of substrate and low temperature on growth and survival of verotoxigenic *Escherichia coli*. *Food Microbiol.* 13, 397–405.
- Koutsoumanis, K., Sofos, J.N., 2005. Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and a_w limits for growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 104, 83–91.
- Krist, K.A., Ross, T., McMeekin, T.A., 1998. Final optical density and growth rate: effects of temperature and NaCl differ from acidity. *Int. J. Food Microbiol.* 43, 195–203.
- Le Marc, Y., Pin, C., Baranyi, J., 2005. Methods to determine the growth domain in a multidimensional environmental space. *Int. J. Food Microbiol.* 100, 3–12.
- Lund, B.M., O'Brien, S.J., 2009. Microbiological safety of food in hospitals and other healthcare settings. *J. Hospit. Infect.* 73, 109–120.
- Masana, M.O., Baranyi, J., 2000. Growth/no growth interface of *Brochothrix thermosphacta* as a function of pH and water activity. *Food Microbiol.* 17 (5), 485–493.
- Mattick, K., Durham, K., Domingue, G., Jørgensen, F., Sen, M., Schaffner, D., Humphrey, T., 2003. The survival of foodborne pathogens during domestic washing-up and subsequent transfer onto washing-up sponges, kitchen surfaces and food. *Int. J. Food Microbiol.* 85, 213–226.
- McKellar, R.C., Lu, X., Delaquis, P.J., 2002. A probability model describing the interface between survival and death of *Escherichia coli* O157:H7 in a mayonnaise model system. *Food Microbiol.* 19, 239–247.
- Métris, A., George, S.M., Baranyi, J., 2006. Use of optical density detection times to assess the effect of acetic acid on single-cell kinetics. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6674–6679.
- Palumbo, S.A., Call, J.E., Schultz, F.J., Williams, A.C., 1995. Minimum and maximum temperatures for growth and verotoxin production by hemorrhagic strains of *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* 58 (4), 352–356.
- Pelayo, J., Scaletsky, I., Smith, H.R., 1999. Virulence properties of atypical EPEC strain. *J. Clin. Microbiol.* 48, 41–49.
- Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Todd, E.C.D., Carrasco, E., García-Gimeno, R.M., Zurera, G., 2007. Modeling transfer of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* during slicing of a cooked meat product. *Meat Sci.* 76, 692–699.
- Possé, B., De Zutter, L.D., Heyndrickx, M., Herman, L., 2007. Metabolic and genetic profiling of clinical O157 and non-O157 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* 158 (7), 591–599.
- Presser, K.A., Ross, T., Ratkowsky, D.A., 1998. Modelling the growth limits (growth/no growth interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature, pH, lactic acid concentration and water activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1773–1779.
- Robinson, T.P., Aboaba, O.O., Kaloty, A., Ocio, M.J., Baranyi, J., Mackey, B.M., 2001. The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 70, 163–173.
- Rosset, P., Cornu, M., Noël, V., Morelli, E., Poumeyrol, G., 2004. Time–temperature profiles of chilled ready-to-eat foods in school catering and probabilistic analysis of *Listeria monocytogenes* growth. *Int. J. Food Microbiol.* 96, 49–59.
- Rowe, B., Gross, R.J., Lindop, R., Baird, R.B., 1974. A new *Escherichia coli* O group O158 associated with an outbreak of infantile enteritis. *J. Clin. Pathol.* 27, 832–833.
- Salter, M.A., Ratkowsky, D.A., Ross, T., McMeekin, T.A., 2000. Modelling the combined temperature and salt (NaCl) limits for growth of a pathogenic *Escherichia coli* strain using nonlinear logistic regression. *Int. J. Food Microbiol.* 61, 159–167.
- Samelis, J., Sofos, J.N., 2003. Strategies to control stress-adapted pathogens and provide safe foods. In: Yousef, A.E., Juneja, V.K. (Eds.), *Microbial Adaptation to Stress and Safety of New-generation Foods*. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, pp. 303–351.
- Scavia, G., Botta, A., Ciofi, degli Atti, M.L., Di Fluri, G., Ferretti, A., Galero, G., Marziano, M.L., Merla, R., Minelli, F., Montini, G., Pecoraio, C., Pizzuti, R., Tozzi, A.E., Trani, A.M., Caprioli, A., 2005. Episodio epidemico di sindrome emolitico uremica (SEU) associata a infezione da *Escherichia coli* O26, in provincia di Salerno. Available from: <http://www.epicentro.iss.it/problemi/seu/seu.asp>.
- Sivapalasingam, S., Friedman, C.R., Cohen, L., Tauxe, R.V., 2004. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *J. Food Prot.* 67, 2342–2353.
- Skandamis, P.N., Stopforth, J.D., Kendall, P.A., Belk, K.E., Scanga, J.A., Smith, G.C., Sofos, J.N., 2007. Modeling the effect of inoculum size and acid adaptation on growth/no growth interface of *Escherichia coli* O157:H7. *Int. J. Food Microbiol.* 120, 237–249.
- Solomon, E.B., Yaron, S., Matthews, K.R., 2002. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 397–400.
- Stopforth, J.D., Skandamis, P.N., Geornaras, I., Sofos, J.N., 2007. Acid tolerance of acid-adapted and non acid-adapted *Escherichia coli* O157:H7 strains in beef decontamination runoff fluids or on beef tissue. *Food Microbiol.* 24 (5), 530–538.
- Strachan, N.J.C., MacRae, M., Ogden, I.D., 2005. Quantifying the *Escherichia coli* O157 reservoir in Grampian, Scotland. *Vet. Rec.* 156, 282–283.
- Te Giffel, M.C., Zwietering, M.H., 1999. Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 46, 135–149.
- Valero, A., Pérez-Rodríguez, F., Carrasco, E., García-Gimeno, R.M., Zurera, G., 2006. Modelling the growth rate of *Listeria monocytogenes* using absorbance measurements and calibration curves. *J. Food Sci.* 71, M257–M264.
- Vermeulen, A., Gysemans, K.P.M., Bernaerts, K., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., Debevere, J., Devlieghere, F., 2007. Influence of pH, water activity and acetic acid concentration on *Listeria monocytogenes* at 7°C: data collection for the development of a growth/no growth model. *Int. J. Food Microbiol.* 114, 332–341.
- Whiting, R.C., Golden, M.H., 2002. Variation among *Escherichia coli* O157:H7 strains relative to their growth, survival, thermal inactivation, and toxin production in broth. *Int. J. Food Microbiol.* 75, 127–133.

PUBLICACIÓN 5

PUBLICACIÓN 5: DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA BASADA EN EL RIESGO PARA LA ESTIMACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA Y CRECIMIENTO DE *ESCHERICHIA COLI* EN LECHUGA ICEBERG SERVIDA EN ESTABLECIMIENTOS DE RESTAURACIÓN COLECTIVA BAJO UN LIMITADO ALMACENAMIENTO

DEVELOPMENT OF A RISK-BASED METHODOLOGY FOR ESTIMATING SURVIVAL AND GROWTH OF ENTEROPATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* ON ICEBERG-LETTUCE EXPOSED AT SHORT-TERM STORAGE IN FOODSERVICE CENTERS

PUBLICACIÓN 5: DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA BASADA EN EL RIESGO PARA LA ESTIMACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA Y CRECIMIENTO DE *ESCHERICHIA COLI* EN LECHUGA ICEBERG SERVIDA EN ESTABLECIMIENTOS DE RESTAURACIÓN COLECTIVA BAJO UN LIMITADO ALMACENAMIENTO

RESUMEN

El presente estudio se realizó como continuidad de la Publicación 4 y valoró el comportamiento de la cepa de *E. coli* O158:H23 en lechuga iceberg bajo determinadas condiciones mediambientales, mediante el uso de métodos alternativos de estimación. Así, el presente estudio se desarrolló con el objeto de evaluar el crecimiento de la cepa de *E. coli* O158:H23 en lechuga iceberg expuesta a cortos períodos de almacenamiento a través de la estimación del incremento logarítmico (\log_{diff}) a diferentes niveles de contaminación; estimar el comportamiento de la cepa a Temperaturas estáticas mediante la aplicación de modelos predictivos; y estimar la variabilidad del crecimiento potencial de la cepa bajo los perfiles dinámicos de t/T de almacenamiento, procesado y distribución hallados en los servicios de restauración de comedores escolares, centros geriátricos y hospitales mediante el método de simulación MonteCarlo.

MATERIAL Y MÉTODOS

CEPA BACTERIANA Y CONDICIONES DE CULTIVO

La cepa de *E. coli* O158:H23 (NCTC 10974) fue seleccionada dentro de un grupo de cepas patogénicas, por ser más resistente a condiciones severas para el crecimiento, tal y como se describió en la Publicación 4. Se utilizó un cultivo liofilizado de *E. coli* O158:H23 (NCTC 10974) facilitado por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Burjassot, Valencia, España). El cultivo se rehidrató siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para el cultivo de la cepa se utilizó el caldo de Triptona Soja (TSB, Oxoid) y el Agar Triptona Bilis-X Glucuronido (TBX, Oxoid) como medio selectivo para el recuento microbiano. Tres días antes del experimento, la cepa se cultivó en 9ml de TSB e incubó a 37°C/24h. Posteriormente, se realizó un segundo pase de la cepa transfiriéndose 0,1ml a un tubo de 9ml de TSB, incubándose de nuevo a 37°C/24h. Al final de este periodo, el cultivo se incubó en frascos con 50ml de TSB a 37°C/18h, de modo que el microorganismo alcanzó la fase estacionaria temprana.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el desarrollo del estudio se utilizaron bolsas de 200g de lechuga iceberg. Se planificaron tres niveles de contaminación inicial (4,5, 3,5 y 2,5 log ufc/g) y el crecimiento se evaluó por un periodo de 6h que a su vez se dividió en 6 intervalos de análisis (30, 60, 90, 120, 180 y 360min) en los que se tomaron 2 muestras de lechuga inoculadas con un peso de 10g y se sembraron por triplicado en TBX, incubándose a 44°C/18–24h. Los experimentos se llevaron a cabo a 5 Temperaturas de incubación (8, 12, 16, 20 y 24°C).

INOCULACIÓN DE LA CEPA DE *E. COLI* O158:H23 EN LECHUGA ICEBERG LISTA PARA EL CONSUMO

Una vez que la cepa alcanzó su fase estacionaria en 50ml de TSB, se tomó 1 ml del cultivo y se realizaron diluciones seriadas en solución salina fisiológica (0,85%) para finalmente inocular los 10g de lechuga con 100µl de inóculo que se distribuyeron al azar por toda la superficie de la muestra. La lechuga inoculada se almacenó bajo condiciones de aerobiosis a las Temperaturas planificadas. Las Temperaturas se monitorizaron mediante un data logger (Fourier MicroLogPRO–EC700, US) equipado con un sensor externo (DT132) (rango: -50–100°C) y los registros se procesaron mediante el programa de Excel Microlab 3.6.2 (Microsoft Corporation). La Temperatura interna del alimento se tomó mediante la inserción del sensor en una bolsa de lechuga control.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

El análisis microbiológico de las muestras control (no inoculadas) y las muestras inoculadas se efectuó de acuerdo a la norma ISO 16649-2, 2001.

RECOPIACIÓN DE DATOS DE T/T EN ESTABLECIMIENTOS DE RESTAURACIÓN COLECTIVA

Los datos de t/T fueron recogidos por el personal técnico de cada centro (8 comedores, 6 geriátricos y 5 hospitales). Las mediciones se realizaron mediante la inserción de un termómetro equipado con una sonda especial (HI 95809-1, Hanna Instruments, Woonsocket, UK) en las ensaladas de lechuga. Se estableció un tiempo máximo de 6h (desde el procesado hasta la distribución del alimento) y se tomaron diariamente tres parejas de datos de t/T por centro, generando 30, 40 y 48 parejas de datos respectivamente para un total de 240 mediciones.

Los datos de t/T se tomaron de tres etapas fundamentales:

1. Refrigeración de la materia prima;
2. Almacenamiento en cámaras frigoríficas del alimento procesado;
3. Distribución.

PROCESADO DE DATOS Y DESARROLLO DE LOS MODELOS PREDICTIVOS

Se calcularon los valores de incremento logarítmico (\log_{diff}) a cada una de las condiciones de Temperatura mediante la Ecuación 1 del artículo publicado.

Se desarrolló un Modelo de Regresión Polinomial para cada nivel de inóculo (4,5; 3,5 y 2,5) con el objeto de describir la relación entre los valores de \log_{diff} y la Temperatura; y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis permitió evaluar las diferencias significativas entre los valores de \log_{diff} para cada Temperatura (Ecuación 2, del artículo publicado).

Para la estimación del crecimiento potencial de *E. coli* bajo las condiciones de t/T recopiladas de cada uno de los centros, se calculó un término denominado tiempo-Temperatura Equivalente (TTE) aplicado por Rosset y col. (2004). A partir de los datos de t/T recopilados se calculó la Temperatura estática efectiva (T_{eff}) para cada perfil dinámico de t/T. Una vez calculado el parámetro, con ayuda de los modelos de Regresión desarrollados se calculó el \log_{diff} mediante la utilización de T_{eff} en la Ecuación 2 del artículo publicado. Los valores calculados de T_{eff} se integraron posteriormente dentro del modelo Secundario de Raíz Cuadrada validado por Koseki e Isobe (2005) en lechuga iceberg para así poder estimar el crecimiento de *E. coli* bajo las condiciones dinámicas de t/T.

MODELO ESTOCÁSTICO

Los datos de t/T fueron ajustados a varias distribuciones estadísticas mediante el software ModelRisk v 4.3 (Vose Consulting, Bélgica) combinando la información obtenida y los datos procedentes de expertos. La bondad de ajuste de estos datos se evaluó usando el criterio de información de Akaike (AIC), donde un valor negativo alto de AIC indica un mejor ajuste de datos.

Se utilizó una distribución normal para describir los datos de Temperatura, mientras que las distribuciones uniformes, triangulares y exponenciales se ajustaron a los valores de tiempo obtenidos. Las distribuciones mejor ajustadas describieron las condiciones de mantenimiento de las ensaladas de lechuga durante el

almacenamiento, procesado y distribución y se usaron como variables de entrada del modelo de simulación. La variable de salida del modelo, \log_{diff} , se calculó mediante el método de simulación MonteCarlo (10,000 iteraciones) usando el software Model Risk v4.3.

RESULTADOS

CRECIMIENTO DE *E. COLI* O158:H23 EN LECHUGA ICEBERG LISTA PARA EL CONSUMO A TEMPERATURAS ESTÁTICAS

Como era de esperar, el crecimiento de *E. coli* O158:H23 varió en función de la Temperatura de almacenamiento estudiada (Figura 1, artículo publicado).

Los resultados obtenidos a Temperaturas estáticas indicaron que el mantenimiento de la lechuga a 8°C redujo ligeramente el crecimiento de la población de *E. coli* (-0,4 a -0,5 log ufc/g) a partir de ~3h hasta el final del estudio, mientras que el crecimiento se observó a Temperaturas entre 12–24°C.

Las Temperaturas superiores a 16°C produjeron un incremento de la población de hasta 1 log ufc/g, incluso a partir de los niveles iniciales de contaminación más bajos. De hecho, a 24°C los niveles de contaminación ascendieron a $5,9 \pm 0,1$ log ufc/g (a nivel de inóculo inicial de 4,5 log ufc/g), $4,9 \pm 0,03$ (a nivel de inóculo inicial de 3,5 log ufc/g) y $3,4 \pm 0,04$ (a nivel de inóculo inicial de 2,5 log ufc/g). El modelo de Regresión Polinomial describió una buena correlación para los tres niveles de inóculo ($R^2 \geq 0,88$). Las ecuaciones generadas fueron utilizadas por el modelo de simulación para estimar \log_{diff} teniendo en cuenta los perfiles dinámicos obtenidos en los establecimientos de restauración colectiva estudiados

Los valores del \log_{diff} se compararon con las estimaciones obtenidas por los modelos Terciarios PMP y ComBase Predictor y las predicciones a 8, 12 y 16°C se aproximaron a las proporcionadas por dichos modelos; sin embargo, ComBase Predictor proporcionó estimaciones más conservadoras a 20 y 24°C ya que estimó un \log_{diff} de *E. coli* O158:H23 en lechuga iceberg de 0,5 log ufc/g superior al valor observado.

MODELO DE SIMULACIÓN: CRECIMIENTO DE *E. COLI* A DIFERENTES ESCENARIOS DE T/T EN LOS ESTABLECIMIENTOS DE SERVICIO DE ALIMENTOS

Los estadísticos descriptivos de t/T recogidos en los diferentes centros se presentan en la Tabla 3 del artículo publicado. Las Temperaturas promedio de almacenamiento variaron desde 4,5°C hasta >10°C en las cámaras frigoríficas de los hospitales y los

centros geriátricos estudiados. Por otro lado, los valores mínimos y máximos de Temperatura durante el procesado y distribución estuvieron entre 12,6 y 29°C.

Las distribuciones estadísticas para la T_{eff} obtenida de los diferentes centros (comedores escolares, centros geriátricos y hospitales) se representan en la Figura 3 del artículo publicado. Se pudo comprobar que los hospitales tuvieron un valor inferior de T_{eff} y de tiempo de distribución, de los platos de ensalada, en comparación con los centros geriátricos y comedores escolares.

Los resultados del modelo de simulación para los comedores escolares y centros geriátricos mostraron diferencias sustanciales entre los niveles de inóculo de *E. coli*. Las predicciones generadas para los comedores escolares dieron como resultado que no existió crecimiento de *E. coli* en el 47,8% de los casos con un nivel de inóculo de 4,5 log ufc/g, mientras que el porcentaje incrementó (75,6%) cuando se asumió un nivel de inóculo más bajo (3,5 log ufc/g). Para el caso de los centros geriátricos se comprobaron resultados similares, donde los porcentajes aumentaron a 32,2% y 62,3% bajo los niveles de contaminación inicial de 4,5 y 3,5 log ufc/g, respectivamente. En cambio, para los hospitales los porcentajes de no crecimiento superaron el 90% para los tres niveles de inóculo estudiados. No se estimó crecimiento en el 98% de los casos a un nivel más bajo (2,5 log ufc/g), lo cual indica la importancia de controlar la carga microbiana inicial de la materia prima en la fase de recepción.

Las distribuciones de probabilidad de log_{diff} para cada uno de los centros evaluados se representan en la Figura 4 del artículo publicado. Como se puede observar bajo un nivel de inóculo de 2,5 log ufc/g se produjo un sesgo hacia la izquierda de las distribuciones debido a que los valores obtenidos se acercaron más a 0. Para el caso de los hospitales y centros geriátricos existieron diferencias significativas entre los distintos niveles de inóculo estudiados ($p < 0,05$), pero no así para los comedores escolares ($p > 0,05$).



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmeth

Development of a risk-based methodology for estimating survival and growth of enteropathogenic *Escherichia coli* on iceberg-lettuce exposed at short-term storage in foodservice centers

M.Y. Rodríguez-Caturla, A. Valero*, R.M. García-Gimeno, G. Zurera

Department of Food Science and Technology, International Campus of Excellence in the AgriFood Sector ceiA3, University of Cordoba, Campus Rabanales s/n Edif. Charles Darwin, 14014 Cordoba, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 April 2012

Received in revised form 22 May 2012

Accepted 27 May 2012

Available online 5 June 2012

Keywords:

Foodservice centers

Non verotoxigenic *Escherichia coli*

Ready-to-eat

Iceberg-lettuce

Short-term storage

Risk-based model

ABSTRACT

Ready-to-eat lettuce is a food commodity prone to contamination by pathogenic microorganisms if processing and distribution conditions as well as handling practices are not effective. A challenge testing protocol was applied to ready-to-eat iceberg-lettuce samples by inoculating different initial contamination levels (4.5, 3.5 and 2.5 log cfu/g) of *Escherichia coli* strain (serotype O158:H23) subsequently stored at 8, 12, 16, 20 and 24 °C for 6 h. A polynomial regression model for log difference (\log_{diff}) was developed at each inoculum level studied through the calculation of the effective static temperature (T_{eff}). Furthermore, the developed model was integrated within a risk-based approach with real time/Temperature (t/T) data collected in three Spanish foodservice centers: school canteens, long-term care facilities (LTCF) and hospitals. Statistical distributions were fitted to t/T data and estimated \log_{diff} values were obtained as model outputs through a Monte Carlo simulation (10,000 iterations). The results obtained at static conditions indicated that the maintenance of the lettuce at 8 °C slightly reduced the *E. coli* population from -0.4 to -0.5 log cfu/g. However, if chill chain is not maintained, *E. coli* can grow up to 1.1 log cfu/g at temperatures above 16 °C, even at low contamination levels. Regarding \log_{diff} estimated in foodservice centers, very low risk was obtained ($\log_{diff} < 1.0$ log cfu in all cases). Mean T_{eff} values obtained in hospitals were the lowest ones (11.1 °C) and no growth of *E. coli* was predicted in >92% of simulated cases. The results presented in this study could serve food operators to set time/Temperature requirements for ready-to-eat foods in foodservice centers, providing a scientific basis through the use of predictive modeling. These findings may also serve to food safety managers to better define the control measures to be adopted in foodservice centers in order to prevent food-borne infections.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Escherichia coli is a potentially hazardous bacteria which may cause severe gastrointestinal illnesses in humans associated with contaminated foods (Kuhnert et al., 2000). Mainly, the enterohemorrhagic (EHEC) strain of *E. coli* O157:H7 has received special attention as emergent pathogen for their involvement in many illnesses around the world (Luo et al., 2000).

Enteropathogenic (EPEC) *E. coli* represents a major cause of infantile diarrhea world-wide (Bugarel et al., 2011), verifying a fatality rate of up to 30% (Senerwa et al., 1989). Among them, *E. coli* O158:H23 was responsible for infantile enteritis outbreaks in Europe (Rowe et al., 1974). In a recent study, Valero et al. (2010) found a better adaptability and a faster growth of *E. coli* O158:H23 at stringent conditions of pH, a_w and temperature than other serotypes such as O157:H7 and O59:H21. However, quantitative data relative to growth of this serotype and other non-O157 *E. coli* strains in food matrices are limited.

Leafy green vegetables are ready-to-eat foods widely demanded by its high nutritional value and are frequently eaten raw. However, they are prone to contamination because the current industrial sanitizing treatments do not guarantee the total elimination of the pathogen when present (Beuchat, 1996; Parish et al., 2003; Abadias et al., 2008, 2010). In addition, they are characterized by high water activity levels, which make them more vulnerable to cross-contamination. In Europe, several outbreaks caused by non-O157 strains have been reported (EFSA-ECDC, 2012), which represent for up to 50% (ECDC, 2011) being commonly associated with ready-to-eat vegetables (Gleeson and O'Beime, 2005; Marzocca et al., 2006; Issa-Zacharia et al., 2010). Other fresh products such as romaine-lettuce and seed sprouts have been related with foodborne outbreaks caused by *E. coli* O145 and O104 serotypes in United States (CDC, 2010) and Germany (Frank et al., 2011), respectively. The very young, elderly and immuno-compromised people are reported to be the most susceptible population groups (Ayers, 2005; Schneider et al., 2009).

Proper handling of these foods could be an important factor to consider in foodservice centers, to avoid growth of *E. coli* to hazardous levels. Galloway (2002) reported that improper practices carried out in foodservice

* Corresponding author. Tel.: +34 957 21 8516; fax: +34 957 21 20 00.
E-mail address: bt2vadia@uco.es (A. Valero).

centers, time delays and temperature abuses in salad preparation are relatively common. In fact, *E. coli* has been found in ready-to-eat lettuce salads before consumption in serving units destined to high-risk population groups (Ayçiçek et al., 2004; Rodríguez et al., 2011).

At present, growth and survival models represent an important method from viewpoint of food safety to predict microbial behavior in the food chain (McMeekin et al., 2008). Moreover, several studies have proposed predictive models and challenge tests to estimate the growth of *E. coli* in vegetables (Franz et al., 2010; Gleeson and O'Beirne, 2005; Koseki and Isobe, 2005). These models have been developed to predict the proliferation of microorganisms in fresh produce based on temperature measurements (Dickson et al., 1992; Rosset et al., 2004; Sumner and Krist, 2002; Van Gerwen and Zwietering, 1998). Despite these advances, novel and user friendly methodologies are required in foodservice centers based on a risk-based approach for better knowledge of the behavior of non-O157 *E. coli* strains in leafy green vegetable dishes.

One alternative method consists on generating the needed information in laboratory conditions and then to apply a probabilistic approach through the analysis of time and temperature conditions carried out in foodservice centers to estimate the pathogen growth. This would provide a better characterization of the impact of the short-term holding conditions (time/Temperature, t/T) in foodservice centers destined to a susceptible population group regarding growth of potentially hazardous microorganisms (*E. coli*). Additionally it would be a simply and useful methodology to be considered by risk managers when supporting decisions scientifically based about the safety of ready-to-eat salads.

Throughout this work, an evaluation of growth of the strain of *E. coli* O158:H23 in iceberg-lettuce exposed at short-term storage was performed through the estimation of the log difference (\log_{diff}) at different contamination levels (4.5, 3.5 and 2.5 log cfu/g).

Besides, predictive models were obtained at static temperature conditions and they were further applied, together with Monte Carlo simulation methods, to estimate the variability of the potential *E. coli* outgrowth at dynamic t/T profiles during storage, processing and distribution conditions found in foodservice centers in Spain (school canteens, long-term care facilities (LTCF), and hospitals).

2. Material and methods

2.1. Bacterial strain and culture conditions

E. coli O158:H23 was chosen among other pathogenic strains (O55:H6, O59:H21 and O157:H7) to present the fastest growth under optimal and limiting conditions in a screening carried out by our research group (Valero et al., 2010). A lyophilized culture of the strain (NCTC 10974) was obtained from the Spanish Type Culture Collection (CECT, Burjassot, Valencia). The culture was rehydrated as indicated by manufacturer's instructions. The strain was maintained in frozen cryovials containing beads and cryopreservatives at -70°C .

Tryptone Bile X-Glucuronide Agar (TBX Agar, Oxoid, UK) was selected to evaluate the potential growth of the strain. This is a selective medium for the detection and enumeration of *E. coli* in foods that contain a chromogenic agent (X-Glucuronide) which detects glucuronidase activity of *E. coli* strains. Also, the content of bile salts in the agar and the high incubation temperatures at 44°C inhibit largely the growth of accompanying food flora.

Three days before the experiment, a stock culture was transferred to a single 9 ml tube containing Tryptone Soya Broth (TSB, Oxoid, UK) and incubated at 37°C for 24 h. From this, 1 ml was sub-cultured into a 9 ml tube of TSB and incubated at the same conditions described previously. The *E. coli* strain was sub-cultured for one more time in a 50 ml flask of TSB until the early stationary phase was reached (~ 18 h).

The grown suspension was centrifuged at 4000 rpm for 5 min and washed for three times with a Phosphate Buffer Saline solution (PBS, Panreac, Barcelona). Finally, the supernatant was discarded and the

pellet was resuspended in 1 ml of saline solution (0.85% w/v) and incubated at refrigeration until use.

2.2. Experimental design at short-term storage conditions

Ready-to-eat iceberg-lettuce (200 g-bags) was purchased from a local supermarket and kept in refrigeration at 4°C until use. In this study, the lettuce was processed relatively quickly (24 h) because of its short shelf life.

Three initial contamination levels of *E. coli* were used (4.5, 3.5 and 2.5 log cfu/g) and the growth of the strain was evaluated during 6 h and was monitored at six periods (30, 60, 90, 120, 180 and 360 min) of incubation. For that, two samples of 10-g of lettuce were analyzed and plated in triplicate at each time interval and incubated at 44°C for 18–24 h.

Since the main objective was to evaluate the potential outgrowth of *E. coli* during holding conditions (storage, processing and distribution) of lettuce-based salads in foodservice centers, before designing the t/T scenarios to be evaluated at laboratory conditions, initial visits were made to different centers together with personal interviews with each responsible in order to know in detail the quality control system followed for the chill foods served. After collecting this preliminary information, the most representative scenarios were simulated at static conditions. Five static temperatures (8, 12, 16, 20 and 24°C) were chosen for the evaluation of the potential outgrowth of *E. coli* in iceberg-lettuce.

2.3. Inoculation of ready-to-eat iceberg-lettuce with *E. coli* O158:H23

When the inoculum reached the stationary phase (~ 18 h), it was serially diluted in Physiologic Saline Solution (0.85%) (PSS) until desired concentrations were obtained. Ten g of iceberg-lettuce was placed aseptically into sterile Petri dishes of 15 mm to facilitate bacterial inoculation. The samples were inoculated with 100 μl of the inoculum, which was randomly distributed over the lettuce surface. Subsequently, the Petri dishes were aerobically stored and microbial counts were determined.

At the same time, the internal temperature of the bags of lettuce together with the external temperature of the refrigerator was measured with a data logger (Fourier MicroLogPRO EC700, US) equipped with an external sensor logger (DT132) (-50°C to 100°C). The internal and external temperature records were collected and adjusted by Microlab 3.6.2 program in MS Excel 2007 (Microsoft Corporation).

2.4. Microbial analyses

Both control (25-g) and inoculated (10-g) samples were analyzed. The iceberg-lettuce samples were placed in sterile bags and mixed with 225 and 90 ml of buffered peptone water, respectively (0.1% ISO, Oxoid, England) and were homogenized in a Stomacher (Stomacher 400 Lab-Blender, Seward, England) at high intensity for 60 s. Afterward, serial dilutions were made in PSS. *E. coli* colonies were observed by pour plating on TBX selective agar (Oxoid, UK) media during 18–24 h of incubation at 44°C . The presence of stressed cells was determined by pre-incubating the plates for 4 h at 37°C . The counts were made using an automated colony counter (Flash and Go, IUL, Barcelona, Spain) and expressed as log cfu/g (ISO, 16649-2, 2001).

2.5. Data collection in foodservice centers

Real t/T data were collected from foodservice centers destined to high-risk population groups. They were divided into school canteens (8 centers), LTCF (6 centers) and hospitals (5 centers). The centers were selected according to the number of meals served per day (>250) and the existence of a responsible person for food quality control.

Data collection regarding t/T in foodservice centers was carried out as follows. Technical staff belonging to each center was responsible to take individual temperature measurements for lettuce-based salads. Three steps were monitored: refrigeration of raw material in cameras;

processing in chill rooms and distribution of ready-to-eat salads. For each step, an individual temperature measurement was collected daily by inserting a food thermometer equipped with a special probe (HI 95809-1, Hanna Instruments, Woonsocket, UK). Time duration of each step was also recorded. Maximum total time was assumed to comprise 6 h (from processing to distribution of the last ready-to-eat salad dish). Thus, three independent t/T paired data were obtained daily per center. Overall, for school canteens, LTCF and hospitals; 30, 40 and 48 paired t/T data per center were recorded. In total 240 measurements (each one containing three independent t/T paired data) were collected for each foodservice facility.

2.6. Data processing and modeling approach

Logarithmic difference (\log_{diff}) values were estimated at static temperature conditions by subtracting the initial inoculum level ($\log N_{init}$) from the final concentration ($\log N_{max}$) level.

$$\log_{diff} = \log N_{max} - \log N_{init} \quad (1)$$

The relationship between \log_{diff} values and temperature (T) was described by a polynomial regression for each inoculum level studied. A Kruskal–Wallis non parametric test was performed to evaluate significant differences among \log_{diff} values at each inoculum level.

$$\log_{diff} = a*(T)^2 + b*(T) + c \quad (2)$$

To estimate the outgrowth of *E. coli* under individual t/T conditions, the term time–temperature equivalent (TTE) was calculated based on the approach given by Rosset et al. (2004).

$$TTE = \sum_{i=1}^n t_i*(T_i - T_{min})^2 \quad (3)$$

where 'i' is the step considered in this study (refrigeration, processing and distribution), t_i is the storage time duration in the step 'i', T_i is the storage temperature (°C) at the step 'i' and T_{min} is the notional minimum temperature below which growth is not observed.

To estimate TTE, storage, processing and distribution conditions were added as follows:

$$TTE = t_{proc}*(T_{proc} - T_{min})^2 + t_{stor}*(T_{stor} - T_{min})^2 + t_{dist}*(T_{dist} - T_{min})^2 \quad (4)$$

where t_{proc}/T_{proc} is the processing time/temperature; t_{stor}/T_{stor} is the storage time/temperature and t_{dist}/T_{dist} is the distribution time/temperature.

Notional minimum temperature (T_{min}) was obtained from the secondary square-root model obtained by Koseki and Isobe (2005) for *E. coli* O157:H7 ($T_{min} = 4.54$ °C).

$$\sqrt{\mu_{max}} = 0.033*(T - 4.54) \quad (5)$$

where μ_{max} is the maximum growth rate (h^{-1}).

It is noted that in this paper a validation was not intended, but simply an application of T_{min} as the Koseki and Isobe model was validated in iceberg-lettuce.

By working out the value of T_i from Eq. (3), the effective static temperature (T_{eff}) (i.e. temperature causing same increase as above) at each dynamic profile was calculated:

$$T_{eff} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n t_i*(T_i - T_{min})^2}{t_{tot}}} + T_{min} = \sqrt{\frac{TTE}{t_{tot}}} + T_{min} \quad (6)$$

where t_{tot} is the total storage time period (i.e. 6 h).

Once T_{eff} was calculated by applying Eq. (6), \log_{diff} at each contamination level (2.5, 3.5 and 4.5 log cfu/g) was obtained by inserting the T_{eff} term in Eq. (2).

$$\log_{diff} = a*(T_{eff})^2 + b*T_{eff} + c \quad (7)$$

2.7. Simulation model

The t/T data collected in foodservice centers were fitted to various distributions, using ModelRisk v4.3 software (Vose Consulting, Belgium) combining the obtained information and expert's opinion. The goodness of fit was evaluated using the Akaike Information Criterion (AIC). The reasoning behind information criteria is that the better distribution is the one that explains the data well with a minimum number of free parameters. A high negative value of AIC implies a better fit. The best-fitted distributions describing the holding conditions during storage, processing and distribution of salads were used as inputs of the growth model described in the previous section. Model output, i.e. estimated \log_{diff} of *E. coli* before consumption, was calculated using the Monte Carlo simulation technique with 10,000 iterations, using the ModelRisk v4.3 software.

3. Results and discussion

3.1. Growth of *E. coli* O158:H23 on ready-to-eat iceberg-lettuce at static temperatures

Differences in the behavior of *E. coli* O158:H23 were observed at the static temperatures tested. Throughout the experiment, variations in temperature inside the samples were between 0.2 and 0.5 °C. Microbial counts of *E. coli* O158:H23 strain on ready-to-eat iceberg-lettuce at 8, 12, 16, 20 and 24 °C at 4.5, 3.5 and 2.5 log cfu/g are represented in Fig. 1. The results obtained at static conditions indicated that maintenance of the lettuce at 8 °C slightly reduced *E. coli* population (−0.4 to −0.5 log cfu/g) from ~3 h until the end of the study while growth was observed from 12 to 24 °C. However, if chill chain is not maintained, *E. coli* can grow up to 1 log cfu/g at temperatures above 16 °C, even from the lowest contamination levels. Indeed, final concentration values at 24 °C corresponded to 5.9 ± 0.1 (N_{init} 4.5 log cfu/g), 4.9 ± 0.03 (N_{init} 3.5 log cfu/g) and 3.4 ± 0.04 (N_{init} 2.5 log cfu/g) for each inoculum level studied. There were not significant differences between the inoculum levels ($P > 0.05$) although a lower increase at 24 °C was observed when the initial contamination was 2.5 log cfu/g (Fig. 1C).

The relationship between the observed \log_{diff} of *E. coli* population at 4.5, 3.5 and 2.5 log cfu/g and the storage temperature was described by a polynomial regression model, represented in Fig. 2. The regression models showed a good correlation for the three inoculum levels studied ($R^2 \geq 0.88$). The equations generated were subsequently used in the simulation model to estimate \log_{diff} in foodservice centers.

\log_{diff} values were compared to those estimated by tertiary models (Pathogen Modeling Program (PMP) and Combase Predictor (CP)). Overall, the observed results matched with predictions given by PMP and CP at 8, 12 and 16 °C (Table 1). However, more conservative estimations were provided by CP at 20 and at 24 °C, since the estimated \log_{diff} was 0.5 higher than the observed value for *E. coli* in iceberg-lettuce.

These results overall confirm that non-O157 *E. coli* strains can grow relatively fast at mild storage temperatures by what holding conditions in foodservice centers are extremely important to avoid growth of *E. coli* at hazardous levels before consumption.

The effect of storage temperatures below 8 °C on growth and survival of *E. coli* population on ready-to-eat vegetables has been widely studied (Abdul-Raouf et al., 1993; Francis and O'Beirne, 2001; Chang and Fang, 2007; McEvoy et al., 2009; Oliveira et al., 2010). However, our results are not fully comparable with other studies in literature because they have been performed at longer storage periods. In turn, our findings match with the conclusions reported by other authors, since the

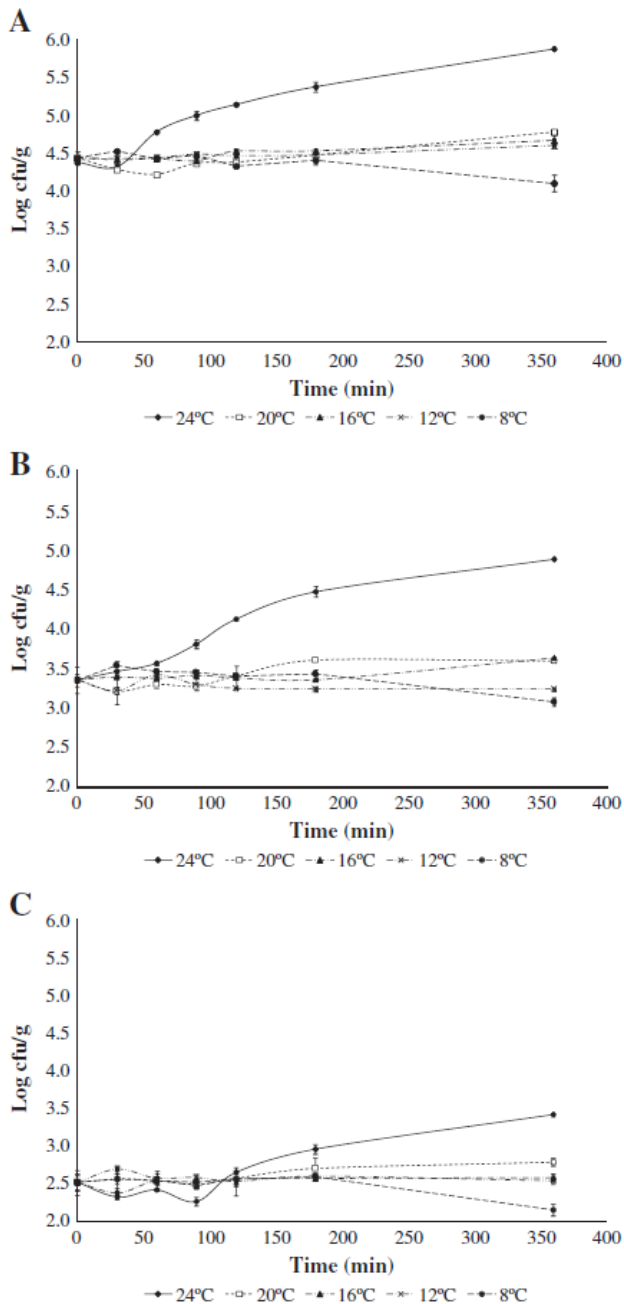


Fig. 1. Observed growth of *E. coli* O158:H23 in RTE iceberg-lettuce at 4.5 (A), 3.5 (B) and 2.5 log cfu/g (C) at static temperatures and short-term storage (6 h).

effect of the time of storage at low temperatures is considered as an important factor to avoid a possible pathogen proliferation on lettuce before consumption (Wu, 2010). On the other hand, several authors have noticed an increase of population at high storage temperatures depending on the initial contamination levels of vegetables by *E. coli*, thus producing high levels in the final product before consumption (Bharathi et al., 2001; Ding et al., 2009; Luo et al., 2010). They all conclude that the ability of *E. coli* strains to survive and grow during long periods at low temperatures may be related to product type, packaged atmosphere, storage temperature and strain type.

3.2. Simulation model: outgrowth of *E. coli* at different t/T scenarios in foodservice centers

In this study a risk-based approach was implemented to estimate \log_{diff} of *E. coli* from initial distributions of time and temperature in foodservice centers.

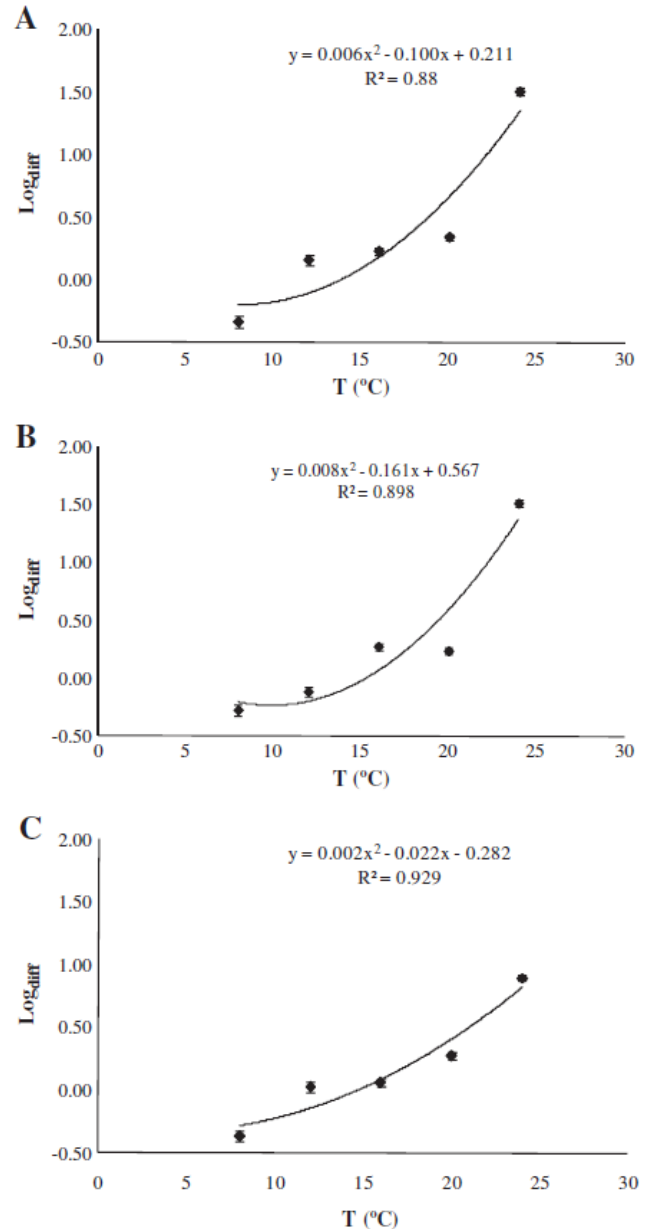


Fig. 2. Logarithmic difference (\log_{diff}) of the *E. coli* O158:H23 in RTE iceberg-lettuce and polynomial regression models as a function of storage temperature at 4.5 (A), 3.5 (B) and 2.5 log cfu/g (C).

The best-fitted distributions for t/T are represented in Table 2. Normal distributions were selected for temperature data, while uniform, triangle and exponential distributions explained the recorded time data. These distributions were used as inputs in the simulation for calculating \log_{diff} in each foodservice center.

Descriptive statistics of the collected time and temperature values in each foodservice center is presented in Table 3. Mean storage temperatures ranged from 4.5 to 5.6 °C, although maximum values above 10 °C were observed in refrigeration cameras of LTCF and hospitals. Minimal and maximal values of processing and distribution conditions were between 12.6 and 29 °C. Statistical distributions for the effective static temperature (T_{eff}) obtained for each foodservice centers (hospitals, LTCF and school canteens) are shown in Fig. 3. A more strict control of temperatures in hospitals evaluated was carried out, since salads were refrigerated in chill rooms prior to distribution (11.1 °C).

Regarding time delays, hospitals evaluated presented shorter values, in comparison to LTCF and school canteens. This could be related to a more strict control of t/T conditions in these facilities.

Table 1
Comparison of observed (mean \pm standard deviation) and estimated \log_{diff} and μ_{max} (h^{-1}) of *E. coli* by Pathogen Modelling Program (PMP) and Combase Predictor (CP) at static storage temperatures.

T (°C)	Observed \log_{diff}			Pathogen modeling program		Combase predictor	
	4.5 Log cfu/g	3.5 Log cfu/g	2.5 Log cfu/g	\log_{diff}	μ_{max} (h^{-1})	\log_{diff}	μ_{max} (h^{-1})
8	-0.3 ± 0.04	-0.3 ± 0.03	-0.4 ± 0.06	0.0	0.0	0.0	0.0
12	0.2 ± 0.04	-0.1 ± 0.04	$3.0 \times 10^{-2} \pm 0.08$	0.0	0.2	0.1	0.1
16	0.2 ± 0.03	0.3 ± 0.05	0.1 ± 0.07	3×10^{-2}	0.2	0.3	0.1
20	0.3 ± 0.03	0.2 ± 0.07	0.3 ± 0.11	0.3	0.3	0.9	0.3
24	1.5 ± 0.03	1.5 ± 0.04	0.9 ± 0.06	1.1	0.4	2.0	0.5

Table 2
Best-fitted distribution parameters obtained for time/Temperature data collected in hospitals, long-term care facilities (LTCF) and school canteens.

Parameters	Notation	Description
Temperature processing schools	$T_{proc-school}$	Normal (21.26, 4.01, Trunc (14.5, 31))
Temperature processing LTCF	$T_{proc-LTCF}$	Normal (20.57, 4.84, Trunc (12.6, 27))
Temperature processing hospitals	$T_{proc-hosp}$	Normal (17.7, 2.2)
Time processing schools	$t_{proc-school}$	Triangle (0.5, 1, 2)
Time processing LTCF	$t_{proc-LTCF}$	Triangle (0.5, 1, 2)
Time processing hospitals	$t_{proc-hosp}$	Exponential (0.892, Trunc (1.35))
Temperature storage schools	$T_{stor-school}$	Normal (4.51, 2.03, Trunc (0, 8.7))
Temperature storage LTCF	$T_{stor-LTCF}$	Normal (5.57, 3.1, Trunc (1, 13.8))
Temperature storage hospitals	$T_{stor-hosp}$	Normal (5.52, 0.39)
Time storage schools	$t_{stor-school}$	Uniform (3, 5)
Time storage LTCF	$t_{stor-LTCF}$	Uniform (3, 5)
Time storage hospitals	$t_{stor-hosp}$	Exponential (1.405, Trunc (3.417))
Temperature distribution schools	$T_{dist-school}$	Normal (19.04, 2.324, Trunc (15.3, 25))
Temperature distribution LTCF	$T_{dist-LTCF}$	Normal (21.933, 2.59, Trunc (16, 29))
Temperature distribution hospitals	$T_{dist-hosp}$	Normal (21.8, 2.27)
Time distribution schools	$t_{dist-school}$	Triangle (0.5, 1, 2)
Time distribution LTCF	$t_{dist-LTCF}$	Triangle (0.5, 1, 2)
Time distribution hospitals	$t_{dist-hosp}$	Exponential (0.959, Trunc (1))

Simulation results showed that, for school canteens and LTCF, substantial differences were found among the initial contamination levels tested, since at 4.5 log cfu/g, no growth was observed in 47.8% of cases in school canteens, while this percentage increases up to 75.6% when 3.5 log cfu/g was assumed. The same result was noted for LTCF since

the percentage rose from 32.2% to 62.3% at 4.5 and at 3.5 log cfu/g respectively. Regarding hospitals, no growth cases were above 90% for the three contamination levels. Interestingly, at 2.5 log cfu/g no growth was observed in more than 98% of cases for the three foodservice centers evaluated, denoting the importance of controlling the initial microbiological quality of ready-to-eat iceberg-lettuce when entering in the establishment. However, the growth potential of *E. coli* was considered to be non significant because 95th percentile values were below 0.5 log cfu/g in all cases. This was based on the ISO/TS19036 (ISO, 2006), and to its appendix, the median of the reproducibility standard deviation in solid food products is 0.3 log cfu/g so that the measurement uncertainty U is $2 \times 0.3 \approx 0.5$ log. Distributions of the whole model outputs for \log_{diff} in school canteens, LTCF and hospitals are represented in Fig. 4 (10,000 iterations). At low contamination levels (2.5 log cfu/g) distributions were more left-skewed since values closer to 0 were obtained. In LTCF and hospitals, there were significant differences among the three inocula tested ($P < 0.05$) while in school canteens results were not significantly different ($P > 0.05$).

In this study, a square-root secondary model (Koseki and Isobe, 2005) was applied to estimate outgrowth of *E. coli* in foodservice centers. This model includes a notional minimum temperature (T_{min}) which may be estimated by several degrees below the minimum temperature at which growth is observed (McMeekin et al., 1993). Although microbial counts at static temperatures resulted in no growth at 16 °C or 20 °C, it should be noted that a limited time period (6 h) was considered, so that no information about the whole kinetic curve was available. Despite this limitation, predictions of \log_{diff} in foodservice centers were consistent with observations at static temperatures since no growth was obtained in most cases. Maximal \log_{diff} values obtained in the simulation were below 1 log cfu/g mainly due to the limited time period studied. Indeed, at static conditions, only storage at 24 °C during 6 h gave \log_{diff} higher than 1 log cycle. Although mean processing and distribution

Table 3
Descriptive statistics of the temperature data collected in school canteens, long-term care facilities and hospitals (s.d., standard deviation).

T (°C)	School canteens			Time (h)	School canteens		
	Storage	Processing	Distribution		Storage	Processing	Distribution
Minimum	0.0	14.5	15.3	Minimum	3.0	0.5	0.5
Maximum	8.7	31	25	Maximum	5.0	2.0	2.0
Mean	4.5	21.3	19	Mean	4.0	1.2	1.2
s.d.	2.2	4.3	2.3	s.d.	0.6	0.3	0.3
T (°C)	Long-term care facilities			Time (h)	Long-term care facilities		
	Storage	Processing	Distribution		Storage	Processing	Distribution
Minimum	1.0	12.6	16.0	Minimum	3.0	0.5	0.5
Maximum	13.8	27.0	29.0	Maximum	5.0	2.0	2.0
Mean	5.6	20.6	21.9	Mean	4.0	1.2	1.2
s.d.	3.1	4.8	2.6	s.d.	0.6	0.3	0.3
T (°C)	Hospitals			Time (h)	Hospitals		
	Storage	Processing	Distribution		Storage	Processing	Distribution
Minimum	1.0	13.5	14.3	Minimum	0.1	0.1	0.1
Maximum	12.0	23.6	27	Maximum	3.42	1.35	1.0
Mean	5.5	17.7	21.8	Mean	1.08	0.5	0.41
s.d.	2.1	2.2	2.3	s.d.	0.6	0.4	0.3

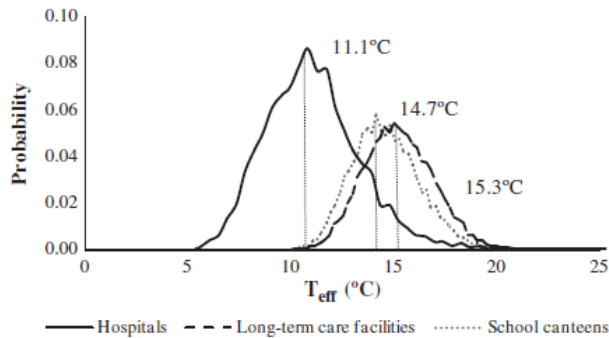


Fig. 3. Statistical distributions for the effective static temperature (T_{eff}) obtained for hospitals (mean: 11.1 °C), long-term care facilities (mean: 15.3 °C) and school canteens (mean: 14.7 °C).

temperatures in foodservice centers reached approximately 20 °C (Table 3) mean time values corresponding to these steps were below 1.2 h which resulted in low risk of *E. coli* growth.

The instability of t/T values collected matched with the findings of other similar studies, where fluctuations in temperature during vegetables delivery were found (Rediers et al., 2009). Other published studies have been developed based on long storage periods and/or artificially inoculated vegetables (De Castro et al., 2005; Koseki and Isoe, 2005) where an increase of *E. coli* up to 4.0 log cfu/g was found from harvest to retail points.

It is well known that the temperature of fresh produce should be maintained approximately below 5 °C to reduce the proliferation of spoilage organisms and human pathogens (Franz et al., 2010; Rediers et al., 2009). However, the Spanish official regulation about safety of ready-to-eat foods states that a short-term storage without temperature control can be allowed during handling, elaboration, transport and distribution of ready-to-eat foods, if food safety is guaranteed by the competent authority. The results obtained in this study could serve as a tool for food operators to set t/T requirements for ready-to-eat foods in catering establishments, providing a scientific basis through the use of predictive modeling.

3.3. Conclusions

This study demonstrated that *E. coli* O158:H23 can grow on iceberg-lettuce at temperatures above 8 °C, even at low contamination levels of 2.5 log cfu/g. However, a slight decrease of *E. coli* population at 8 °C was observed, which confirms that continuous refrigeration has been an effective preservation method for *E. coli* inhibition. Also, the results indicated the ability of this EPEC strain to grow at temperatures above 16 °C. A considerable population increase of 0.9 and 1.5 log cfu/g at 24 °C was observed in a 6 h period at 2.5, 3.5 and 4.5 log cfu/g respectively.

The t/T scenarios analyzed in hospitals resulted in a lower increase of *E. coli* in ready-to-eat salads. Besides, the LTCF and school canteens demonstrate that *E. coli* will not reach high levels before consumption (unless the ready-to-eat lettuce has initially a high number of *E. coli*) although a slight increase was estimated.

This study was based on an original approach to describe *E. coli* survival and growth on iceberg-lettuce, not using conventional kinetic parameters (i.e. maximum growth rate, lag phase, etc.) in estimating the procedures. This simple approach can constitute an alternative method and suggests the importance by food safety managers to better define the control measures to be adopted in foodservice centers in order to prevent food-borne infections.

Acknowledgments

This work was partly financed by the AGR-01879 Excellence Project (Andalusia Government), AGL 2008-03298/ALI project (Spanish

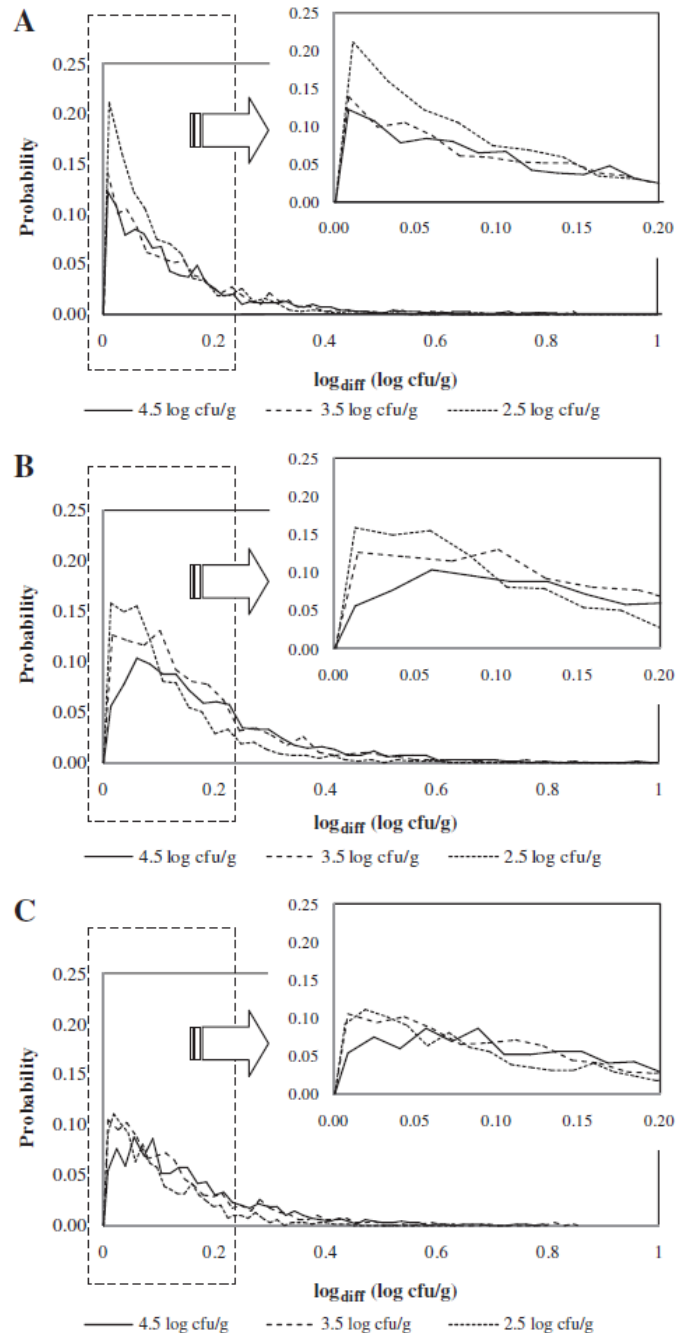


Fig. 4. Probability distributions of the model outputs obtained from Monte Carlo simulation (10,000 iterations) regarding the \log_{diff} in hospitals (A), long-term care facilities (B) and school canteens (C) for the three inocula tested. Upper graphs show an enlargement of the left part of the distributions corresponding to each figure.

Ministry of Science and Innovation), European ERDF funding and by a grant awarded by the International Cooperation and Development Spanish Agency (AECID).

References

- Abadias, M., Usall, J., Oliveira, M., Alegre, I., Viñas, I., 2008. Efficacy of neutral electrolyzed water (NEW) for reducing microbial contamination on minimally processed vegetables. *Int. J. Food Microbiol.* 123, 151–158.
- Abadias, M., Alegre, I., Usall, J., Torres, R., Viñas, I., 2010. Evaluation of different alternative substances to chlorine for reducing foodborne pathogens in fresh-cut apple processing. *Postharvest Biol. Technol.* 59, 289–297.
- Abdul-Raouf, U.M., Beuchat, L.R., Ammar, M.S., 1993. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1999–2006.

- Ayçiçek, H., Sarimehmetoğlu, B., Çarıroğlu, S., 2004. Assessment of the microbiological quality of meals sampled at the meal serving units of a military hospital in Ankara, Turkey. *Food Control* 15, 379–384.
- Ayers, L.T., 2005. Outbreaks of *E. coli* Infections Associated with Lettuce and Other Leafy Greens. Enteric Diseases and Epidemiology Branch Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA. Available at: http://www.cdc.gov/od/oc/ohrt/food_safety/workshop4/presentations/ayers.pdf. Accessed 03/28/2012.
- Beuchat, L.R., 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *J. Food Prot.* 59, 204–216.
- Bharathi, S., Ramesh, M.N., Varadaraj, M.C., 2001. Predicting the behavioural pattern of *Escherichia coli* in minimally processed vegetables. *Food Control* 12, 257–284.
- Bugarel, M., Martin, A., Fach, P., Beutin, L., 2011. Virulence gene profiling of enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* strains: a basis for molecular risk assessment of typical and atypical EPEC strains. *Research article. BMC Microbiol.* 11, 142.
- Center for Disease Control and Prevention, 2010. Investigation update: multistate outbreak of *E. coli* O145 infections linked to shredded Romaine lettuce from a single processing facility, updated 21 May 2010 (final update) Available at: http://www.cdc.gov/ecoli/2010/ecoli_o145/index.html 2010 Accessed 03/24/2012.
- Chang, M.J., Fang, J.T., 2007. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* enteric serovars Typhimurium in iceberg-lettuce and the antimicrobial effect of rice vinegar against *E. coli* O157:H7. *Food Microbiol.* 24, 745–751.
- De Castro, L.R., Vigneault, C., Charles, M.T., Cortez, L.A.B., 2005. Effect of cooling delay and cold-chain breakage on 'Santa Clara' tomato. *J. Food Agric. Environ.* 3, 49–54.
- Dickson, J.S., Siragusa, G.R., Wray, J.E., 1992. Predicting the growth of *Salmonella typhimurium* on beef by using the temperature function integration technique. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3482–3487.
- Ding, T., Jin, Y.G., Rahman, S.M.E., Kim, J.M., Choi, K.H., Choi, G.S., Oh, D.-H., 2009. Prediction of growth of *Escherichia coli* O157: H7 in lettuce treated with alkaline electrolyzed at different temperatures. *J. Food Hyg. Saf.* 24, 232–237.
- European Centers for Disease Prevention and Control, 2011. Rapid Risk Assessment (ECDC). Outbreak of Shiga Toxin-producing *E. coli* (STEC) in Germany. Available at: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/escherichia_coli/basic_facts/Pages/basic_facts.aspx. Accessed 03/27/2012.
- European Food Safety Authority (EFSA) and European Centers for Disease Prevention and Control (ECDC), 2012. Scientific Report of EFSA and ECDC. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. Available at: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2597.pdf>. Accessed 03/24/2012.
- Francis, G.A., O'Beirne, D., 2001. Effects of vegetable type, package atmosphere and storage temperature on growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27, 111–116.
- Frank, C., Werber, D., Cramer, J.P., Askar, M., Faber, M., Heiden, M.A., Bernard, H., Fruth, A., Prager, R., Spode, A., Wadl, M., Zoufaly, A., Jordan, S., Stark, K., Krause, G., 2011. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany – preliminary report. *N. Engl. J. Med.* 1–11.
- Franz, E., Tromp, S.O., Rijgersberg, H., Van Der Fels-Klerx, H.J., 2010. Quantitative microbial risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in leafy green vegetables consumed at salad bars. *J. Food Prot.* 73, 274–285.
- Gallay, A., 2002. Microbial toxins and collective food poisoning reported in France ((In French) Toxines microbiennes dans les toxi-infections alimentaires collectives déclarées en France). Congress of the French Society of Microbiology. November 2002, Paris.
- Gleeson, E., O'Beirne, D., 2005. Effects of process severity on survival and growth of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on minimally processed vegetables. *Food Control* 16, 677–685.
- ISO, 2006. ISO TS 19036 Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Guidelines for the Estimation of Measurement Uncertainty for Quantitative Determinations. ISO 16649-2, 2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli*. Part 2: Colony-count Technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-Glucuronide.
- Issa-Zacharia, A., Kamitani, Y., Muhimbula, S.H., Ndabikunze, K.B., 2010. A review of microbiological safety of fruits and vegetables and the introduction of electrolyzed water as an alternative to sodium hypochlorite solution. *Afr. J. Food Sci.* 4, 778–789.
- Koseki, S., Isobe, S., 2005. Prediction of pathogen growth on iceberg-lettuce under real temperature history during distribution from farm to table. *Int. J. Food Microbiol.* 104, 239–248.
- Kuhnert, P., Boerlin, P., Frey, J., 2000. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 107–117.
- Luo, Y., Frey, E.A., Pfuetzner, R.A., Creagh, A.L., Knoechel, D.G., Haynes, C.A., Finlay, B.B., Strynadka, N.C.J., 2000. Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. *Nature.* 405, 1073–1077.
- Luo, Y., He, Q., McEvoy, L., 2010. Effect of storage temperature and duration on the behavior of *Escherichia coli* O157:H7 on packaged fresh-cut salad containing Romaine and iceberg-lettuce. *J. Food Sci.* 75, 390–397.
- Marzocca, M.A., Marucci, P.L., Sica, M.G., Álvarez, E.E., 2006. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in raw minced meat and frozen hamburgers. *Argent. Microbiol. J.* 38, 38–40.
- McEvoy, J.L., Luo, Y., Conway, W., Zhou, B., Feng, H., 2009. Potential of *Escherichia coli* O157:H7 to grow on field-cored lettuce as impacted by postharvest storage time and temperature. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 506–509.
- McMeekin, T.A., Olley, J.N., Ross, T., Ratkowsky, D.A., 1993. Predictive Microbiology: Theory and Application. Research Studies Press, Taunton, UK.
- McMeekin, T.A., Bowman, J., McQuestin, O., Mellefont, L., Ross, T., Tamplin, M., 2008. The future of predictive microbiology: strategic research, innovative applications and great expectations. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 2–9.
- Oliveira, M., Usall, J., Solsona, C., Alegre, I., Viñas, I., Abadías, M., 2010. Effects of packaging type and storage temperature on the growth of food-borne pathogens on shredded Romaine lettuce. *Food Microbiol.* 27, 375–380.
- Parish, M.E., Beuchat, L.R., Suslow, T.V., Harris, L.J., Garrett, E.H., Farber, J.N., Busta, F.F., 2003. Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2, 161–173.
- Rediers, H., Claes, M., Peeters, L., Willems, K.A., 2009. Evaluation of cold chain of fresh-cut endive from farmer to plate. *Postharvest Biol. Technol.* 51, 257–262.
- Rodríguez, M., Valero, A., Posada-Izquierdo, G.D., Carrasco, E., Zurera, G., 2011. Evaluation of food staff practices and microbiological status of ready-to-eat foods in long-term care facilities in Andalusia region (Spain). *J. Food Prot.* 74, 1504–1512.
- Rosset, P., Cornu, M., Noël, V., Morelli, E., Poumeyrol, G., 2004. Time-temperature profiles of chilled ready-to-eat foods in school catering and probabilistic analysis of *Listeria monocytogenes* growth. *Int. J. Food Microbiol.* 96, 49–59.
- Rowe, B., Gross, R.J., Lindop, R., Baird, R.B., 1974. A new *E. coli* O group O158 associated with an outbreak of infantile enteritis. *J. Clin. Pathol.* 27, 832–833.
- Schneider, K.R., Schneider, R.G., Hubbard, M.A., Chang, A., 2009. Preventing food-borne illness: *Escherichia coli* O157:H7. *Food Sci. Hum. Nutr.* 31, 1–5. University of Florida. IFAS Extension. Available at: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/FS/FS09700.pdf>. Accessed 02/20/2012.
- Senerwa, D., Olsvik, O., Mutanda, L.N., Lindqvist, K.J., Gathuma, J.M., Fossum, K., Wachsmuth, K., 1989. Enteropathogenic *Escherichia coli* serotype O111:HNT isolated from preterm neonates in Nairobi, Kenya. *J. Clin. Microbiol.* 27, 1307–1311.
- Sumner, J., Krist, K., 2002. The use of predictive microbiology by the Australian meat industry. *J. Food Prot.* 73, 363–366.
- Valero, A., Rodríguez, M., Carrasco, E., Pérez-Rodríguez, F., García-Gimeno, R.M., Zurera, G., 2010. Studying the growth boundary and subsequent time to growth of pathogenic *Escherichia coli* serotypes by turbidity measurements. *Food Microbiol.* 27, 819–828.
- Van Gerwen, S.J.C., Zwietering, M.H., 1998. Growth and inactivation models to be used in quantitative risk assessments. *J. Food Prot.* 61, 1541–1549.
- Wu, X., 2010. Development of a quantitative microbial risk assessment model for food-borne *E. coli* O157:H7 infection: the risk of consuming lettuce. A thesis presented to the University of Waterloo in fulfillment of the Thesis requirement for the degree of Master of Science in Health Studies and Gerontology. Waterloo, Ontario, Canada. Available at: http://uwspace.uwaterloo.ca/bitstream/10012/5113/1/Wu_Xiaofeng.pdf. Accessed 03/28/2012.

PUBLICACIÓN 6

**PUBLICACIÓN 6: EFECTO DE LAS CONDICIONES DE PRE-
INCUBACIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN FIAMBRE DE PECHUGA DE
POLLO CORTADO EN LONCHAS**

EFFECT OF PRE-INCUBATION CONDITIONS ON GROWTH AND
SURVIVAL OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN SLICED COOKED
CHICKEN BREAST

PUBLICACIÓN 6: EFECTO DE LAS CONDICIONES DE PRE-INCUBACIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO SUPERVIVENCIA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN FIAMBRE DE PECHUGA DE POLLO CORTADO EN LONCHAS

RESUMEN

En los estudios realizados en centros geriátricos y hospitales se evidenciaron recuentos notables de *S. aureus* en las muestras de cárnicos cocidos RTE. Partiendo de esta base, la presente Publicación 6 se realizó con el objeto de evaluar el comportamiento de una cepa enterotoxigénica de *S. aureus* (ATCC 13565) en fiambre de pechuga de pollo cortado en lonchas, almacenadas a 10 y 20°C, sometida previamente a 6 condiciones diferentes de pre-incubación en caldo (10°C/pH 6,5/ a_w 0,997; 15°C/pH 6,5/ a_w 0,997; 15°C/pH 5,5/ a_w 0,997; 15°C/pH 6,5/ a_w 0,960; 37°C/pH 6,5/ a_w 0,997 y 37°C/pH 5,5/ a_w 0,960); y comprobar su capacidad para producir enterotoxina A (SEA) bajo las condiciones de almacenamiento antes mencionadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

CEPA BACTERIANA Y PREPARACIÓN DE INÓCULO

Se utilizó un cultivo liofilizado de *S. aureus* (ATCC 13565) facilitado por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Burjassot, Valencia, España). El cultivo se rehidrató según las indicaciones del fabricante. Para el cultivo de la cepa se utilizó el caldo Infusión cerebro corazón (BHI, Oxoid) y el Agar Baird Parker (BP, Oxoid) como medio selectivo para el recuento microbiano. Tres días antes del experimento la cepa se cultivó en 10ml de BHI e incubó a 37°C/24h. Luego se realizaron cultivos diarios a razón de 0,1ml en 10ml del caldo a igual Temperatura y tiempo de incubación. Al final del período se realizaron diluciones decimales seriadas en BHI para proceder a la inoculación del caldo modificado.

PREPARACIÓN DEL CALDO DE CULTIVO MODIFICADO Y CONDICIONES DE PRE-INCUBACIÓN

Antes de inocularse en el cárnico, *S. aureus* se sometió a 6 condiciones diferentes de pre-incubación en caldo BHI. El nivel de inóculo se ajustó en el Bioscreen C[®] a 600nm según el procedimiento seguido por Valero y col (2009).

El caldo de BHI (50ml) se modificó, mediante la adición de Cloruro sódico (50 g/L) (NaCl, Panreac 131659, Barcelona, España) y de Ácido clorhídrico (1M) (HCl,

Panreac 181021, Barcelona, España) para ajustar los valores de a_w y pH, respectivamente. Ambas condiciones se comprobaron mediante un higrómetro de punto de rocío (Decagon Devices, Inc., Pullman, Washington, USA) y un pH/mv metro (Basic 20–Crison, Barcelona, España). Luego, se esterilizó a 121°C/15min y de nuevo se comprobaron los valores de a_w y pH.

Se planificó depositar una alícuota de 1ml de la suspensión preparada en 50ml de BHI modificado, para lograr una concentración inicial en el caldo de ~ 3 log ufc/ml. Esta concentración se confirmó mediante la siembra de 0,1ml en superficie en Agar de recuento en placa (PCA, Oxoid) e incubación a 37°C/24–48 h. Inmediatamente a la inoculación, los medios inoculados se incubaron bajo 6 condiciones diferentes de pre-incubación en función de la Temperatura/pH/ a_w : 10°C/pH 6,5/ a_w 0,997; 15°C/pH 6,5/ a_w 0,997; 15°C/pH 5,5/ a_w 0,997; 15°C/pH 6,5/ a_w 0,960; 37°C/pH 6,5/ a_w 0,997 y 37°C/pH 5,5/ a_w 0,960.

Se realizó el análisis de las muestras controles para asegurar la ausencia de contaminación externa; y el crecimiento de la cepa se monitorizó mediante la siembra en superficie en PCA durante periodos regulares de tiempo hasta que alcanzó su fase estacionaria (~ 6 log ufc/ml).

MUESTRAS

El fiambre de pechuga de pollo cortado en lonchas se adquirió en el supermercado presentado en bandejas de 200g. Las lonchas se autoclavaron individualmente a 121°C/15min y las mediciones de pH y a_w se realizaron por duplicado antes y después de la esterilización para determinar diferencias significativas. Los valores se correspondieron con $6,17 \pm 0,02$ y $0,971 \pm 0,003$ (antes del autoclavado) y $6,03 \pm 0,01$ y $0,975 \pm 0,003$ (después del autoclavado), respectivamente.

INOCULACIÓN DE *S. AUREUS* EN LONCHAS DE PECHUGA DE POLLO Y MONITORIZACIÓN DEL CRECIMIENTO

Una vez que la cepa alcanzó su fase estacionaria en BHI modificado, la concentración celular se ajustó a las mediciones de OD a través del Bioscreen C[®] y los valores de OD se convirtieron en recuentos microbianos a través de las curvas de calibración (Valero y col., 2009).

Se llevó a cabo la dilución seriada del inóculo en BHI y posteriormente se procedió a la inoculación de las lonchas (~ 8 g) con 0,1ml de la suspensión para alcanzar un nivel de inóculo inicial en torno a 3 log ufc/g. Las lonchas inoculadas se mantuvieron asépticamente en la cámara de flujo a 25°C/20min para garantizar la absorción del

inóculo. Posteriormente se colocaron en placas de Petri y se sellaron con parafina para evitar la deshidratación y fueron incubadas inmediatamente a 10 y 20°C.

Se analizaron 2 muestras inoculadas para comprobar el nivel de inóculo inicial a tiempo 0 y 2 muestras control para descartar posibles contaminaciones.

El crecimiento de la cepa se monitorizó por duplicado en intervalos de tiempos regulares hasta que alcanzó la fase estacionaria, mediante la siembra en placas de PCA a través del Spiral Plate (Eddy Jet Spiral Plate, IUL, Barcelona, España); y el recuento (log ufc/g) se realizó través de un contador de colonias automático (Flash and Go, IUL, Barcelona, España).

MEDICIÓN DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS

La determinación de enterotoxina estafilocócica A (SEA) en fiambre de pechuga de pollo cortado en lonchas se realizó mediante la prueba VIDAS Staph Enterotoxin (BioMérieux, Francia) a través del sistema automatizado MiniVidas. El análisis se realizó por duplicado, a aquellas muestras donde el crecimiento fue ~ 5 log ufc/g, teniendo en cuenta las instrucciones del fabricante para productos cárnicos. Los resultados se interpretaron cualitativamente y la presencia de SEA se asumió cuando el valor de la prueba $\geq 0,13$ (positivo), cuando el valor de la prueba fue $< 0,13$ el resultado se consideró negativo.

PROCESADO DE DATOS Y ENFOQUE DEL MODELO

El modelo Primario de Baranyi y Roberts (1994) se ajustó a los datos de crecimiento de *S. aureus* en el caldo y en el cárnico mediante el programa de Excel DMFit (Instituto de Investigación de alimentos, Norwich, UK). Los parámetros cinéticos como *lag* (h) y μ_{max} (h^{-1}) se estimaron a partir de los datos observados de cada condición estudiada; que a su vez se utilizaron para el cálculo de los tiempos de incremento (t_{inc}) que se corresponde con el tiempo que necesita la población de *S. aureus* para alcanzar 6 log ufc/g (Ecuación 1, artículo publicado).

El modelo de Weibull se ajustó a los datos de supervivencia mediante el software Ginafit (Geeraerd y col., 2005) para la determinación de los parámetros de supervivencia (δ y p). Las curvas de supervivencia se ajustaron mediante el Solver Add-in algorithm implementado en Excel.

El error cuadrático medio (*MSE*) y el R^2 fueron los coeficientes utilizados para determinar la bondad de ajuste de los modelos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de varianza (ANOVA) se utilizó para evaluar la influencia de las condiciones de pre-incubación sobre los parámetros de crecimiento y supervivencia (*lag* y μ_{max} , t_{inc} , δ y p); y la prueba de Duncan para la determinación de los grupos homogéneos ($p = 0,05$) mediante el SPSS v 10,0 (Statsoft Iberica, Portugal).

RESULTADOS

CRECIMIENTO DE *S. AUREUS* EN CALDO BHI

Los parámetros de crecimiento de *S. aureus* bajo las condiciones de pre-incubación estudiadas y los índices estadísticos se exponen en la Tabla 1 del artículo publicado. Los coeficientes de bondad de ajuste determinaron que el modelo de Baranyi y Roberts (1994) presentó un ajuste aceptable a los datos observados ($R^2 > 0,94$ y $MSE < 0,50$).

Los resultados mostraron que la condición de pre-incubación de 10°C/6,5/0,997, provocó una fase *lag* más larga y más variable ($59,99 \pm 58,55h$) y una μ_{max} más corta ($0,01 \pm 0,001h^{-1}$) comparada con el resto de condiciones

En efecto, a Temperaturas de incubación más altas (15 y 37°C) se observó un crecimiento más rápido independientemente de los niveles de pH y a_w . A niveles óptimos de pH y a_w , los valores promedios de la fase *lag* incrementaron desde 4,44h (37°C) a 35,04h (15°C). La interacción de los niveles bajos de pH y a_w no afectaron significativamente la fase *lag* a 37°C ($p > 0,05$). Respecto a los valores de μ_{max} , el crecimiento fue más rápido a 37°C pero éstos experimentaron una marcada reducción ($0,97-0,24h^{-1}$) cuando disminuyó el pH y la a_w . A 10 y 15°C los valores promedios de μ_{max} estuvieron por debajo de $0,12h^{-1}$ para todos los casos estudiados.

Los valores de μ_{max} a 15°C/5,5/0,997 y 15°C/6,5/0,960 no fueron significativamente diferentes ($p > 0,05$), pero el crecimiento fue significativamente más rápido bajo condiciones óptimas (15°C/6,5/0,997) ($p < 0,05$). A 15°C, la reducción de a_w provocó un ligero retardo del crecimiento de *S. aureus* puesto que la fase *lag* aumentó desde 35,04h (0,997) a 44,66h (0,960). Estos resultados sugirieron que a pesar de ser una cepa resistente a niveles bajos de a_w , a 15°C presentó una mayor sensibilidad a las reducciones de a_w (0,960) que a las de pH (5,5).

RESPUESTAS DE SUPERVIVENCIA DE *S. AUREUS* EN FIAMBRE DE PECHUGA DE POLLO CORTADO EN LONCHAS ALMACENADA A 10°C

De forma general, las condiciones subóptimas de pre-incubación provocaron cambios significativos en la capacidad de supervivencia de *S. aureus* tras la inoculación en el cárnico cocido e incubación a 10°C (Figura 1, artículo publicado). El modelo de Weibull mostró un ajuste aceptable a los datos observados ($R^2 \geq 0,70$) aunque hubo casos donde los datos fueron variables y por tanto la bondad de ajuste del modelo disminuyó.

La pre-incubación de la cepa a 10°C/6,5/0,997 y 15°C/6,5/0,997 no supuso un incremento de la capacidad de supervivencia de *S. aureus* durante el posterior almacenamiento de las lonchas a 10°C. Se observó una disminución gradual de la población de 1,2 log ufc/g en 144h y de 0,67 log ufc/g en 240h, respectivamente, hasta que no se detectaron recuentos viables a las 360 y 480h.

La pre-incubación a 15°C/5,5/0,997 produjo un decrecimiento marcado de la población de 1,5 log ufc/g en 24h, sin embargo éstos se mantuvieron estables durante todo el período de almacenamiento (~1 log ufc/g). La misma tendencia se observó a 37°C/6,5/0,997, aunque más leve con una disminución de 1,5 log ufc/g en 120h.

La pre-incubación a 15°C/6,5/0,960 y 37°C/5,5/0,960 supuso la supervivencia de la cepa y los niveles de inóculos se mantuvieron estables (~3 log ufc/g) hasta el final del experimento. Los resultados demostraron que la pre-incubación de *S. aureus* en caldo BHI con bajos niveles de a_w seguido de un almacenamiento en fiambre de pechuga de pollo, incrementó su capacidad de supervivencia.

RESPUESTAS DE CRECIMIENTO DE *S. AUREUS* EN FIAMBRE DE PECHUGA DE POLLO CORTADO EN LONCHAS ALMACENADA A 20°C

Los resultados indicaron un buen ajuste del Modelo de Baranyi y Roberts (1994) a los datos observados ($R^2 \geq 0,95$). La cepa de *S. aureus* fue capaz de crecer cuando las lonchas de fiambre de pechuga de pollo se almacenaron a 20°C (Figura 2, artículo publicado). Nuevamente, las respuestas de crecimiento en el cárnico fueron significativamente diferentes entre las condiciones de pre-incubación.

No hubo un efecto evidente de la mayoría de las condiciones de pre-incubación sobre μ_{max} puesto que no se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$), aunque la condición a 37°C/5,5/0,960 provocó una respuesta de crecimiento menor ($p < 0,05$). Sin embargo, éstas sí influyeron en la fase *lag* de la cepa. La pre-incubación de *S. aureus* a 10°C/6,5/0,997 provocó un período de adaptación de $46,66 \pm 11,81$ h con un

t_{inc} de $76,82 \pm 11,97h$. Se evidenció una fase *lag* más corta cuando *S. aureus* se pre-incubó a $15^{\circ}C/6,5/0,997$ y $15^{\circ}C/5,5/0,997$, aunque tardó más en adaptarse bajo esta última condición ($p < 0,05$). A $37^{\circ}C$, el efecto combinado de los niveles bajos de pH y a_w ($37^{\circ}C/5,5/0,960$) produjo un incremento significativo de la fase *lag* de la cepa, mientras que la pre-incubación bajo condiciones óptimas ($37^{\circ}C/6,5/0,997$) causó un periodo *lag* más corto ($p < 0,05$), lo que a su vez causó gran diferencia entre los t_{inc} (113,27 y 38,94h, respectivamente).

El aumento de la población de *S. aureus* en el cárnico cocido se correlacionó con la producción de SEA ya que todos los resultados fueron positivos ($\geq 0,13$).



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Meat Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meatsci

Effect of pre-incubation conditions on growth and survival of *Staphylococcus aureus* in sliced cooked chicken breast

Magdevis Y. Rodríguez-Caturla, Antonio Valero Díaz ^{*}, Juan Luis Reyes Vallejo, Rosa M^a García-Gimeno, Gonzalo Zurera Cosano

Department of Food Science and Technology, University of Córdoba, Campus of Rabanales, International Campus of Excellence in the AgriFood Sector (ceiA3), Darwin building-14014, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 February 2012
Received in revised form 13 April 2012
Accepted 9 May 2012

Keywords:

Cooked chicken breast
S. aureus
Pre-incubation
Growth
Survival
Enterotoxin

ABSTRACT

In this work, the effect of pre-incubation conditions (temperature: 10, 15, 37 °C; pH 5.5, 6.5 and water activity, a_w : 0.997, 0.960) was evaluated on the subsequent growth, survival and enterotoxin production (SE) of *Staphylococcus aureus* in cooked chicken breast incubated at 10 and 20 °C. Results showed the ability of *S. aureus* to survive at 10 °C when pre-incubated at low a_w (0.960) what could constitute a food risk if osmotic stressed cells of *S. aureus* which form biofilms survive on dried surfaces, and they are transferred to cooked meat products by cross-contamination. Regarding growth at 20 °C, cells pre-incubated at pH 5.5 and a_w 0.960 had a longer lag phase and a slower maximum growth rate. On the contrary, it was highlighted that pre-incubation at optimal conditions (37 °C/pH 6.5/ a_w 0.997) produced a better adaptation and a faster growth in meat products what would lead to a higher SE production. These findings can support the adoption of management strategies and preventive measures in food industries leading to avoid growth and SE production in meat products.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Consumption of sliced cooked meat products has increased in the last years mainly due to their convenience, high nutritional value and low cost (Álvarez-Astorga, Capita, Alonso-Calleja, Moreno, & García-Fernández, 2002). In these products, adequate handling during post-processing, careful control of the temperature and preservation technologies, like modified atmosphere packaging, have been reported to increase the safety and extend their shelf life (Jofre, Garriga, & Aymerich, 2008). Regarding food safety, *Staphylococcus aureus* has been widely reported as an opportunistic pathogen, most likely to grow on foods with reduced water activity (a_w) and increased percentage of water-phase salt, like ready-to-eat (RTE) meats (Wallin-Carlquist, Márta, Borch, & Radström, 2010). Specifically, chicken-by products have been involved in some outbreaks caused by this microorganism (Khakhria, Woodward, Johnson, & Poppe, 1997). Presence of *S. aureus* is often associated to contamination of raw material, such as poultry carcasses or raw chicken samples (Pesavento, Ducci, Comodo, & Lo Nostro, 2007) or cross-contamination events occurring as a consequence of mis-handling during processing and storage (Pérez-Rodríguez et al., 2007).

Growth and survival of *S. aureus* have been reported at low a_w (0.83 to 0.86), high salt concentrations up to 20%, and within a wide

pH (from 4 to 10, with an optimum of 6 to 7) and temperature range (6 to 48.5 °C, with an optimum of 35 to 41 °C) (Adams & Moss, 2008).

Food poisoning caused by *S. aureus* is attributed to the ingestion of foods that contain thermotolerant Staphylococcal Enterotoxins (SEs) in doses as few as 20–100 ng (Asao et al., 2003). The bacteriophage-encoded staphylococcal enterotoxin A (SEA) is the toxin most frequently reported to be involved in staphylococcal food poisoning (Kérouanton et al., 2007). A wide range of environmental factors such as pH, a_w , temperature, food type and processing conditions have been suggested to play an important role on SE production (Schelin et al., 2011). Generally, growth of *S. aureus* is necessary for SE production, although this phenomenon does not always accompany growth (Wallin-Carlquist et al., 2010). Indeed, some published studies consider hazardous *S. aureus* levels from 6 log cfu/g in contaminated foods for SE production (Lindqvist, Sylvén, & V gsholm, 2002).

However, in most cases, *S. aureus* cells contaminating sliced cooked meat products do not have an optimal physiological state. In suboptimal conditions, *S. aureus* is capable to initiate growth and the cells easily synthesize and secrete SEs developing stress responses (Ingham et al., 2009; Rode, Solveig, Holck, & Moretro, 2007). Most authors suggested that the bacterial adaptation depends on the type of stress and the exposure time, the combined effect of several environmental factors, the physiological state of cells or the type of matrix (Cebrián, Sagarzazu, Pagán, Condón, & Mañas, 2010; Rode et al., 2007; Wallin-Carlquist et al., 2010; Wesche, Gurtler, Marks, & Rysler,

^{*} Corresponding author. Tel.: +34 957 21 85 16; fax: +34 957 21 20 00.
E-mail address: bt2vadia@uco.es (A. Valero Díaz).

2009). Nevertheless, most of the published studies about pre-incubation conditions and subsequent growth of pathogens in broth media or food matrices generally assume that smaller environmental changes will yield shorter lag phases, although there is not so clear effect on generation times, as shown for other microorganisms like *Listeria monocytogenes* (Augustin, Rosso, & Carlier, 2000).

Despite that growth and survival of *S. aureus* in broth and food matrices have been extensively studied (Castillejo-Rodríguez, García-Gimeno, Zurera, Barco, & Rodríguez, 2002; Medvedová, Valík, & Studeničová, 2009; Sutherland, Bayliss, & Roberts, 1994; Valero et al., 2009), as well as SE production (Fujikawa & Morozumi, 2006) the impact of pre-incubation conditions on the subsequent *S. aureus* growth and SEA production in cooked meat products has not been yet further investigated. The objective of this research was to evaluate the behavior of a pathogenic *S. aureus* strain (ATCC 13565) in sliced cooked chicken breast at 10 and 20 °C storage, subjected to six different pre-incubation conditions (10 °C/pH 6.5/a_w 0.997; 15 °C/pH 6.5/a_w 0.997; 15 °C/pH 5.5/a_w 0.997; 15 °C/pH 6.5/a_w 0.960; 37 °C/pH 6.5/a_w 0.997 and 37 °C/pH 5.5/a_w 0.960) as well as the ability to produce staphylococcal enterotoxin A (SEA).

2. Material and methods

2.1. Bacterial strain and inoculum preparation

A lyophilized culture of an *S. aureus* strain (ATCC 13565) was used in this study. The strain was obtained from the Spanish Type Culture Collection (CECT, Burjassot, Valencia, Spain). The culture was rehydrated as indicated by manufacturer's instructions and the strain was maintained in frozen cryovials containing beads and cryopreservatives at –80 °C (MicroBank™). The strain was tested in Baird Parker Agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK) showing a typical growth in all cases. Afterwards, frozen cultures were transferred to –20 °C prior incubation. Three days before the experiment, stock cultures of the strain were transferred to a tube containing 10 ml of Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid) and incubated at 37 °C for 24 h. From this, 0.1 ml was subcultured into a tube containing 10 ml of BHI and incubated at 37 °C for 24 h. One more time, *S. aureus* was subcultured in the same way until the late exponential phase was reached (16–18 h).

2.2. Preparation of broth media and pre-incubation conditions

S. aureus was subjected to six pre-incubation conditions in BHI broth before its inoculation on cooked chicken breast slices. The inoculum concentration was adjusted to an optical density at 600 nm of 0.160 to 0.240 (Bioscreen C, LabSystems, Finland) following the procedure of Valero et al. (2009). Modified media were prepared by adding the desired quantities of sodium chloride (NaCl, Panreac 131659). The NaCl percentage was calculated considering the salt content of the initial BHI (5.0 g/l) and a_w was subsequently measured with a dew point hygrometer CX-1 (Decagon Devices, Inc., Pullman, Washington, USA). The pH was adjusted with a 1 M HCl solution (Panreac 181021, Barcelona, Spain) as required, and pH values were measured with a pH/mv-meter Basic 20 (Crison, Barcelona, Spain). Once modified, all media were sterilized (121 °C 15 min) and subsequently, a_w and pH values were checked. To prepare pre-incubation conditions, grown cultures were diluted in 9 ml BHI tubes. Modified BHI broth (50 ml) was inoculated with an aliquot of 1 ml of the prepared cell suspension, reaching an initial concentration of ~3 log cfu/ml. To determine the initial concentration, an aliquot of 0.1 ml was surface plated on Plate Count Agar (PCA, Oxoid), incubated at 37 °C for 24–48 h. Immediately after inoculation, the inoculated broths were subjected at six different pre-incubation conditions as a function of temperature/pH/a_w: 10 °C/6.5/0.997; 15 °C/6.5/0.997; 15 °C/5.5/0.997; 15 °C/6.5/0.960; 37 °C/6.5/0.997 and 37 °C/5.5/

0.960. Microbial growth was monitored in BHI at regular time intervals at each individual pre-incubation condition until the late exponential phase was reached (corresponding to a concentration of ~6 log cfu/ml). At each sampling point, 0.1 ml aliquots were surface plated on to PCA and subsequently incubated at 37 °C for 24 h. Control samples were also analyzed in order to assure absence of external contamination of the culture media.

2.3. Samples

Food samples (sliced cooked chicken breast) were purchased from a local supermarket and transported at refrigeration (4 °C) to the laboratory. Physico-chemical composition of the food product was kindly provided by the manufacturer (w/w): moisture contain (77.44%), fat content (0.77%), protein (15.53%), sodium chloride (3%), water-phase salt (4.25%) and sodium nitrite (39 ppm). 200 g-packages of sliced cooked chicken breast were opened and after autoclaving, individual slices were aseptically ground and transferred in a sterile, ice-chilled Stomacher bags. Measurements of pH and a_w of the samples were performed by duplicate before and after autoclaving to evaluate significant differences. Samples before autoclaving had values of pH and a_w of 6.17 ± 0.02 and 0.971 ± 0.003 respectively. After autoclaving the values of pH corresponded to 6.03 ± 0.01 and the values of a_w to 0.975 ± 0.003.

2.4. Inoculation of *S. aureus* on sliced cooked chicken breast and growth monitoring

Once *S. aureus* concentration reached ~6 log cfu/ml in the modified BHI broth, aliquots of 10 ml of grown suspension were transferred to centrifuge tubes. Cultured cells were harvested by centrifugation at 4000 rpm during 5 min and washed three times with a Phosphate Buffer Saline Solution (PBS, Oxoid). The supernatants were discarded and the remaining cells were resuspended in 1 ml of BHI, and half diluted in BHI broth (1:1). Cell concentration was adjusted by optical density in Bioscreen C. Afterwards Optical density (OD) values were converted into microbial counts through the use of a calibration equation (Valero et al., 2009). The inoculum was serially diluted in BHI and an aliquot of 0.1 ml was homogeneously distributed on the slices surface (~8 g) by using sterile hockey-stick-shaped glass rods. Inoculated slices (~3 log cfu/g) were aseptically air dried at 25 °C for 20 min into a flow chamber to facilitate the absorption of the inoculum. The slices were placed into 10 mm Petri dishes, sealed with paraffin to avoid dehydration and immediately incubated at 10 and 20 °C. After inoculation, duplicate inoculated and control samples per condition studied were diluted with physiological salt solution, homogenized in a Stomacher (Stomacher 400, Lab-Blender, Seward, England) during 30 s, plated on PCA and aerobically incubated at 37 °C for 24–48 h to check the initial contamination level (time 0). Uninoculated slices served as controls and were also analyzed at the same conditions to detect a possible contamination.

Growth was monitored at regular time intervals until the stationary phase was reached. At each time period, samples were collected and subjected to *S. aureus* analyses. Two samples were collected per time period using the spiral plate technique to culture PCA plates (Eddy Jet Spiral Plate, IUL, Barcelona, Spain). Typical colonies (brilliant yellow) were enumerated by using an automated colony counter (Flash and Go, IUL, Barcelona, Spain) and expressed as log cfu/g. Averages and standard deviations of the transformed values were then calculated. Biochemical tests like catalase, Gram stain and coagulase were done for selected colonies in PCA to verify pure cultures.

2.5. Staphylococcal enterotoxin A measurement

Staphylococcal enterotoxin A (SEA) production in cooked chicken breast slices was determined using an enzyme-linked fluorescent

immunoassay (ELFA), the VIDAS Staph Enterotoxin Test (BioMérieux, France) with the miniVIDAS automated system. All the tests were performed in duplicate and according to manufacturer's instructions for meat products. The test results were interpreted qualitatively and presence of SEA was assumed when the test value (TV) was ≥ 0.13 (positive) while absence was noted when the TV was < 0.13 (negative).

2.6. Data processing and modelling approach

A plot of log cfu/g versus time (in hours) was created for each separated experiment in Microsoft Excel (Microsoft Corporation). Replicate samples were averaged, while results for each experiment are presented separately. Growth data of *S. aureus* in broth and in cooked chicken breast slices were adjusted to the primary growth model of Baranyi and Roberts (1994) by using the DMFit excel program (Institute of Food Research, Norwich, England). Kinetic growth parameters; lag phase (lag, h) and maximum growth rate (μ_{\max} , h^{-1}) were estimated from the observed data at each condition studied. Mean Squared Error (MSE) and coefficient of determination (R^2) were determined to assess the goodness-of-fit of the model. From the estimated lag and μ_{\max} values in BHI broth and in cooked chicken breast slices, time to increase (t_{inc}) was calculated as the estimated time necessary for the population to reach 6 log cfu/g (Eq. (1)):

$$t_{\text{inc}} = \frac{N_f - N_0}{\mu_{\max}} + \text{lag} \quad (1)$$

where N_f is the concentration threshold (6 log cfu/g) and N_0 is the initial contamination.

Regarding survival data, they corresponded to observed values at 10 °C in cooked chicken breast slices. They were adjusted to the Weibull model using the GlnaFit software (Geeraerd, Valdramidis, & Van Impe, 2005). The Weibull model was chosen because it has a high flexibility to fit many type of data and has been considered appropriate to describe survival curves. According to the Weibull model, bacterial survival can be viewed as a failure phenomenon: failure of microorganisms to resist the harsh conditions (Peleg, 2006).

The Weibull model used to fit the data is shown in Eq. (2), which has two parameters, δ and p . The parameter δ is considered as a reaction rate constant and p as a shape index. This model reduces to a linear model when $p = 1$.

$$\log S_t = \log S_0 - \left(\frac{t}{\delta}\right)^p \quad (2)$$

Weibull model was fitted to all survival curves by using the Solver Add-in algorithm implemented in Excel and Mean Squared Error (MSE) and coefficient of determination (R^2) were determined to assess the goodness-of-fit of the estimated model.

2.7. Statistical analysis

The influence of the pre-incubation conditions on growth and survival parameters (lag, μ_{\max} , t_{inc} , δ and p) was evaluated through an analysis of variance (ANOVA) and post-hoc tests (i.e. Duncan test) were used to determine the homogeneous groups ($p < 0.05$) by using Statistica® version 10.0, (Statsoft Iberica, Portugal).

3. Results

3.1. *S. aureus* growth in BHI broth

The growth parameters and statistical indices of *S. aureus* under the pre-incubation conditions studied are shown in Table 1. The Baranyi model provided an acceptable adjustment to data observed

since R^2 values were higher than 0.94 and MSE lower than 0.50. *S. aureus* was able to grow under all pre-incubation conditions; however, significant differences were found for the lag phase and μ_{\max} as a function of the environmental conditions ($p < 0.05$).

Results showed that at 10 °C/pH 6.5/ a_w 0.997, *S. aureus* experimented a longer lag phase with high variability (59.99 ± 58.55 h) and a slower μ_{\max} ($0.01 \pm 1.00 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$). At higher incubation temperatures (15 °C and 37 °C) there was a faster growth of the strain regardless of the pH and a_w levels. At optimal pH and a_w , average lag phase increased from 4.44 h (37 °C) to 35.04 h (15 °C). Interaction of reduced pH and a_w values did not produce significant differences for the lag phase at 37 °C ($p > 0.05$). Regarding μ_{\max} values, growth was faster at 37 °C, but when pH and a_w were reduced, average μ_{\max} markedly decreased from 0.97 to 0.24 h^{-1} . At 15 °C and 10 °C, average μ_{\max} was below 0.12 h^{-1} in all cases. Significant differences did not exist ($p > 0.05$) between μ_{\max} at 15 °C/5.5/0.997 and μ_{\max} at 15 °C/6.5/0.960 but growth was significantly faster at 15 °C and at optimal pH and a_w ($p < 0.05$), as shown in Table 1. It is remarkable to note that, at 15 °C, reduction of a_w produced a slight delay on *S. aureus* growth since average lag phase increased from 35.04 to 44.66 h at 0.997 and 0.960, respectively ($p < 0.05$). Despite to the resistance of *S. aureus* to low a_w levels, as it can be seen in Table 1, the strain had a higher sensitivity to lower a_w levels (0.960) than to reduced pH values (5.5) at 15 °C because there was a longer lag phase at 15 °C/6.5/0.960 compared to the condition at 15 °C/5.5/0.997.

The late exponential phase (assumed to be reached when *S. aureus* population was around 6 log cfu/ml) was estimated for each studied condition in order to inoculate food samples. Using Eq. (1), time estimation was made at 7.64 h (37 °C/6.5/0.997); 29.43 h (37 °C/5.5/0.960); 59.87 h (15 °C/6.5/0.997); 74.97 h (15 °C/5.5/0.997); 106.66 h (15 °C/6.5/0.960) and 15.16 days for 10 °C/6.5/0.997.

3.2. Survival responses of *S. aureus* in cooked chicken breast slices stored at 10 °C

In this study, the suboptimal pre-incubation conditions in BHI broth caused significant changes in the survival capacity of *S. aureus* when inoculated on cooked chicken breast slices and stored at 10 °C. Results obtained from the pre-incubation conditions studied are presented in Fig. 1. It can be seen that a decay in *S. aureus* population was observed when pre-incubated at 10 °C/6.5/0.997 (1.2 log cfu/g in 144 h storage) and at 15 °C/6.5/0.997 (0.67 log cfu/g in 240 h storage). Non viable cells were detected at 360 and at 480 h (concentration below the theoretical detection limit of the technique: 1 cfu/~8 g). Therefore, the pre-incubation temperature of 10 °C and 15 °C at optimal pH and a_w levels did not increase the survival capacity of *S. aureus* during a subsequent storage at 10 °C in cooked chicken breast (Fig. 1a and b). Pre-incubation at 15 °C/5.5/0.997 (Fig. 1c) produced a marked decay in *S. aureus* since population decreased by 1.5 log cfu/g in 24 h. However, levels remained stable during the storage period (~1 log cfu/g). The same trend was observed in Fig. 1d (pre-incubation at 37 °C/6.5/0.997) although a slighter decrease was obtained (1.5 log cfu/g in 120 h). Interestingly, in Fig. 1e and f, survival of *S. aureus* was produced since levels remained stable during the incubation period (~3 log cfu/g). Due to this fact, the Weibull model could not be adjusted in both cases. This phenomenon corresponded to the pre-incubation conditions at a_w 0.960. Thus, the pre-incubation in BHI broth at low a_w followed by storage in cooked chicken breast increased the survival capacity of *S. aureus*.

The Weibull showed an acceptable fit mainly due to the values of R^2 (≥ 0.70). However, there were cases where some variability of the data was observed and the goodness-of-fit of the Weibull model was reduced. The regression parameters and statistical values for the fitted models are presented in Table 2. In general, the survival curves followed different non-linear patterns showing, in some cases, with a

Table 1
Estimated growth of *Staphylococcus aureus* in BHI broth under six pre-incubation conditions.

Pre-incubation conditions				Estimated kinetic parameters					
Conditions	T (°C)	pH	a _w	Lag (h) ¹	μ _{max} (h ⁻¹) ²	y ₀ (log cfu/ml) ³	y _{max} (log cfu/ml) ⁴	MSE	R ²
1 (12) ⁵	10	6.5	0.997	59.99 ± 58.55 ^c	0.01 ± 1.00 × 10 ⁻³ ^a	2.60 ± 0.07 ^a	8.65 ± 0.30 ^b	0.50	0.94
2 (11)	15	6.5	0.997	35.04 ± 4.70 ^b	0.12 ± 0.01 ^c	2.80 ± 0.07 ^a	8.04 ± 0.15 ^b	0.39	0.98
3 (12)	15	6.5	0.960	44.66 ± 16.08 ^c	0.05 ± 0.01 ^b	3.13 ± 0.11 ^a	9.27 ± 0.32 ^b	0.50	0.95
4 (12)	15	5.5	0.997	18.17 ± 5.82 ^a	0.05 ± 3.00 × 10 ⁻³ ^b	2.47 ± 0.05 ^a	8.47 ± 0.10 ^b	0.17	0.99
5 (11)	37	6.5	0.997	4.44 ± 0.68 ^a	0.97 ± 0.12 ^e	2.84 ± 0.08 ^a	9.11 ± 0.24 ^a	0.41	0.97
6 (10)	37	5.5	0.960	17.14 ± 1.80 ^a	0.24 ± 0.03 ^d	2.88 ± 0.23 ^a	9.28 ± 0.35 ^b	0.26	0.95

¹Lag phase; ²maximum growth rate; ³initial inoculum level; ⁴maximum population density; ⁵number of observed data for fitting is expressed between brackets.
^{a-e}Different superscripts letters in a same column correspond to the different homogeneous groups according to the Duncan's test.

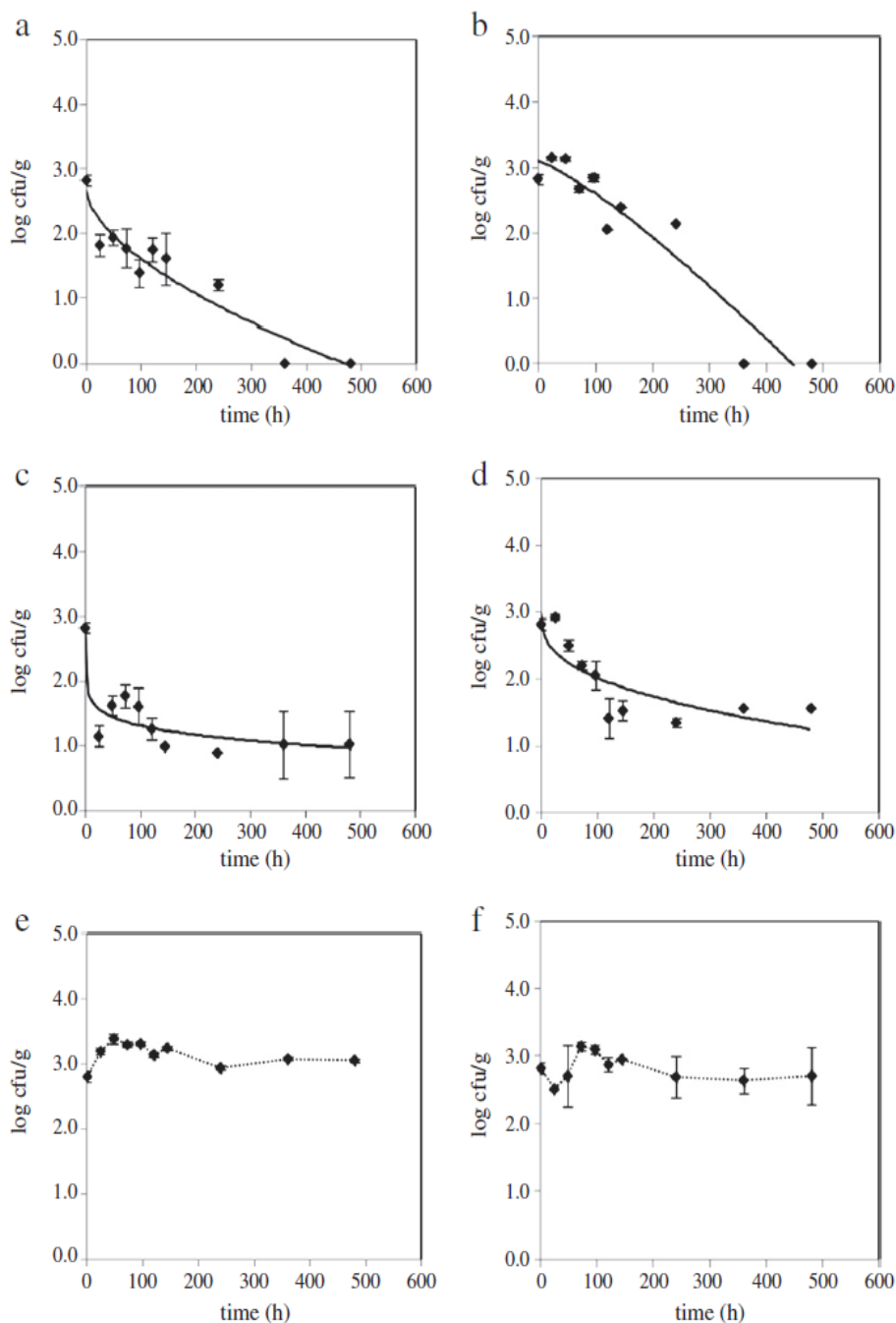


Fig. 1. Stress responses of *Staphylococcus aureus* in cooked chicken breast incubated at 10 °C: Pre-incubation conditions: (a) 10 °C/6.5/0.997; (b) 15 °C/6.5/0.997; (c) 15 °C/5.5/0.997; (d) 37 °C/6.5/0.997; (e) 15 °C/6.5/0.960 and (f) 37 °C/5.5/0.960. (♦) log cfu/g; (—) fitted Weibull model (figures a to d).

Table 2

Estimated behavior of *Staphylococcus aureus* in cooked chicken breast slices incubated at 10 °C by Weibull model.

Pre-incubation conditions				Estimated survival parameters				
Conditions	T (°C)	pH	a _w	δ ^a	P ^a	MSE	R ²	R ² adjusted
1 (10) ^b	10	6.5	0.997	91.35 ± 49.06	0.60 ± 0.16	0.09	0.91	0.88
2 (10)	15	6.5	0.997	175.69 ± 59.58	1.22 ± 0.38	0.17	0.90	0.87
3	15	6.5	0.960	– ^c	–	–	–	–
4 (10)	15	5.5	0.997	4.56 ± 12.57	0.13 ± 0.07	0.08	0.81	0.76
5 (10)	37	6.5	0.997	115.13 ± 123.93	0.38 ± 0.19	0.14	0.70	0.61
6	37	5.5	0.960	–	–	–	–	–

^a Parameters of Weibull model.

^b Number of observed data for fitting is expressed between brackets.

^c Unadjusted data by the Weibull model.

notorious tailing effect, or upward and downward concavity. The observed tails showed in Fig. 1c and d, would suggest the existence of a residual subpopulation resistant to environmental stress showing a lower reduction rate.

Although final microbial counts did not reach 5 log cfu/g, samples were submitted to SEA analysis. Negative results were obtained for all samples analyzed.

3.3. Growth responses of *S. aureus* in cooked chicken breast slices stored at 20 °C

Observed data on growth of *S. aureus* in cooked chicken breast were fitted by the Baranyi model. The estimated kinetic parameters (μ_{\max} , t_{inc} and lag) together with statistical values (MSE and R²) are presented in Table 3. The results obtained indicated a reasonable fit to Baranyi model, due to the high values of R² (≥ 0.95). *S. aureus* was able to grow when the slices were incubated at 20 °C, as shown in Fig. 2. Again, significant differences between pre-incubation conditions were observed for the growth responses in cooked chicken breast. The combined actions of factors such as pH, a_w and temperature played an important role in the subsequent growth of *S. aureus*. As it can be seen in Table 3, no clear effect of pre-incubation conditions on μ_{\max} occurred, since no significant differences were detected ($p > 0.05$) apart from the pre-incubation at 37 °C/5.5/0.960 which caused a lower μ_{\max} ($p < 0.05$). Regarding lag phase significant differences were obtained ($p < 0.05$) among the studied pre-incubation conditions. The pre-incubation of *S. aureus* at 10 °C/6.5/0.997 produced a value of 46.66 ± 11.81 h with a t_{inc} of 76.82 ± 11.97 h. A lower lag phases were noted when *S. aureus* was pre-incubated at 15 °C/6.5/0.997 and at 15 °C/5.5/0.997 thus indicating a better adaptation. However, pre-incubation at 15 °C/5.5/0.997 caused a significantly longer lag phase ($p < 0.05$).

Table 3

Estimated growth of *Staphylococcus aureus* in cooked chicken breast at 20 °C by Baranyi model.

Pre-incubation conditions				Estimated kinetic parameters						
Conditions	T (°C)	pH	a _w	Lag (h) ¹	μ_{\max} (h ⁻¹) ²	y ₀ (log cfu/g) ³	y _{max} (log cfu/g) ⁴	t _{inc} (h) ⁵	MSE	R ²
1 (9) ⁶	10	6.5	0.997	46.66 ± 11.81 ^d	0.12 ± 0.04 ^a	2.38 ± 0.42 ^a	8.42 ± 0.39 ^b	76.82 ± 11.97 ^c	0.62	0.95
2 (9)	15	6.5	0.997	29.50 ± 7.22 ^{bc}	0.14 ± 0.04 ^a	2.76 ± 0.25 ^a	8.08 ± 0.18 ^a	52.64 ± 8.75 ^{ab}	0.31	0.98
3 (11)	15	6.5	0.960	20.56 ± 7.10 ^{ab}	0.08 ± 0.01 ^a	3.01 ± 0.28 ^a	9.35 ± 0.26 ^c	57.94 ± 9.97 ^{ab}	0.28	0.99
4 (11)	15	5.5	0.997	45.22 ± 5.27 ^c	0.16 ± 0.03 ^a	2.73 ± 0.31 ^a	8.46 ± 0.33 ^b	65.66 ± 6.79 ^c	0.50	0.96
5 (13)	37	6.5	0.997	10.76 ± 6.40 ^a	0.11 ± 0.02 ^a	2.90 ± 0.34 ^a	9.16 ± 0.17 ^c	38.94 ± 8.29 ^a	0.34	0.98
6 (10)	37	5.5	0.960	42.52 ± 14.57 ^c	0.04 ± 0.01 ^a	3.17 ± 0.30 ^a	9.54 ± 0.60 ^c	113.27 ± 49.70 ^d	0.46	0.95

¹Lag phase; ²maximum growth rate; ³initial inoculum level; ⁴maximum population density; ⁵time to increase, defined as the estimated time necessary for the *S. aureus* population to reach 6 log cfu/g; ⁶number of observed data for fitting is expressed between brackets; ^{a-d}different superscripts letters in a same column correspond to the different homogeneous groups according to the Duncan's test.

In our study, it is remarkable to note that, at 37 °C, interaction of reduced pH and a_w values increased significantly the lag phase while pre-incubation at optimal conditions (37 °C/6.5/0.997) caused the shortest lag phase period in the inoculated cooked chicken breast slices ($p < 0.05$). This produced a large difference in t_{inc} values (113.27 and 38.94 h respectively). When the population reached ~5 log cfu/g, food samples were subjected to SEA analysis. The increased cell density was correlated to SEA production since all results were positive (TV ≥ 0.13).

4. Discussion

The results obtained in BHI broth demonstrated that incubation temperature had a strong effect on *S. aureus* growth in BHI broth, as widely reported in other studies (Lanciotti, Sinigaglia, Gardini, Vannini, & Guerzoni, 2001). A longer lag phase values and slower growth was obtained at 10 °C, as shown by Valero et al. (2009), who found that *S. aureus* could grow slowly at low temperatures (<10 °C) only at optimum levels of pH (>6.0) and a_w (0.990–0.997). Sutherland et al. (1994) reported slightly higher μ_{\max} and similar lag phase values at 10 °C/pH 6.59/NaCl 2.5% (0.029 h⁻¹ and 63.85 h respectively). Nevertheless, the behavior of *S. aureus* at 10 °C could experiment variation in μ_{\max} depending on the strain and type of culture media used. Walker and Harmon (1965) studied growth of *S. aureus* in broth and μ_{\max} ranged between 0.0157 and 0.0172 h⁻¹.

On the other hand, faster growth was observed at 37 °C. At optimal growth conditions, values of μ_{\max} higher than 0.94 h⁻¹ were also obtained in other studies (Iandolo, Ordal, & Witter, 1964). In turn, Medvedová et al. (2009) demonstrated that the increasing amounts of NaCl in BHI broth caused a prolonged lag phase and slower μ_{\max} at 15 °C. Surprisingly, in our study, lag phase at 15 °C/5.5/0.997 was lower than the obtained at 15 °C/6.5/0.997 (18.17 and 35.04 h, respectively) but this difference can be attributed to the high variability found in the observed values, which is often associated to lag phase (Swinnen, Bernaerts, Dens, Geeraerd, & Van Impe, 2004). It is well known that *S. aureus* is a salt-tolerant bacterium, but many studies agree that the adaptation and growth responses to a reduced a_w values vary depending on the strain, incubation temperature, types of humectants and physical properties of solute (Ballesteros, Chirife, & Bozzini, 1993; Lanciotti et al., 2001; Stewart et al., 2002).

Regarding survival responses of pre-incubated *S. aureus* cells at low a_w, it was shown an increased survival at 10 °C in cooked chicken breast (NaCl = 3% w/w). These are consistent results according to Whiting, Sackitey, Calderone, Merely, and Phillips (1996) who found that added salt concentrations increased survival times in broth. Addition of salt is also known to increase the resistance of *S. aureus* to thermal treatments (Bergdoll, 1989). Despite this, no fair comparisons can be done because most studies performed on *S. aureus* did not include pre-incubation effect and additional environmental factors, initially present in the food (sodium nitrite, fat

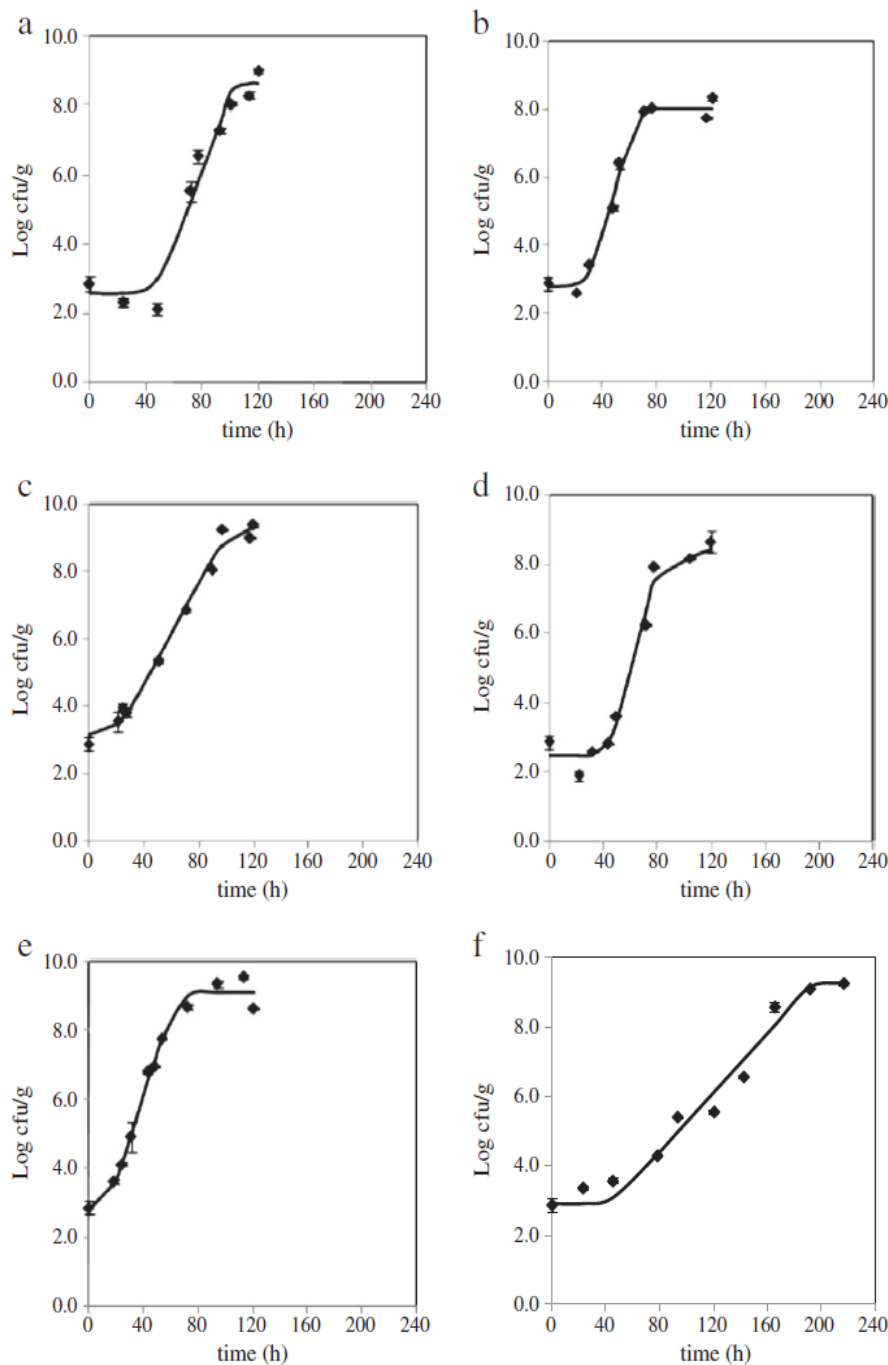


Fig. 2. *Staphylococcus aureus* growth responses in cooked chicken breast slices at 20 °C. Pre-incubation conditions: (a) 10 °C/6.5/0.997; (b) 15 °C/6.5/0.997; (c) 15 °C/6.5/0.960; (d) 15 °C/5.5/0.997; (e) 37 °C/6.5/0.997 and (f) 37 °C/5.5/0.960. (♦) log cfu/g; (—) fitted Baranyi model.

composition etc.) which could have influenced survival of *S. aureus* in our study.

SEA production was analyzed at the end of the storage period (480 h) giving negative results in all cases. This fact supports the results obtained by Bremer, Fletcher, and Osborne (2004) who showed that SE production only occurs at temperatures above 10 °C.

The resistant subpopulations represented in Fig. 1c and d could be associated to the biofilm formation on the meat surface, which may prolong the survival period. Several studies have shown attachment of different microorganism, including *S. aureus* to poultry surfaces and meat (Dodd, Chaffey, & Waites, 1988; Pérez-Rodríguez et al., 2007). They found that these are parts of the flora in food processing

facilities, thus were not only associated with the slaughtering process, and represented a source of cross-contamination of food (Baird-Parker, 2000). As demonstrated in our study, if osmotic stressed cells of *S. aureus* which form biofilms survive at low a_w levels in surfaces, and they are transferred to cooked meat products by cross-contamination, *S. aureus* can survive in the food if stored at a temperature higher than 10 °C. This fact could cause a particular food safety issue if the SE is already performed in the food and reaches hazardous levels for human health.

Finally, growth responses of *S. aureus* at 20 °C indicated significant differences among the pre-incubation conditions studied. The effect of temperature on *S. aureus* growth was considered by Castillejo-

Rodríguez et al. (2002) as the main factor regulating the growth of *S. aureus* on cooked ham, turkey and chicken breast. No growth was observed at temperatures lower than 13.5 °C in chicken breast samples. At 13.5 °C and 17.7 °C there was a decrease of the lag phase (151.3 and 40.2 h respectively) and a slight (not significant) increase of μ_{\max} at 17.7 °C.

The effect of pre-incubation conditions on *S. aureus* growth in meat product has been hardly studied. Results obtained have shown that pre-incubation of cells at low a_w originated a higher resistance at refrigeration temperatures to the detriment of slower growth at higher temperatures. Additionally, interaction with pH has also been demonstrated to influence lag phase values. Martínez, Bonino, and Alzamora (1986) studied the effects of a_w and initial pH levels, in the growth of *S. aureus* in a model salami. They observed that the synergic action of low a_w (0.925–0.900) and pH levels (6.00–5.00) at 25 °C, together with the addition sodium nitrite and nitrates caused an increase of the lag phase during storage. Nevertheless, although growth was delayed, SEA was produced. Wallin-Carlquist et al. (2010) evaluated growth and survival of *S. aureus* in four different pork products: boiled ham, Serrano ham, smoked ham and black pepper salami. Water activity levels ranged from 0.90 to 0.99. *S. aureus* was able to grow at room temperature for 7 days. Growth levels were situated around 10^8 cfu/g in boiled ham and smoked ham. *S. aureus* slightly grew in Serrano ham ($\Delta\text{Log}=1$), but it was unable to grow in black pepper salami, probably by factors such as low pH levels, a_w , fat content or competing microbiota of the product.

On the other hand, several studies describe the influence of pre-incubation conditions on other microorganisms such as *L. monocytogenes*. For example, Whiting and Bagi (2002) found that physiological state of cells influence on lag phase. They found that exponentially growing cells had the shortest lag phases, stationary phase and starved cells' lag durations were longer, and desiccated cells exhibited the longest lag phases. In our study, it would be possible that the proportion of starved or desiccated cells pre-incubated at optimal conditions was lower than those pre-incubated at pH 5.5 and/or a_w 0.960. Thus, a shorter adaptation of those cells pre-incubated at optimal conditions during a subsequent growth at 20 °C would be expected. Alternatively, few studies have evaluated other additional effects such as strain type or food matrix, which are reported to influence *S. aureus* growth (Ingham et al., 2009). In spite of all these premises, it would be needed to study in depth the molecular mechanisms influencing the behavior of pre-incubated stressed *S. aureus* cells in meat products.

5. Conclusions

In our study, the pre-incubation conditions influenced on the subsequent growth and survival of *S. aureus* in cooked chicken breast. Low a_w produced an increase in the survival capacity of *S. aureus* cells at 10 °C. However, further studies are needed to better evaluate this effect (e.g. addition of preservatives, solutes, survival in dynamic environments, or studies with different strains). Whatever the pre-incubation condition studied, refrigeration at temperatures below 10 °C caused an inhibition in *S. aureus* growth and SE formation. On the other hand, growth was observed at 20 °C although a pre-incubation at pH 5.5 and a_w 0.960 produced a longer lag phase and a reduced μ_{\max} in cooked chicken breast samples. Although SEA production was not affected at 20 °C, in this study it was highlighted that pre-incubation at optimal conditions (37 °C/6.5/0.997) can produce a better adaptation and a faster growth in RTE meat products what would lead to a higher SEA production.

Moreover results obtained in this study gain insight about the behavior of pre-incubated *S. aureus* cells in meat products. These findings can support the adoption of management strategies and preventive measures in food industries leading to avoid growth and SE production in RTE meat products.

Acknowledgments

This work was partly financed by the AGR-01879 Excellence Project (Andalusia Government), CTS-P08-03620 project (Junta de Andalucía, Spain), European ERDF funding and by a grant awarded by the International Cooperation and Development Spanish Agency (AECID). D. Fernando Garcia-Viejo, veterinarian of the Andalusia Health Service is greatly acknowledged for his kind support in the development of this work.

References

- Adams, M. R., & Moss, M. O. (2008). *Bacterial agents of foodborne illness—Staphylococcus aureus*. Food microbiology. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Álvarez-Astorga, M., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B., & García-Fernández, M. (2002). Microbiological quality of retail chicken by-products in Spain. *Meat Science*, 72, 45–50.
- Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., et al. (2003). An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiology and Infection*, 130, 33–40.
- Augustin, J. C., Rosso, L., & Carlier, V. (2000). A model describing the effect of temperature history on lag time for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 57, 169–181.
- Baird-Parker, T. C. (2000). *Staphylococcus aureus. The microbiological safety and quality of food*. Gaithersburg: Aspen Publishers Inc.
- Ballesteros, S. A., Chirife, J., & Bozzini, J. P. (1993). Specific solute effects on *Staphylococcus aureus* cells subjected to reduced water activity. *International Journal of Food Microbiology*, 20, 51–66.
- Baranyi, J., & Roberts, T. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277–294.
- Bergdoll, M. S. (1989). *Staphylococcus aureus*. In M. P. Doyle (Ed.), *Foodborne bacterial pathogens* (pp. 463–523). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Bremer, P. J., Fletcher, G. C., & Osborne, C. (2004). *Staphylococcus aureus*. Christchurch, New Zealand: New Zealand institute for crop and food research limited.
- Castillejo-Rodríguez, A. M., García-Gimeno, R. M., Zurera, C. G., Barco, A. E., & Rodríguez, P. M. R. (2002). Assessment of mathematical models for predicting *Staphylococcus aureus* growth in cooked meat products. *Journal of Food Protection*, 65, 659–665.
- Cebrián, G., Sagarzazu, N., Pagán, R., Condón, S., & Mañas, P. (2010). Development of stress resistance in *Staphylococcus aureus* after exposure to sublethal environmental condition. *International Journal of Food Microbiology*, 140, 26–33.
- Dodd, C. E., Chaffey, B., & Waites, W. (1988). Plasmid profiles as indicators of the source of contamination of *Staphylococcus aureus* endemic within poultry processing plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 1541–1549.
- Fujikawa, H., & Morozumi, S. (2006). Modelling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. *Food Microbiology*, 23, 260–267.
- Geeraerd, A. H., Valdramidis, V. P., & Van Impe, J. F. (2005). GlnaFit, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 95–105.
- Iandolo, J. J., Ordal, Z. J., & Witter, L. D. (1964). The effect of incubation temperature and controlled pH on the growth of *Staphylococcus aureus* MF 31 at various concentrations of NaCl. *Canadian Journal of Microbiology*, 10, 808–811.
- Ingham, S. C., Ingham, B. H., Borneman, D., Jaussaud, E., Schoeller, E. I., Hoftiezer, N., et al. (2009). Predicting pathogen growth during short-term temperature abuse of raw sausage. *Journal of Food Protection*, 72, 75–84.
- Jofre, A., Garriga, M., & Aymerich, T. (2008). Inhibition of *Salmonella* sp. *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in cooked ham by combining antimicrobials, high hydrostatic pressure and refrigeration. *Meat Science*, 78, 53–59.
- Kérouanton, A., Hennekinne, J. A., Leterre, C., Petit, L., Chesneau, O., Brisabois, A., et al. (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 369–375.
- Khakhria, R., Woodward, D., Johnson, W. M., & Poppe, C. (1997). *Salmonella* isolated from humans, animals, and other sources in Canada. *Epidemiology and Infection*, 119, 15–23.
- Lanciotti, R., Sinigaglia, M., Gardini, F., Vannini, L., & Guertoni, M. E. (2001). Growth/no growth interfaces of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* in model systems based on water activity, pH, temperature and ethanol concentration. *Food Microbiology*, 18, 659–668.
- Lindqvist, R., Sylvén, S., & Vgsholm, I. (2002). Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 155–170.
- Martínez, E. J., Bonino, N., & Alzamora, S. M. (1986). Combined effect of water activity, pH and additives on growth of *Staphylococcus aureus* in model salami systems. *Food Microbiology*, 3, 321–329.
- Medvedová, A., Valík, L., & Studeničová, A. (2009). The effect of temperature and water activity on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Czech Journal of Food Science*, 27, S228–S235.
- Peleg, M. (2006). *Advanced quantitative microbiology for foods and biosystems*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Todd, E. C. D., Carrasco, E., García-Gimeno, R. M., & Zurera, G. (2007). Modeling transfer of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* during slicing of cooked meat product. *Meat Science*, 76, 692–699.

- Pesavento, G., Ducci, B., Comodo, N., & Lo Nostro, A. (2007). Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: a research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Food Control*, 18, 196–200.
- Rode, T. M., Solveig, L., Holck, A., & Moretro, T. (2007). Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 116, 372–383.
- Schelin, J., Wallin-Carlquist, N., Thorup, M. C., Lindqvist, R., Barker, G. C., & Rådström, P. (2011). The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence*, 2, 580–592.
- Stewart, C. M., Cole, M. B., Legan, J. D., Slade, L., Vandeven, M. H., & Schaffner, D. W. (2002). *Staphylococcus aureus* growth boundaries: moving towards mechanistic predictive models based on solute-specific effects. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1864–1871.
- Sutherland, J. P., Bayliss, A. J., & Roberts, T. A. (1994). Predictive modelling of growth of *Staphylococcus aureus*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *International Journal of Food Microbiology*, 21, 217–236.
- Swinnen, I. A., Bernaerts, K., Dens, E. J., Geeraerd, A. H., & Van Impe, J. F. (2004). Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 137–159.
- Valero, A., Pérez-Rodríguez, F., Carrasco, E., Fuentes-Alventosa, J. M., García-Gimeno, R. M., & Zurera, G. (2009). Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: effect of temperature, pH and water activity. *International Journal of Food Microbiology*, 133, 186–194.
- Walker, G. C., & Harmon, L. G. (1965). The growth and resistance of *Staphylococcus aureus* in milk and broth substrates. *Journal of Food Science*, 30, 351–358.
- Wallin-Carlquist, N., Márta, D., Borch, E., & Rådström, P. (2010). Prolonged expression and production of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in processed pork meat. *International Journal of Food Microbiology*, 141, S69–S74.
- Wesche, A. M., Gurtler, J. B., Marks, B. P., & Ryser, E. (2009). Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 72, 1121–1138.
- Whiting, R. C., & Bagi, L. K. (2002). Modelling the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 291–295.
- Whiting, R. C., Sackitey, S., Calderone, S., Merely, K., & Phillips, J. G. (1996). Model for the survival of *Staphylococcus aureus* in nongrowth environments. *International Journal of Food Microbiology*, 31, 231–243.

5. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

PRIMERA:

Los cuestionarios desarrollados o checklist constituyeron un método eficaz para la evaluación de las condiciones higiénicas y sanitarias, las prácticas de manipulación y de las condiciones microbiológicas de los platos preparados en centros de restauración colectiva destinados a sectores de población sensibles, revelando deficiencias en las prácticas higiénicas como uso y cambio de guantes, correcto lavado de las manos, eficacia de métodos de limpieza y correcta manipulación de los alimentos. (Esta conclusión se desprende de las Publicaciones 1, 2 y 3).

SEGUNDA:

Los resultados demuestran que las prácticas de limpieza y desinfección no se realizaron con el mismo grado de exigencia para todas las superficies de trabajo, y advierten del posible desconocimiento por parte del personal sobre la importancia de determinadas superficies de trabajo como vías de contaminación cruzada ya que se hallaron niveles elevados de contaminación por *Aerobios mesófilos* (>10 ufc/cm²) y *Enterobacterias* (>1 ufc/cm²) (como las tablas de corte y grifos). Por este motivo se sugirió conveniente la verificación de los sistemas higiénicos de limpieza y desinfección de las superficies de trabajo en contacto con los alimentos y los manipuladores en los establecimientos estudiados (Esta conclusión se desprende de las Publicaciones 1, 2 y 3).

TERCERA:

Los análisis microbiológicos de los platos preparados de ensalada vegetales y cárnicos cocidos procedentes de los establecimientos de restauración colectiva estudiados, dieron como resultado la ausencia de patógenos como *Listeria monocytogenes* o *Salmonella* sp. Sin embargo, se detectó la presencia de *E. coli* en el 7,6% de las muestras de ensaladas y de *Staphylococcus coagulasa positivos* en buena parte de las muestras de cárnicos cocidos listos para el consumo. Este hecho indica que pueden mejorarse los procedimientos de manipulación y las condiciones de almacenamiento y distribución de platos preparados, para evitar la presencia y crecimiento de microorganismos en niveles considerados, causantes de posibles brotes de toxiinfecciones alimentarias. (Esta conclusión se desprende de las Publicaciones 1, 2 y 3).

CUARTA:

El empleo de los modelos de crecimiento y de Probabilidad para estimar el comportamiento de serotipos patogénicos de *E. coli*, es de gran interés para la industria alimentaria en vista a incrementar la seguridad microbiológica en alimentos refrigerados listos para el consumo. Se observó la existencia de diferencias en el comportamiento cinético (en caldo de cultivo) de los cuatro serotipos

patogénicos de *E. coli* investigados, debido a la variabilidad en los valores obtenidos de fase de latencia y tasa máxima de crecimiento. Además, se hallaron diferencias entre los dos niveles de contaminación estudiados, de modo que a mayor nivel de inóculo se produjo una disminución de la fase de latencia y un aumento de la tasa de crecimiento. El serotipo O158:H23 presentó una mayor resistencia a condiciones de Temperatura y pH limitantes, así como un crecimiento más rápido, por lo que fue seleccionado para la elaboración de los modelos predictivos de Probabilidad de crecimiento. (Esta conclusión se desprende de la Publicación 4).

QUINTA:

Los modelos predictivos de Probabilidad de crecimiento desarrollados mediante Regresión Logística explicaron con suficiencia los valores observados, proporcionando un buen ajuste de los datos ya que más del 96,7% de los casos fueron correctamente clasificados. Se pone de manifiesto el peso del factor Temperatura en el crecimiento de *E. coli*. Así, las estimaciones generadas dieron como resultado que el crecimiento de *E. coli* puede ser inhibido a 8°C, manteniendo niveles de pH y a_w inferiores a 5,50 y 0,990, respectivamente. Sin embargo, un aumento de Temperatura hasta 12 o 16°C puede producir el crecimiento de *E. coli* a pH 5,00 y valores de a_w superiores a 0,970. Asimismo, las predicciones generadas por el modelo proporcionan una mayor seguridad y fiabilidad en su aplicación por parte de la industria alimentaria (Esta conclusión se desprende de la Publicación 4).

SEXTA:

Los valores de tiempo de detección obtenidos a partir de mediciones turbidimétricas cuantificaron satisfactoriamente el comportamiento cinético de *E. coli* O158:H23 bajo distintas condiciones de Temperatura, pH y a_w . Los resultados manifiestan la existencia de un aumento de la variabilidad asociada a 8°C, pH 5,50 y a_w 0,990, existiendo al mismo tiempo diferencias significativas entre los niveles de contaminación estudiados. Este hecho indica que la presencia de *E. coli* en el alimento a unos niveles de concentración elevados supone que el crecimiento ocurrirá en un tiempo de almacenamiento corto, por lo que se hace imprescindible la aplicación de medidas conducentes a su inhibición para garantizar la seguridad alimentaria (Esta conclusión se desprende de la Publicación 4)

SÉPTIMA

Se comprobó que el mantenimiento de la lechuga iceberg a 8°C causó una inhibición de la población de *E. coli* O158:H23. Las Temperaturas superiores a 12°C pueden propiciar el crecimiento de *E. coli*, incluso a niveles de contaminación considerados bajos (2,5 log ufc/g). Así, a Temperaturas de abuso (24°C) se produjo un incremento considerable de la población, superior a 1 log ufc/g durante 6h. Esto confirma que en un ambiente de restauración colectiva, el mantenimiento de los alimentos a Temperaturas de refrigeración constituye un método de conservación eficaz para inhibir el crecimiento de *E. coli*. (Esta conclusión se desprende de la Publicación 5)

OCTAVA:

La utilización de los modelos predictivos junto con el uso de métodos de simulación de MonteCarlo para estimar la variabilidad en el incremento logarítmico de *E. coli* O158:H23 en lechuga iceberg, constituyó una metodología original y alternativa a la cuantificación del crecimiento microbiano con respecto al cálculo de los parámetros cinéticos convencionales. Los resultados de la simulación indicaron que a un nivel bajo de contaminación (2,5 log ufc/g) las distribuciones de probabilidad estuvieron sesgadas hacia un menor incremento logarítmico. No obstante, en hospitales y centros geriátricos existieron diferencias significativas entre los niveles de contaminación evaluados (4,5; 3,5 y 2,5 log ufc/g) ($p < 0,05$), no manifestándose estas diferencias en los comedores escolares. (Esta conclusión se desprende de la Publicación 5).

NOVENA:

El estado fisiológico de la cepa de *S. aureus* influyó sobre el crecimiento y supervivencia en fiambre de pechuga de pollo cortado en lonchas y mantenido a 10 y 20°C. Así las condiciones de pre-incubación limitantes de a_w (0,960) produjeron un incremento de la capacidad de supervivencia de las células de *S. aureus* a 10°C. No obstante, sería útil profundizar en nuevos estudios que permitan evaluar mejor este efecto, como por ejemplo, estudios sobre la adición de conservantes, solutos, o supervivencia de *S. aureus* en condiciones dinámicas de Temperatura. Las condiciones de pre-incubación a pH 5,5 y a_w 0,960 produjeron una fase de latencia más larga y una tasa de crecimiento inferior en el alimento incubado a 20°C. Por el contrario, las condiciones óptimas de pre-incubación de la cepa (37°C/pH 6,5/ a_w 0,997) resultaron en una mejor adaptación y un crecimiento más rápido de *S. aureus* propiciando la producción de enterotoxinas estafilocócicas A en un tiempo de almacenamiento más corto (Esta conclusión se desprende de la Publicación 6).

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aarnisalo, K., Sheen, S., Raaska, L., y Tamplin, M. (2007) Modelling transfer of *Listeria monocytogenes* during slicing of 'gravad' salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 118(1): 69–78.
2. Abadias, M., Alegre, I., Usall, J., Torres, R. y Viñas, I. (2011) Evaluation of alternative sanitizers to chlorine disinfection for reducing. *Postharvest Biology and Technology*, 59 (3): 289–297.
3. Abadias, M., Usall, J., Oliveira, M., Alegre, I. y Viñas, I. (2008) Efficacy of neutral electrolyzed water (NEW) for reducing microbial contamination on minimally-processed vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 123 (1–2):151–158.
4. Abdul-Raouf, U.M., Beuchat, L.R., Ammar, M.S. (1993) Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables U.M. *Applied and Environmental Microbiology*: 1999-2006.
5. Albin, M.S., Bunegin, L., Duke, E.S., Ritter, R.R. y Page, C.P. (1992) Anatomy of a defective barrier: sequential glove leak detection in a surgical and dental environment. *Critical Care Medicine*, 20:170–184.
6. Allwood, P.B., Jenkins, T., Paulus, C., Johnson, L., Hedberg, C.W. (2004) Hand washing compliance among retail food establishment workers in Minnesota. Research Note. *Journal of Food Protection*, 67 (12): 2825–2828.
7. Al-Mutairi, M.F. (2011) The incidence of *Enterobacteriaceae* causing food poisoning in some meat Products. *Advance Journal of Food Science and Technology* 3(2): 116-121.
8. Amanatidou, A., Slump, R. A., Gorris, L.G.M. y Smid, E.J. (2000) High oxygen and high carbon dioxide modified atmospheres for shelf-life extension of minimally processed carrots. *Journal of Food Science*, 65(1):61–66.
9. Angelillo, I.F., Viggiani, N., Greco, R.M. y Rito, D. (2001) HACCP and food hygiene in hospitals: knowledge, attitudes and practices of food-service staff in Calabria Italy. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 22(6): 363-369.
10. Angelillo, I.F., Viggiani, N., Rizzo, L. y Bianco, A. (2000) Food handlers and foodborne diseases: knowledge, attitudes and reported behavior in Italy. *Journal of Food Protection*, 63(3): 381-385.
11. Appleton, H. (2000) Control of foodborne viruses. *British Medical Bulletin*, 56(1): 172-183.

12. Arévalo, C. A (2009) Actualización en bromatología hospitalaria. Capítulo 6: Las nuevas tecnologías aplicadas a la hostelería hospitalaria. GLOSA, S. L (Ed.), España: 95-117.
13. Arrans, R.J.C., Aranda, R.C., Pedrosa, A.M., Conde, V.A. y Castilla, P.I. (2002) Higiene alimentaria en los establecimientos de restauración de una zona turística de Andalucía. *Medicina de Familia*, 3(2): 108–113.
14. Artés, C.F., Artés, H.F.A, Aguayo, G.E.P. (2004) Evolución y tendencias de la industria española de procesado mínimo en fresco de frutas y hortalizas. *Revista Mercados*, 51: 14-15.
15. Artés, H.F.A., Aguayo, E., Gómez, P. y Artés, C.F. (2009) Innovaciones tecnológicas para preservar la calidad. Productos vegetales mínimamente procesados o de la “cuarta gama”. *Horticultura Internacional*, 69: 52-57.
16. Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., Nakazawa, H., Kozaki, S. (2003) An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiology and Infection*, 130 (1): 33–40.
17. Asociación Española de Frutas y Hortalizas Lavadas, Listas para su Empleo (AFHORLA). (2011) IV Gama. Disponible: (<http://www.afhorla.com/ivgama.php>).
18. Asociación Española de Frutas y Hortalizas Lavadas, Listas para su Empleo (AFHORLA). (2010) Actualidad. Disponible: (<http://www.afhorla.com/noticias.php>).
19. Atanassova, V., Meindl, A., Ring, C., 2001. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham—a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 68 (1–2): 105–113.
20. Augustin, J.C. y Carlier, V. (2000a) Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 56(1): 29-51.
21. Augustin, J.C. y Rosso, L., Carlier, V. (2000b) A model describing the effect of temperature history on lag time for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 57(3): 169-181.
22. Augustin, J.C., Rosso, L. y Carlier, V. (1999). Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements. *Journal of Microbiological Methods*, 38(1-2): 137–146

23. Ayçiçek, H., Aydoğan H., Küçükkaaslan, A., Baysallar, M., Başustaoğlu A.C (2004) Assessment of the bacterial contamination on hands of hospital food handlers. *Food Control*, 15 (4): 253–259.
24. Aymerich, M.T., Jofré, A., Garriga, M., y Hugas, M. (2005) Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by natural antimicrobials and high hydrostatic pressure in sliced cooked ham. *Journal of Food Protection*, 68 (1), 173–177.
25. Azanza, V.M.A. (2004) Aerobic plate counts of Philippine ready-to-eat foods from take-away premises. *Journal of Food Safety*, 25(2): 80–97.
26. Baranyi, J. y Roberts, T.A. (1994) A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23(2–3): 277–294.
27. Baranyi, J. y Roberts, T.A. (1995) Mathematics of predictive food microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, 26(2): 199–218.
28. Baranyi, J., Roberts, T.A. y McClure, P.A. (1993) A non autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology*, 10(1): 43–59.
29. Baranyi, J., Ross, T., McMeekin, T.A. y Roberts, T.A (1996) Effects of parameterization on the performance of empirical models used in predictive microbiology. *Food Microbiology*, 13(1): 83–91
30. Barco-Alcalá, E. (2001) Tesis Doctoral. Elaboración de modelos predictivos de crecimiento microbiano para *Escherichia coli* O157:H7. Validación en productos cárnicos cocidos envasados al vacío. Universidad de Córdoba.
31. Barco-Alcalá, E., García Gimeno R.M., Castillejo Rodríguez A.M. y Zurera-Cosano, G. (2000) La Turbidimetría como método rápido para la determinación de microorganismos presentes en los alimentos. *Alimentaria*, 314: 109-112.
32. Barry-Ryan, C. y O’Beirne, D. (1998) Quality and shelf-life of fresh cut carrot slices as affected by slicing method. *Journal of Food Science*, 63: 851-856.
33. Bartrina, J.A., Rodrigo, C.P., Barba, L.R. y Majem, L.S. (2005) Epidemiología y factores determinantes de la obesidad infantil y juvenil en España. *Revista Pediatría de Atención Primaria*, 7(Suplemento 1): S13-20.
34. Baş, M., Safak, E.A, Kivanc, G. (2006) The evaluation of food hygiene knowledge, attitudes, and practices of food handlers in food businesses in Turkey. *Food Control*, 17 (4): 317–322.
35. Begot, C., Desnier, I., Daudin, J., Labadie, C.J. y Lebert, A. (1996) Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. *Journal of Microbiological Methods*, 25(3): 225-232.

36. Belongia, E.A., MacDonald, K.L., Parham, G.L., White, K.E., Korlath, J.A., Lobato, M.N., Strand, S.M., Casale, K.A. y Osterholm, M.T. (1991) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 colitis associated with consumption of precooked meat patties. *Journal of Infectious Disease*, 164(2): 338-43.
37. Beuchat, L. R. (2000) Use of sanitizers in raw fruit and vegetable processing. In S. M. Alzamora, M. S. Tapia, and A., Lopez-Malo (Ed.). Minimally processed fruit and vegetables. Fundamental aspects and applications. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, MD, 63-78.
38. Beuchat, L.R. (2002) Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection*, 4(4):413-423.
39. Beuchat, L.R., Adler, B.B., y Lang, M. (2004) Efficacy of chlorine and a peroxyacetic acid sanitizer in killing *Listeria monocytogenes* on iceberg and Romaine lettuce using simulated commercial processing conditions. *Journal of Food Protection*, 67 (6): 1238-1242.
40. Bharathi, S., Ramesh, M. N., Varadaraj, M.C. (2001). Predicting the behavioral pattern of *Escherichia coli* in minimally processed vegetables. *Food Control*, 12 (5):275-284.
41. Bidawid S, Farber JM, Sattar SA. (2000) Contamination of foods by food handlers: experiments on hepatitis A virus transfer to food and its interruption. *Applied Environmental Microbiology*, 66(7):2759-2763.
42. Biesalski, H.K. (2005). Meat as a component of a healthy diet-are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet? *Meat Science*, 70 (3): 509-524.
43. Björkroth, K.J., Vandamme, P. y Korkeala, H.J. (1998) Identification and characterization of *Leuconostoc carnosum*, associated with production and spoilage of vacuum-packaged, sliced cooked ham. *Applied Environment Microbiology*, 64 (9): 3313- 3319.
44. Boletín Semanal Epidemiológico (2011) Brote de *Escherichia coli* O154:H4 productor de toxinas shiga en Alemania. Instituto Carlos III y Centro Nacional de Epidemiología. Mayo-Julio, 2011, 19(7): 86-89. Disponible: <http://www.isciii.es/>.
45. Borch, E., Kant-Muermans, M.L. y Blixt, Y. (1996) Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1): 103-120.
46. Borowsky, L.M., Schmidt, V. y Cardoso, M. (2007) Estimation of most probable number of *Salmonella* in minced porks samples. *Brazilian Journal Microbiology*, 38(3): 544-546.

47. Brasil (2005). Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância Sanitária. Boletim Eletrônico Epidemiológico, Ano 5, Nº6.
48. Bredholt, S., Nesbakken, T. y Holck, A. (1999) Protective cultures inhibit growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in cooked, sliced, vacuum- and gas packaged meat. *International Journal of Food Microbiology*, 53 (1): 43–52.
49. Brum, J.V.F. (2004) Análise de Perigos e pontos críticos de controle em indústria de laticínios de Curitiba- PR. CURITIBA: Tecnología de Alimentos da Universidade Federal do Paraná. (Dissertação, Mestrado em Tecnología de Alimentos).
50. Buchanan, R.L. (1993). Predictive food microbiology. *Trends in Food Science and Technology*, 4: 6-11.
51. Buchanan, R.L., Whiting, R.C. y Damert, W.C. (1997) When is simple good enough: a comparison of Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food Microbiology*, 14(4): 313-326.
52. Buck, J.W., Walcott, R.R., Beuchat, L.R (2003) Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. Online: Plant Health Progress doi: 10.1094/PHP-2003-0121-01-R.
53. Bugarel, M., Martin, A., Fach, P. y Beutin, L. (2011) Virulence gene profiling of enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* strains: a basis for molecular risk assessment of typical and atypical EPEC strains (Research article). *BMC Microbiology*, 11:142.
54. Buncic, S. y Avery, S.M. (2004) Microbiological Safety of Meats: *Listeria monocytogenes*. In W.K. Jensen, C. Devine, M. Dikeman (Eds.), *Encyclopedia of Meat Sciences*, vol 2. Pages 804–814. Oxford: Elsevier, ISBN: 0-12-464971-6.
55. Burt, M.B., Volel, C., y Finkel, M. (2003) Safety of vendor-prepared foods: Evaluation of ten processing mobile food vendors in Manhattan. *Public Health Report*, 118(5): 470–476.
56. Caballero-Torres, A.E. Temas de higiene de los alimentos. Ciencias Médicas (Ed.). La Habana, Cuba., 2008: 379
57. Cabeza, M.C., Cambero, M.I., Núñez, M., Medina, M., de la Hoz, L., Ordóñez, J.A. (2010) Lack of growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in temperature abuse of E-beam treated ready-to-eat (RTE) cooked ham. *Food Microbiology*, 27(6):777-782.

58. Campbell-Platt, G. (1995) Fermented meats—A world perspective. En Campbell-Platt, G. y Cook, P.E. (Ed.), *Fermented meats*. Black academic and professional, London, UK: 39–52.
59. Campos-Díaz, J. (2000) Estudio higiénico-sanitario de comedores escolares de la isla de Tenerife. Tesis Doctoral. Universidad de la Laguna.
60. Cano, M. 2001. Preparación de Alimentos Vegetales Procesados en Fresco. *Revista Horticultura* (Extra): 50–67.
61. Carbonell, X. (1990) La IV Gama. I Parte. *Horticultura*, Nº 56: 6-44.
62. Carrasco, E., Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., García-Gimeno, R.M., Zurera, C. (2008) Growth of *Listeria monocytogenes* on shredded, ready-to-eat iceberg lettuce. *Food Control*, 19 (5): 487–494
63. Casaus, P. Nilsen, T., Cintas L.M., Nes, I.F., Hernández, P.E. y Holo, H. (1997) Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology*, 143(7): 2287–2294.
64. Castro, J., Rojas, M., Noguera, M., Santos, Y., Zúñiga E. y Gómez, A. (2006) Calidad sanitaria de ensaladas de verduras crudas, listas para su consumo. *Revista Industria Alimentaria*, 7: 9–21.
65. Cayré, M.E.; Vignolo, G.; Garro, O. (2003) Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsion stored at three temperatures. *Food Microbiology*, 20 (5): 561-566.
66. Cebrián, G., Sagarzazu, N., Pagán, R., Condón, S. y Mañas, P. (2010) Development of stress resistance in *Staphylococcus aureus* after exposure to sublethal environmental condition. *International Journal of Food Microbiology*, 140(1): 26–33.
67. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (1986) *Staphylococcal* food poisoning from turkey at a country club buffet—New Mexico. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*, 35(46):715-6, 721-2.
68. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (1997) Outbreak of staphylococcal food poisoning associated with precooked ham -- Florida, 1997. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*, 46 (50):1189–1191.
69. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2003) Disease information (*Listeriosis*). Available: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/listeriosis_t.htm#trends.

70. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2010) Investigation Update: Multistate outbreak of human *E. coli* O145 infections linked to shredded romaine lettuce from a single processing facility. Available: (http://www.cdc.gov/ecoli/2010/ecoli_O145/index.html).
71. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2010) Investigation Update: Multistate outbreak of human *Salmonella* Montevideo infections. Available: (<http://www.cdc.gov/salmonella/montevideo/index.html>).
72. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2011) Investigation Announcement: Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections linked to romaine lettuce. December 7, Available: (<http://www.cdc.gov/ecoli/2011/ecoliO157/romainelettuce/120711/index.html>).
73. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2011) Investigation Announcement: Multistate outbreak of human *Salmonella* Heidelberg infections (2011). Available: (<http://www.cdc.gov/salmonella/heidelberg/080111/index.html>).
74. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2012) Investigation Update: Multistate outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Linked to romaine lettuce. March, 23. Available: (<http://www.cdc.gov/ecoli/2011/ecoliO157/romainelettuce/032312/index.html>).
75. Cha, J.O., Lee, J.K., Jung, Y.H., Yoo, J.I., Park, Y.K., Kim, B.S. y Lee, Y.S., (2006) Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. *Journal of Applied Microbiology*, 101(4): 864–871.
76. Chapman, B., Eversley, T., Fillion, K., MaClaurin, T. y Powell, D. (2010) Assessment of food safety practices of food service food handlers (Risk Assessment Data): Testing a Communication Intervention (Evaluation of Tools). *Journal of Food Protection*, 73 (6): 1101–1107.
77. Chilled Food Association (2007). Microbiological Guidance for Produce Suppliers to Chilled Food Manufacturers (2nd Ed). London: Chilled Food Association Ltd.
78. Chizzolini, R., Zanardi, E., Dorigoni, V., y Ghidini, S. (1999) Calorific value and cholesterol content of normal and low-fat meat and meat products. *Trends Food Science Technology*, 10 (4–5): 119-128.
79. Chun, H., Kim, J. Chung, K., Wonb, M., y Song, K.S. (2009) Inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* entérica serovar *Typhimurium*, and *Campylobacter jejuni* in ready-to-eat sliced ham using UV-C irradiation. *Meat Science*, 83 (4): 599–603.

80. Chung, Y.K., Vurma, M., Turek, E.J., Chism, G.W., y Yousef, A.E. (2005). Inactivation of barotolerant *Listeria monocytogenes* in sausage by combination of high-pressure processing and food-grade additives. *Journal of Food Protection*, 68 (4): 744–750.
81. Clark, P. (2002) Extending the shelf life of fruits and vegetables. *Food Technology*, 56(4): 98-106.
82. Clayton, D.A, Griffith, C.J, Price, P.E., y Peters, A.C. (2002) Food handlers' beliefs and self-reported practices. *International Journal of Environmental Health Research*, 12(1): 25-39.
83. Clayton, D.A, y Griffith, C.J. (2004) Observations of food safety practices in catering using notational analysis. *British Food Journal*, 106(3): 211-227
84. Codex Alimentarius Commission (1999) Establishment of sampling plans for microbiologically safety criteria for foods in international trade including recommendations for control of *Listeria monocytogenes*. Document prepared by the International Commission on Microbiological Specifications for Foods for the Codex Committee on Food Hygiene, 31st session 29 November–4 December 25 1999, Codex Alimentarius Commission, Washington, D.C., U.S.
85. Código de Prácticas de Higiene para Frutas y Hortalizas Frescas (CAC/RCP 53-2003). Codex Alimentarius. Normas Internacionales de los alimentos (OMS–FAO). Available: (<http://www.codexalimentarius.org/normas-oficiales/lista-de-las-normas/es/>)
86. Código de prácticas de higiene para la carne (CAC/RCP 58/2005). Codex Alimentarius. Normas Internacionales de los alimentos (OMS–FAO). Disponible: (<http://www.codexalimentarius.org/normas-oficiales/lista-de-las-normas/es/>).
87. Códigos de Prácticas Generales de Higiene (CAC/RCP 1-1969). Codex Alimentarius. Normas Internacionales de los alimentos (OMS–FAO). Available: (<http://www.codexalimentarius.org/normas-oficiales/lista-de-las-normas/es/>)
88. Cole, M.B., Davies, K.W., Munro, G., Holyoak, C.D. y Kilsby, D.C. (1993) A vitalistic model to describe the thermal inactivation of *L. monocytogenes*. *Journal of Industrial Microbiology*, 12 (3–5): 232–239.
89. Coroller, L. Guerrot, V. Huchet, V. Le Marc, Y. Sohier, D. & Thuault, D. (2003) Growth kinetics modelling of pathogen bacteria as function of different acids. In: Predictive Modelling in foods-Conference proceedings, J.F.M. Van Impe, A.H. Geerard, I. Leguerinel & P. Mafart (Eds.). Pages 120-122, Kathoelieke Universiteit Leuven/BioTec, Belgium.

90. Coroller, L. Leguerinel, I. Mettler, E. Savy, N. y Mafart, P. (2006) General model, based on two mixed Weibull distributions of bacterial resistance, for describing various shapes of inactivation curves. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10): 6494-6502.
91. Couto-Campos A. K; Soares Cardonha A. M; Galvão Pinheiro L.B; Rocha Ferreira N; Medeiros de Azevedo, P.R; Montenegro Stamford, T.L. (2009) Assessment of personal hygiene and practices of food handlers in municipal public schools of Natal, Brazil. *Food Control*, 20 (9): 807-810.
92. Cruz, J. (2012) Informe: La industria cárnica recupera sus niveles de producción e incrementa las exportaciones durante 2011. *Eurocarne*, Marzo-2012, 204: 63-70. Disponible: (<http://www.eurocarne.com/boletin/imagenes/20404.pdf>).
93. Cunha Neto, A., Maia da Silva, C.G. y Stamford, M.T.L. (2002) Staphylococcus enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, Brasil. *Ciência e Tecnologia Alimentar*, Campinas 22 (3): 263-271.
94. Cuppers, H.G. y Smelt, J.P. (1993) Time to turbidity measurement as a tool for modelling spoilage. *Journal of Industrial Microbiology*, 12(3-5): 168-171.
95. Dalgaard, P., Ross, T., Kamperman, L., Neumeyer, K. y McMeekin, T. A. (1994). Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *International Journal of Food Microbiology*, 238(3-4): 391-404.
96. Dalgaard, P., y Koutsoumanis, K. (2001) Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. *Journal of Microbiological Methods*, 43(3): 183-196.
97. De Giusti, M., Aurigemma, C., Marinelli, L., Tufi, D., De Medici, D., Di Pasquale, S., De Vito, C. y Boccia, A. (2010) The evaluation of the microbial safety of fresh ready-to-eat vegetables produced by different technologies in Italy. *Journal of Applied Microbiology*, 109(3): 996-1006.
98. Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P. (2006) Review. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16 (9): 1058-1071. 4th NIZO Dairy Conference - Prospects for Health, Well-being and Safety.
99. Delaquis, P., Bach, B., Dinu, L.D. (2007) Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 in leafy vegetables. *Journal of Food Protection*, 70(8): 1966-1974.
100. DeVita, M.D., Wadhwa, R.K., Theis, M.L. y Ingham, S.C. (2007). Assessing the potential of *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus* transfer to foods and customers via a survey of hands, hand-contact surfaces and food-contact surfaces at foodservice facilities. *Journal of Foodservice*, 18(2): 76-79.

101. Devlieghere, F. Debevere, J. y Van Impe, J.F.M. (1998) Concentration of carbon dioxide in the water-phase as a parameter to model the effect of a modified atmosphere on microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 43(1-2): 105-113.
102. Devlieghere, F., Geeraerd, A.H., Versyck, K.J., Bernaert, H., Van Impe, J.F. y Debevere, J. (2000) Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: addition of Na-lactate as a fourth shelf life determinative factor in a model and product validation. *International Journal of Food Microbiology*, 58(1-2): 93-106.
103. Devlieghere, F., Vermeiren, L., Debevere, J. (2004) New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, 14(4): 273-285.
104. Díaz-Bidart, J.I. (2009) La Restauración moderna. Revista de Distribución y Consumo, No. 103. MERCASA (Ed.). Disponible: (www.mercasa.es).
105. Dippold, L., Lee, R., Selman, C., Monroe, S., y Henry, C. (2003) Gastroenteritis outbreak due to norovirus associated with a Colorado Hotel. *Journal of Environmental Health*, 66(5), 13-17.
106. Documento de Orientación sobre la Formación de los manipuladores de alimentos. Ministerio de Sanidad y Política Social y la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Disponible: (<http://www.aesan.msc.es>).
107. Döller, P.C., Dietrich, K., Philipp, N., Brockmann, S., Dreweck, C., Vonthein, R., Wagner-Wiening, C., y Wiedermann, A. (2002) *Cyclosporiasis* outbreak in Germany associated with the consumption of salad. *Emerging Infectious Diseases*, 8 (9): 922-994.
108. Donnenberg, M.S., Whittam, T.S. (2001) Pathogenesis and evolution of virulence in Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *The Journal of Clinical Investigation*, 107 (5):539-548.
109. Downes, F.P. y Ito, K. (2001) Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4 Edition. Washington DC, Estados Unidos, American Public Health Association.
110. Duffell, E., Espié, E., Nichols, T., Adak, G.K., De Valk, H., Anderson, K. y Stuart, J.M. (2003) Investigation of an outbreak of *E. coli* O157 infections associated with a trip to France of school children from Somerset, England. *Eurosurveillance*, 8 (4), 81-86.
111. Eckert, L.A., Maca, J.V., Miller, R.K., y Acuff, G.R. (1997) Sensory, Microbial and Chemical Characteristics of Fresh Aerobically Stored Ground Beef Containing Sodium Lactate and Sodium Propionate. *Journal of Food Science*, 62(2): 429-433.

112. Elson, R., Burgess, F., Little, C. L. y Mitchell, R. T. (2004) Microbiological examination of ready-to-eat cold sliced meats and paté from catering and retail premises in the UK. *Journal of Applied Microbiology*, 96(3): 499–509.
113. Endo, H, Nagano, Y., Ren, H. y Hayashi, T. (2001) Rapid enumeration of bacteria grown on surimi-based product by Flow Cytometry. *Fish. Science*, 67(5): 969–974.
114. Estudio consumo alimentario extradoméstico en España, hábitos del consumidor. Otoño-Invierno 2011. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA). Disponible: (www.magrama.gob.es).
115. Ethelberg, S., Lisby, M., Bottiger, B., Schultz, A.C., Villif, A., Jensen, T., Olsen, K.E., Scheutz, F., Kjelso, C., Muller, L. (2010) Outbreaks of gastroenteritis linked to lettuce, Denmark, January 2010. *Eurosurveillance*, 15 (6): 19484.
116. European Federation of Trade Unions in Food, Agriculture and Tourism (EFFAT)- European Federation of Contract Catering Organisations (FERCO) (2011). Formación para todos. Available: (www.contract-catering-guide.org/food-hygiene-training-for-all).
117. European Food Safety Authority (EFSA) (2006). The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2005. *The EFSA Journal*, 94: 2–288.
118. European Food Safety Authority (EFSA) (2010). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2008. *The EFSA Journal*, 8(1): 1496.
119. European Food Safety Authority (EFSA) (2012). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *The EFSA Journal*, 10(3): 2594.
120. Fabrizio, K.A. y Cutter, C.N. (2005) Application of electrolyzed oxidizing water to reduce *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat meats. *Meat Science*, 71 (2): 327–333.
121. Fashae, K., Ogunsoola, F., Aarestrup, F.M. y Hendriksen, R.S. (2010) Antimicrobial susceptibility and serovars of Salmonella from chickens and humans in Ibadan, Nigeria. *Journal of Infection in Developing Countries* 4(8): 484–494.
122. Fawzi M, Gomaa N.F. y Bakr W.M (2009) Assessment of hand washing facilities, personal hygiene and the bacteriological quality of hand washes in some grocery and dairy shops in Alexandria, Egypt. *Egypt Public Health Assoc.*, 84(1):71–93.

123. Federación Española de Asociaciones de Productores y Exportadores de Frutas y Hortalizas, Flores y Plantas Vivas (FEPEX). Guía de Buenas Prácticas de Producción de IV Gama. Versión 2. Noviembre 2010. Disponible: (http://www.fepex.es/ficheros/AFHORLA/GUIA_IVgama/GuiaBuenasPracticas_IV_Gama_ver2.pdf).
124. Federación Española de Productores Exportadores de Frutas, Hortalizas y Flores y Plantas Vivas (FEPEX). (2011) Datos del sector. (<http://www.fepex.es/publico/datosSector/Consumo.aspx>).
125. Fernane, F., Morales, A., Carrasco, E., y García-Gimeno, R. M. (2010). Transfer of Salmonella to ready-to-eat meat products during slicing. In 22nd International ICFMH Symposium Abstract Book (page 235). 30.08.2010-03.09.2010. Copenhagen.
126. Food and Drug Administration (FDA, US) (2004) FDA report on the occurrence of foodborne illness risk factors in selected institutional foodservice, restaurant, and retail food store facility types (2004). College Park, MD: FDA/Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Compliance. Available: (<http://www.cfsan.fda.gov>)
127. Food and Drug Administration (FDA, US) (2010). Trend Analysis Report on the Occurrence of Foodborne Illness Risk Factors in Selected Institutional Foodservice, Restaurant, and Retail Food Store Facility Types (1998 – 2008).
128. Food and Drug Administration (FDA, US) (2009). Microbiological Challenge Testing Evaluation and definition of Potentially Hazardous Foods. Chapter 6. Available: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/ucm094154.htm>
129. Food Code. US Public Health Services FDA, 2009. Available: (<http://www.fda.gov>)
130. Forshell, L.P. y Wierup, M. (2006) *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. Review. *Science and Technology*, 25 (2): 541–554.
131. Franz, E., Tromp, S.O, Rijgersberg, H. y Van Der Fels-Klerx, H.J. (2010) Quantitative microbial risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in leafy green vegetables consumed at salad bars. *Journal of Food Protection*, 73 (2): 274–285.
132. Friesema I., Sigmundsdottir, G., van der Zwaluw, K., Heuvelink, A., Schimmer, B., de Jager C., Rump, B., Briem, H., Hardardottir, H., Atladottir, A., Gudmundsdottir, E., y van Pelt, W. (2008) An international outbreak of shiga

- toxin-producing *Escherichia coli* O157 infection due to lettuce, September-October 2007. *Eurosurveillance*, 13(50):19065.
133. Fujikawa, H. y Morozumi, S. (2006) Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. *Food Microbiology*, 23(3): 260–267
 134. Furnari G., Molino N., Bruno, S., Quaranta G., Laurenti, P. y Ricciardi, G. (2002) Efficacy and critical implications of food handlers' professional training: analysis of an experience. *Annali di Igiene*, 14(5): 419-26.
 135. Gallay, A. (2002). Toxines microbiennes dans les toxi-infections alimentaires collectives' déclarées en France. Congress of the French Society of Microbiology. November 2002. Paris.
 136. Garayoa, R., Vitas, A.I., Díez-Leturia, M., García-Jalón I. (2011) Food safety and the contract catering companies: food handlers, facilities and HACCP evaluation. *Food Control*, 22 (12): 2006-2012.
 137. Garrido, V., Vitas, A.I. y García-Jalón, I. (2009) Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products: Prevalence by brands and retail establishments for exposure assessment of listeriosis in Northern Spain. *Food Control*, 20(11): 986–991.
 138. Garriga, M., Aymerich, M.T., Costa, S., Monfort, J.M., y Hugas, M. (2002) Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiology*, 19 (5), 509–518.
 139. Garthright, W.E. (1997) The three phase linear model of bacterial growth: a response. *Food Microbiology*, 14 (2):193–195.
 140. Gassama, A., Sow, P.S., Fall, F., Camara, P., Gueye-N`diaye, A., Seng, R., Samb, B., M´Boup, S. y Aïdara-Kane, A. (2001) Ordinary and opportunistic enteropathogens associated with diarrhea in Senegalese adults in relation to human immunodeficiency virus serostatus. *International Journal of Infectious Disease*, 5(4): 192–198.
 141. Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P., Devlieghere, F., Bernaert, H., Debevere, J. y Van Impe, J.F. (2004) Development of a novel approach for secondary modelling in predictive microbiology: incorporation of microbiological knowledge in black box polynomial modelling. *International Journal of Food Microbiology*, 91(3): 229-244.
 142. Geisen, R., Lücke, F.K., y Kröckel, L. (1992) Starter and protective cultures for meat and meat products. *Fleischwirtschaft*, 72: 892–894.

143. Gibson, A.M., Bratchell, N. y Roberts, T. A. (1987) The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. *Journal of Applied Microbiology*, 62(6): 479–490.
144. Gibson, L.L., Rose, J.B., Haas, C.N., Gerba, C.P., y Rusin, P.A. (2002) Quantitative assessment of risk reduction from hand washing with antibacterial soaps. *Journal of Applied Microbiology*, 92(s1): 136S–143S.
145. Gil, M.I., Allende, A.B., David, S.M.V. (2005) Effects of packaging type and storage temperature on the growth of foodborne pathogens on shredded ‘romaine’ lettuce. Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y la Alimentación. CTC Alimentación, 26: 146-151.
146. Gil, M.I., Allende, A.B., López-Galvez, F., Selma, M.V. (2009) ¿Hay alternativas al cloro como higienizante para productos de IV Gama?. *Horticultura Internacional*, 69: 38-45.
147. Gilbert, S., Lake, R., Hudson, A., y Cressey, P. (2009) Risk Profile: Listeria Monocytogenes In Processed Ready-To-Eat Meats. Available: (http://foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Risk_Profile_Listeria_Monocytogenes_Processed-Science_Research.pdf).
148. Gil-Díaz, M., Santos-Delgado, M.J., Rubio-Barroso, S., y Polo-Díez, L.M (2009) Free D-amino acids determination in ready-to-eat cooked ham irradiated with electron-beam by indirect chiral HPLC. Original Research Article. *Meat Science*, 82(1): 24–29.
149. Gill, C.O. y Harris, L.M. (1984) Hamburgers and broiler chickens as potential sources of human *Campylobacter* enteritis. *Journal Food Protection*, 47 (2):96-99.
150. Gillespie, I., Little, C. y Mitchell, R. (2000) Microbiological examination of cold ready-to-eat sliced meats from catering establishments in the United Kingdom. *Journal of Applied Microbiology*, 88 (3): 467–474.
151. Gillian, A.F, Christopher, T. y David, O. (1999) The microbiological safety of minimally processed vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 34(1): 1–22.
152. Ginestrea, M., Rincón, G., Romero, S., Harris, B., Castellano M. y Colina, G. (2005). Especies de *Aeromonas* en vegetales frescos que se expende en un mercado popular de Maracaibo. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 25(2): 96-99.
153. Gleeson, E. y O'Beirne, D. (2005) Effects of process severity on survival and growth of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on minimally processed vegetables. *Food Control*, 16: 677-685.

154. Golden, N.J. Crouch, E.A., Latimer, H., Abdel-Razak, K. y Kause, J. (2009) Risk assessment for *Clostridium perfringens* in ready-to-eat and partially cooked meat and poultry products. *Journal of Food Protection*, 72(7): 1376–1384.
155. Gomes, T.A.T., Blake, P.A. y Trabulsi, L.R. (1989) Prevalence of *Escherichia coli* strains with localized, diffuse, and aggregative adherence to HeLa cells in infants with diarrhea and matched controls. *Journal of Clinical Microbiology*, 27 (2):266-269.
156. Gomes, T.A.T., Rassi, V., MacDonald, K.L., Ramos, S.R., Trabulsi, L.R., Vieira, M.A., Candeias, J.A.N., Ivey, C., Toledo, M.R.F. y Blake, P.A. (1991) Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. *Journal of Infectious Diseases*, 164(2): 331: 337.
157. Gomes-Neves, E., Araujo, A. C., Ramos, E., y Cardoso, C. S. (2007). Food handling: Comparative analysis of general knowledge and practice in three relevant groups in Portugal. *Food Control*, 18(6): 707–712.
158. Gomes-Neves, E., Cardoso, C.S., Araújo, A.C., Correia da Costa, J.M. (2011) Meat handlers training in Portugal: A survey on knowledge and practice. *Food Control*, 22(3–4): 501–507.
159. Gorman, R., Bloomfield, S. y Adley, C.A. (2002) A study of cross-contamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. *International Journal of Food Microbiology* 76(1-2): 143–150.
160. Gottlieb, S.L., Newbern, E.C., Griffin, P.M., Graves, L.M., Hoekstra, R.M., Baker, N. L., Hunter S.B., Holt, K.G., Ramsey, F., Head, M., Levine, P., Johnson, G., Schoonmaker-Bopp, D., Reddy, V., Kornstein, L., Gerwel, M., Nsubuga, J., Edwards, L., Stonecipher, S., Hurd, S., Austin, D., Jefferson, M.A., Young, S.D., Hise, K., Chernak, E.D., Sobel, J. y listeriosis Outbreak Working Group. (2006) Multistate Outbreak of listeriosis linked to turkey deli meat and subsequent changes in US regulatory policy. *Clinical Infection Diseases*, 42(1): 29-36.
161. Goularte, L., Martins, C.G., Morales-Aizpurúa, I.C., Destro, M.T., Franco, B.D.G.M. Vizeu, D.M., Hutzler, B.W., Landgraf, M. (2004) Combination of minimal processing and irradiation to improve the microbiological safety of lettuce (*Lactuca sativa*, L.). *Radiation Physics and Chemistry*, 71 (1–2): 155–159.
162. Grahek-Ogden, D., Schimmer, B., Cudjoe, K.S., Nygård, K. y Kapperud, G. (2007) Outbreak of *Yersinia enterocolitica* Serogroup O:9 Infection and Processed Pork, Norway. *Emerging Infectious Diseases*, 13(5): 754–756.
163. Granum, P.E. (2005) *Bacillus cereus*. In: Foodborne pathogens: microbiology and molecular biology. Wymondham, Norfolk, UK: Caister Academic Press. 2005.

164. Green, L. y Selman, C. (2005) Factors impacting food workers' and managers' safe food preparation practices: A qualitative study. *Food Protection Trends*, 25: 981-990.
165. Green, L.R., Radke, V., Mason, R., Bushnell, L., Reimann, D.W. Mack, J.C., Motsinger, M.D., Stigger, T. y Selman, C.A. (2007) Factors related to food worker hand hygiene practices. *Journal of Food Protection*, 70 (3): 661-666.
166. Guía de Mejores Técnicas Disponibles en España del sector cárnico (2005). Capítulo 2: Productos picados frescos y cocidos. Página 33-36. Disponible: (http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/sector_carnico_tcm7-8216.pdf).
167. Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods. London: Health Protection Agency (2009).
168. Guidelines for interpretation of results of microbiological analysis of some ready-to-eat-foods sampled at point of sale (2001). Guidance Note No.3. Food Safety Authority of Ireland. Available: (http://www4.neuquen.gov.ar/salud/images/archivo/Bromatologa/Biblioteca/Manuales/Microbiologia/INAL-ANMAT/guia_de_interpretacion_de_resultados_microbiologicos_de_alimentos_inal-anmat.pdf)
169. Guidelines for the microbiological examination of ready-to-eat foods (2001). Available: (http://www.foodstandards.gov.au/_srcfiles/Guidelines%20for%20Micro%20exam.pdf).
170. Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat foods sampled at the point of sale (2000) A working group (R.J Gilbert, J de Louvois, T. Donovan, C. Little, K. Nye, C.D Ribeiro, J. Richards, D. Roberts, F.J. Bolton) of the PHLS Advisory Committee for Food and Dairy Products. *Communicable Disease Public Health*, 3: 163-167.
171. Gurtler, J. B., Kornacki, J.L. y Beuchat, L.R. (2005) Enterobacter sakazakii: A coliform of increased concern to infant health. Review. *International Journal of Food Microbiology* 104 (1): 1- 34.
172. Guzewich, J. y Ross, M.P. (1999) Evaluation of risks related to microbiological contamination of ready-to-eat food by food preparation workers and the effectiveness of interventions to minimize those risks, FDA White Paper, September, FDA, Rockville, MD.

173. Guzman-Herrador, B., Vold, L., Comelli, H., MacDonald, E., Heier, B.T., Wester, A.L., Stavnes, T.L., Jensvoll, L., Lindegård, A.A., Severinsen, G., Aasgaard G. J., Werner, J.O., Cudjoe, K., y Nygard, K. (2011) Rapid communications. Outbreak of *Shigella sonnei* infection in Norway linked to consumption of fresh basil, October, 2011. *Eurosurveillance*, 16 (44): 20007.
174. Hammes, W.P, Bantleón, A. y Min, S. (1990) Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiology Letters*, 87(1–2): 165–174.
175. Han, J.H. (2005) Antimicrobial packaging systems. En Han, J.H (Ed) Innovation in food packaging (pages 80–107). Elsevier Academic Press, London.
176. Health Protection Agency (HPA) (2003) Outbreak of *Salmonella* Braenderup focused in West Midlands. *Communicable Disease Report (CDR) Weekly* [serial online] 13, News. Available: (<http://www.hpa.org.uk/cdr/archives/2003/cdr1003.pdf>).
177. Health Protection Agency (HPA) (2004) Update – outbreak of *Salmonella* Newport infection in England, Scotland, and Northern Ireland: association with the consumption of lettuce. *Communicable Disease Report (CDR) Weekly* [serial online] 14, News. Available: (<http://www.hpa.org.uk/cdr/archives/2004/cdr4104.pdf>).
178. Health Protection Agency (HPA) (2005) Outbreak of *Salmonella* Typhimurium DT104 infection in Scotland, England and Wales, January to February 2005 (update)-iceberg lettuce eaten outside the home implicated. *Communicable Disease Report (CDR) Weekly* [serial online] 15, News. Available: (<http://www.hpa.org.uk/cdr/archives/2005/cdr0905.pdf>)
179. Hedberg, W.C., Smith, S.J., Kirkland, E., Radke, V., Jones, T.F. y Selman, C.A. (2006) Systematic environmental evaluations to identify food safety differences between outbreak and non-outbreak restaurants. The Ehs-Net Working Group. *Journal of Food Protection*, 69 (11): 2697–2702.
180. Hendriksen, R.S., Vieira, A.R., Karlslose, S., Lo Fo Wong, D.M., Jensen, A.B., Wegener, H.C. y Aarestrup, F.M. (2011) Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the world health organization global foodborne infections network country data bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(8): 887–900.
181. Hilborn, E.D., Mermin, J.H., Mshar, P.A., Hadler, J.L., Voetsch, A., Wojtkunski, C., Swartz, M., Mshar, R., Lambert-Fair, M.A., Farrar, J.A., Glynn, M.K., y Slutsker, L.A. (1999) Multistate Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Associated With Consumption of Mesclun Lettuce, *Archives International Medicine*. 159(15): 1758-1764.

182. Hills, B.P. y Mackey, B.M. (1995) Multi-compartment kinetic models for injury, resuscitation, induced lag and growth in bacterial cell populations. *Food Microbiology*, 12 (4):333–346.
183. Hills, B.P. y Wright, K.M. (1994) A new model for bacterial growth in heterogeneous systems. *Journal of Theoretic Biology*, 168 (1):31–41.
184. Hislop, N. y Shaw, K. (2009) Food safety knowledge retention study. *Journal of Food Protection*, 72(2): 431–435.
185. Holm, C., Mathiasen, T. y Jespersen, L. (2004) Flow cytometric technique for quantification and differentiation of bacteria in bulk tank milk. *Journal of Applied Microbiology*, 97(5): 935–941.
186. Holzapfel, W.H., Geisen, R., y Schillinger, U. (1995) Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, 24 (3): 343–362.
187. Horby, P.W., O'Brien, S.J., Adak, G.K., Graham, C., Hawker, J.I., Hunter, P., Lane, C., Lawson, A.J., Mitchel, R.T., Reacher, M.H., Threlfall, E.J., Ward, L.R. y on behalf of the PHLS outbreak investigation team (2003) National outbreak of multi-resistant *Salmonella* enteric serovar Typhimurium definitive phage type (DT) 104 associated with consumption of lettuce. *Epidemiology and Infection*, 130: 169–178.
188. Horcada, A y Polvillo, O. (2010) La producción de carne en Andalucía. Capítulo 5: Conceptos básicos sobre la carne. Junta de Andalucía. Conserjería de Agricultura y Pesca (Ed.):113-139.
189. Ingham, S.C., Ingham, B.H., Borneman, D., Jaussaud, E., Schoeller, E.L., Hoftiezer, N., Schwartzburg, L., Burnham, G.M. y Norback, J.P (2009) Predicting pathogen growth during short-term temperature abuse of raw sausage. *Journal of Food Protection*, 72 (1): 75–84.
190. Issa-Zacharia, A., Kamitani, Y., Miwa, N., Muhimbula, H., y Iwasaki, K. (2011) Application of slightly acidic electrolyzed water as a potential non-thermal food sanitizer for decontamination of fresh ready-to-eat vegetables and sprouts. *Food Control*, 22 (3–4): 601–607.
191. Jay, J.M. (1996) *Modern Food Microbiology* (5th Ed.). Chapman and Hall, New York.
192. Jeong, S., Marks, B.P., Ryser, E.T. y Moosekian, S.R. (2010) Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce, using low-energy X-Ray Irradiation. *Journal of Food Protection*, 73(3): 547–551.

193. Jessen, B. y Lammert, L. (2003) Biofilm and disinfection in meat processing plants. *International Biodeterioration and Biodegradation* (Hygiene and Disinfection), 51(4): 265–269.
194. Jiang, X.P., y Doyle, M.P. (1999) Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteritidis* in ground beef. *Journal of Food Protection*, 62 (7): 805–807.
195. Jofré, A., Garriga, M., Aymerich, T. (2008) Inhibition of *Salmonella* sp. *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in cooked ham by combining antimicrobials, high hydrostatic pressure and refrigeration. *Meat Science*, 78 (1–2) 53–59.
196. Kabuki, D.Y., Kuaye, A.Y., Wiedmann, M. y Boor, K. J. (2004) Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in latin-style fresh-cheese processing plants. *Journal of Dairy Science*, 87(9): 2803–2812.
197. Kapperud, G., Rørvik, L.M., Hasseltvedt, V., Høiby, E. A., Iversen, B.G., Staveland, K., Johnsen, G., Leitao, J., Herikstad, H., y Anderson, Y. (1995) Outbreak of *Shigella sonnei* infection traced to imported iceberg lettuce. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(3): 609–614.
198. Karagözü, N., Ergönül, B., y Özcan, D. (2011) Determination of antimicrobial effect of mint and basil essential oils on survival of *E. coli* O157:H7 and *S. Typhimurium* in fresh-cut lettuce and purslane. *Food Control*, 22 (12): 1851–1855.
199. Kérouanton, A., Hennekinne, J.A., Letertre, C., Petit, L., Cheneau, O., Brisabois, A. y De Buyser M.L. (2007) Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology*, 115(3): 369–375.
200. Keskinen, L. A., Todd, E. C. D., y Ryser, E. T. (2008) Impact of bacterial stress and biofilm-forming ability on transfer of surface-dried *Listeria monocytogenes* during slicing of delicatessen meats. *International Journal of Food Microbiology*, 127(3): 298–304.
201. Kohl, K.S. y Farley, T.A. (2000) Initially unrecognized distribution of a commercially cooked meat product contaminated over several months with *Salmonella* serotype *Infantis*. *Epidemiology and Infection*, 125(3):491–8.
202. Koseki, S. e Isobe, S. (2005) Growth of *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce and solid media. *International Journal of Food Microbiology*, 101 (2): 217– 225.
203. Koseki, S. e Isobe, S. (2007) Review-Microbial Control of fresh produce using electrolyzed water. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 41: 273–82

204. Koutsoumanis, K. y Nychas, G.J. (2000) Application of a systematic experimental procedure to develop a microbial model for rapid fish shelf-life prediction. *International Journal of Food Microbiology*, 60(2-3): 171–184.
205. Koutsoumanis, K., Kendall, P.A y Sofos, J.N. (2004) A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and a_w when grown in suspension or on a solid surface. *Food Microbiology*, 21(4): 415–422.
206. Koutsoumanis, K.P. y Sofos, N.J. (2005) Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and A_w limits for growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 104(1): 83–91.
207. Kramer, J.M y Gilbert, R.J. (1989) *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In MP Doyle (Ed.) *Foodborne bacterial pathogens*. Marcel Dekker, New York, NY.
208. Kusumaningrum, H.D., Van Putten, M.M., Rombouts, F.M. y Beumer, R.R. (2002) Effects of antibacterial dishwashing liquid on foodborne pathogens and competitive microorganisms in kitchen sponges. *Journal of Food Protection*, 65 (1): 61–65.
209. Lamikanra, O. y Bett-Garber, K. (2005) Fresh-cut fruit moves into the fast lane. *Agricultural Research* 2005. Pages: 10–12. Available: (<http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/aug05/fruit0805.pdf>).
210. Lanciotti, R., Sinigaglia, M., Gardini, F., Vannini, L. y Guertzoni, M.E. (2001) Growth/no growth interfaces of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* in model systems based on water activity, pH, temperature and ethanol concentration. *Food Microbiology*, 18(6): 659–668.
211. Lanzanova M, Mucchetti G and Neviani E. 1993. Analysis of conductance changes as a growth index of lactic acid bacteria in milk. *Journal of Dairy Science*, 76(1):20–28.
212. Le Loir, Y., Baron, F. y Gautier, M. (2003) *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, 2(1): 63–76.
213. Le Marc, Y., Huchet, V., Bourgeois, C.M., Guyonnet, J.P., Mafart P. y Thuault, D. (2002) Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. *International Journal of Food Microbiology*, 73(2-3): 219–237.
214. Leitsner, L. y Gould, G.W. (2002) *Hurdle technologies. Combination treatments for food stability, safety and quality*. New York, USA, Kluwer Academic/Plenum Publishers.

215. Levine, M.M. (1987) *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent. *International Journal of Infection Disease*, 155 (3): 377-389.
216. Levine, M.M. y Edelman, R. (1984) Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: Epidemiology and pathogenesis. *Epidemiologic Reviews*, 6: 31-35.
217. Lianou A. y Koutsoumanis KP. (2011) Effect of the growth environment on the strain variability of *Salmonella enterica* kinetic behavior. *Food Microbiology*, 28(4): 828-37.
218. Lindback, T., Fagerlund, A., Rodland, M.S. y Granum, P.E. (2004) Characterization of the *Bacillus cereus* the enterotoxin. *Microbiology*, 150: 3959-3967.
219. Lindqvist, R. (2006) Estimation of *Staphylococcus aureus* growth parameters from turbidity data: Characterization of strain variation and comparison of methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7): 4862-4870.
220. Little, C.L. y de Louvois, J. (1998) The microbiological examination of butchery products and butchers' premises in the United Kingdom. *Journal of Applied Microbiology*, 85(1): 177-186.
221. Little, C.L. y Gillespie, I.A. (2008) Prepared salads and public health. Review Article. *Journal of Applied Microbiology*, 105 (6): 1729-1743.
222. Liu, Ch., y Su, Y-Ch. (2006) Efficiency of electrolyzed oxidizing water on reducing *Listeria monocytogenes* contamination on seafood processing gloves. *International Journal of Food Microbiology*, 110 (2): 149-154.
223. Lubrán, M.B., Pouillot, R., Bohm, S., Calvey, E.M., Meng, J. y Dennis, S. (2010) Observational Study of Food Safety Practices in Retail Deli Departments. *Journal of Food Protection*, 73 (10): 1849-1857.
224. Lues J.F.R y Van Tonder I. (2007) The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. *Food Control*, 18 (4): 326-332.
225. Lynch, R.A., Elledge, B.L., Charles, P.H., Griffith, C.C., y Boatright, D.T. (2003) A comparison of food safety knowledge among restaurant managers, by source of training and experience, in Oklahoma County, Oklahoma. *Journal of Environmental Health*, 66(2): 9-14.
226. Lynch, R.A., Phillips, M.L., Elledge, B.L., Hanumanthaiah, S,y Boatright, D.T. (2005) A preliminary evaluation of the effect of glove use by food handlers in fast food restaurants. *Journal of Food Protection*, 68(1):187-90.

227. Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'Brien, S.J., Jones, T.F., Fazil, A. y Hoekstra, R.M. (2010) The global burden of non typhoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases* 50(6): 882–889.
228. Malheiros, P., Passos, C., Casarin, L., Serraglio, L., y Tondo, E. C. (2010) Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry meat to surfaces of stainless steel and polyethylene and their disinfection. *Food Control*, 21(3): 298–301.
229. Mangia, A.H., Duarte, A.N., Duarte, R., Silva, L.A., Bravo, V.L. y Leal, M.C. (1993) Aetiology of acute diarrhea in hospitalized children in Rio de Janeiro city, Brazil. *Journal of Tropical Pediatrics*, 39(6): 365–367.
230. Marcos M.B. (2007) Mejora de la seguridad alimentaria en productos cárnicos listos para el consumo mediante aplicación combinada de tecnología de conservación emergente. Tesis Doctoral. Universidad de Girona.
231. Marier, R. Wells, J., Swanson, R., Callahan, W. y Mehlman, I.J (1973) An outbreak of enteropathogenic *Escherichia coli* foodborne disease traced to imported French Cheese. *The Lancet*, 302(7842): 1376–1378.
232. Marquenie, D. (2002). Evaluation of physical techniques for surface disinfection of strawberry and sweet cherry. Thesis. Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgium.
233. Martín Cerdeño, V.J. (2011) Canales de distribución de carne y productos cárnicos. *Distribución y Consumo*, Noviembre-Diciembre 2011, 120: 49-58. Disponible: (http://www.mercasa.es/files/multimedios/1323972080_pag_049-059_Cerdeno.pdf).
234. Martínez-Tomé, M., Vera, A. M., y Murcia, A. (2000). Improving the control of food production in catering establishments with particular reference to the safety of salads. *Food Control*, 11(6): 437–445.
235. Masana, M.O. y Baranyi, J. (2000a) Adding new factors to predictive models: The effect on risk extrapolation. *Food Microbiology*, 17(4):367–374.
236. Masana, M.O. y Baranyi, J. (2000b) Growth/No Growth interface of *Brochothrix thermosphacta* as a function of pH and water activity. *Food Microbiology*, 17(5): 485– 493.
237. Matagaras, M., Drosinos, E.H. y Metaxopoulos, J. (2003) Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at $4 \pm 2^\circ\text{C}$. *Food Microbiology*, 20: 259–265.

238. Mazzota, A.S. (2001) Thermal inactivation of stationary-phase and acid-adapted *Escherichia coli* O157-H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. *Journal of Food Protection*, 64(3): 315-320.
239. Mbandi, E., y Shelef, L. A. (2002). Enhanced antimicrobial effects of combination of lactate and diacetate on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in beef bologna. *International Journal of Food Microbiology*, 76 (3): 191-198.
240. McCarthy, P.V., Guzewich, J.J., Braden, C.R., Klontz, K.C., Hedberg, C.W., Fullerton, K.E., Bogard, A., Dreyfuss, M., Larson, K., Vugia, D., Nichols, D.C., Radke, V.J., Shakir, F.K. y Jones, T.F. (2006) Contributing factors (CFs) identified in produce-associated outbreaks from CDC's National Electronic Foodborne Outbreak Reporting System (eFORS), FoodNet sites, 1999-2002. Presented at the International Conference on Emerging Infectious Diseases, Atlanta, 19 to 22 March 2006.
241. McClure, P.J. Baranyi, J. Boogard, E. Kelly, T.M. y Roberts, T.A. (1993) A predictive model for the combined effect of pH, sodium chloride and storage temperature on the growth of *Brochothrix thermosphacta*. *International Journal of Food Microbiology*, 19(3): 161-178.
242. McDonald, K., Sun, D-W (1999) Review. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 52 (1-2): 1-27.
243. McEvoy, J.L., Luo, Y., Zhou, B., Feng, H., Conway, W.S. (2008) Potential of *Escherichia coli* O157:H7 to grow on field-cored lettuce as impacted by postharvest storage time and temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 128:506-509.
244. McKellar, R., Lu, X. y Delaquis, P. (2002) A probability model describing the interface between survival and death of *Escherichia coli* O157:H7 in a mayonnaise model system. *Food Microbiol* 19: 235-247.
245. McKellar, R.C. (1997). A heterogeneous population model for the analysis of bacterial growth kinetics. *International Journal of Food Microbiology*, 36(2-3): 179-186.
246. McKellar, R.C. y Lu, X. (2004) Modeling Microbial Response in Food. CRC series in contemporary food science. CRC PRESS Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.
247. McMeekin, T.A., Chandler, R.E., Doe, P.E., Garland, C.D., Olley, J., Putro, S. y Ratkowsky, D.A (1987) Model for the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *Staphylococcus xylosum*. *Journal of Applied Bacteriology*, 62: 543-550

248. McMeekin, T.A., K. Presser, D.A. Ratkowsky, T. Ross, M. Salter, y S. Tienungoon. (2000) Quantifying the hurdle concept by modelling the bacterial growth/ no growth interface. *International Journal of Food Microbiology*, 55: 93-98
249. McMeekin, T.A., Olley, J.N. Ross, T. y Ratkowsky, D.A (1993) Predictive Microbiology: Theory and Application. John Wiley & Sons, New York.
250. Mead, P.S., Slutsker, L., Mccaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M. y Tauxe, R.V. (1999) Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Disease*, 5(5): 605-625.
251. Mejlholm, O., Gunvig, A., Borggaard, C., Blom-Hanssen, J., Mellefont, L., Ross, T., Leroi, F., Else, T., Visser, D., Dalgaard, P. (2010) Predicting growth rates and growth boundary of *Listeria monocytogenes*. An international validation study with focus on processed and ready-to-eat meat and seafood. *International Journal of Food Microbiology*, 141(3): 137-150.
252. Meldrum, R.J., Little, C.L., Sagoo, S.K., Mithani, V., McLauchlin, J., de Pinna, E. (2009a) Microbiological quality of salad vegetables and sauces from kebab take-away restaurants in the United Kingdom. *Food Microbiology*, 26: 573-577
253. Meldrum, R.J., Mannion, P.T. y Garside, J. (2009b) Microbiological quality of ready-to-eat food served in schools in Wales, United Kingdom. *Journal of Food Protection*, 72(1): 197-201.
254. Membré, J.M. y Lambert, R.J.W. (2008) Application of predictive modelling techniques in industry: From food design up to risk assessment. *International Journal of Food Microbiology*, 128(1): 10-15.
255. Membré, J.M., Leporq, B., Vialette, M., Mettler, E., Perrier, L., Thuault, D., y Zwietering, M. (2005) Temperature effect on bacterial growth rate: quantitative microbiology approach including cardinal values and variability estimates to perform growth simulations on/in food. *International Journal of Food Microbiology*, 100 (1-3): 179-186.
256. Méndez, A.D.G. (2008). Aplicación de la Técnica de IV Gama para la elaboración de ensaladas. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 61(2): 4658-4666.
257. Meng, J., Doyle, M.P (1998) Microbiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. In: Kaper, JB, O'Brien AD (Ed.). *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin producing *E. coli* strains (pages 92-108). Washington D.C., ASM Press.
258. Meng, J., Doyle, M.P., Zhao, T., y Zhao, S. (2001) Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In M.P. Doyle, L.R. Beuchat and T.J. Montville (Eds.), *Food microbiology: Fundamentals and frontiers*. Pages 193-213. Washington, DC: ASM Press.

259. MERCASA. Alimentación en España 2011. Disponible: (www.mercasa.es).
260. MERCASA. Hortalizas II. Alimentación en España. *Distribución y Consumo*, 118, Julio-Agosto 2011, páginas 53–87. Disponible: (http://www.mercasa.es/files/multimedios/1311869139_pag_053-087_hortalizasii.pdf).
261. Michaels, B. (2004b) Clean operation. Understanding the glove risk paradigm. Part II. *Food Safety Magazine* 10(4):32.
262. Michaels, B., Gangar, V., Ayers, T., Meyers, E., Curiale, M.S. (2001) The significance of hand drying after handwashing. In: Edwards JSA, Hewedi MM, (Ed.). *Culinary arts and science III global and national perspectives*. Bournemouth University, UK: Worshipful company of cooks centre for culinary research at Bournemouth University, 294-301
263. Michaels, B., Gangar, V., Meyers, E., Johnson, H. y Curiale, M. (2000) The significance of hand drying after handwashing. *Journal of Food Protection*, 63 (Suppl. A):106.
264. Michaels, B., Keller, Ch., Blevins, M., Paoli, G., Ruthman, T., Todd, E., y Griffith, Ch.J. (2004a) Prevention of food worker transmission of foodborne pathogens: risk assessment and evaluation of effective hygiene intervention strategies. *Food Service Technology*, 4(1): 31–49.
265. Michino, H. y Otsuki, K. (2000) Risk factors in causing outbreaks of food-borne illness originating in school lunch facilities in Japan. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 62 (5), 557–560.
266. Microbiological guidelines for ready-to-eat-foods (2007). Centre for Food Safety. Available: (http://www.cfs.gov.hk/english/whatsnew/whatsnew_act/files/MBGL_RTE%20food_e.pdf).
267. Microbiological quality guide for ready-to-eat foods. A guide to interpreting microbiological results (2009). NSW Food Authority. Available: (http://www.foodauthority.nsw.gov.au/_Documents/science/microbiological_quality_guide_for_RTE_food.pdf).
268. Miettinen, M.K., Björkroth, K.J. y Korkeala, H.J. (1999) Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal Food Microbiology*, 46(3):187–192.
269. Millicent, E., Sewell, C.M., Graves, G. y Olson, R. (2000) Beef Jerky gastroenteritis outbreaks. *Journal of Environmental Health*, 62 (6).

270. Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA). Consumo Alimentario en España 2011. Disponible: (http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/EL_CONSUMO_ALIMENTARIO_EN_ESPA%C3%91A_2011_tcm7-197862.pdf).
271. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA). El Consumo Alimentario en España Año 2011. Disponible: (<http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/panel-de-consumo-alimentario/ultimos-datos/>).
272. Mokhtari, A., y Jaykus, L.A. (2009) Quantitative exposure model for the transmission of norovirus in retail food preparation. *International Journal of Food Microbiology*, 133 (1–2): 38–47.
273. Montville, T.J. y Mathew, K.R. (2009) Microbiología de los alimentos. Introducción. Acribia (Ed.) S.A, Zaragoza.
274. Moore, C.M., Sheldon, B.W., y Jaykus, L.A. (2003) Transfer of *Salmonella* and *Campylobacter* from stainless steel to romaine lettuce. *Food Protection*, 66(12): 2231–2236.
275. Mossel, D.A.A, Moreno, B., Struijk, C.B. (2003) Microbiología de los alimentos (2da Edición). Acribia (Ed.) S.A, Zaragoza.
276. Murphy, R.Y. Duncan, L.K. Johnson, E.R. Davis, M.D. y Smith, J.N. (2002) Thermal inactivation *D* and *z* values of *Salmonella* serotypes and *Listeria innocua* in chicken patties, chicken tenders, franks, beef patties, and blended beef and turkey patties. *Journal of Food Protection*, 65(1): 53-60.
277. Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Kobayashi, G.S. y Pfaller, M.A. (2002) Medical Microbiology. St. Louis: Mosby.
278. Naidoo, K., y Lindsay, D. (2010). Potential cross-contamination of the ready-to-eat dried meat product, biltong. *British Food Journal*, 112: 350–363.
279. Nakashima, S.M.K., André, C.D.S., Franco, B.D.G.M. (2000) Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Predictiva. *Brazilian Journal of Food Technology*, 3: 41-51.
280. Nataro, J.P. y Kaper, J.B. (1998) Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1): 142-201.

281. Nissen, H., Rosnes, J.T., Brendehaug, J. y Kleiberg, G.H. (2002) Safety evaluation of sous vide-processed ready meals. *Letters in Applied Microbiology*, 35 (5): 433–438.
282. Noble, P.A. (1999) Hypothetical model for monitoring microbial growth by using capacitance measurements: a minireview. *Journal of Microbiological Methods*, 37(1): 45–49.
283. Nollas, J. (2002) Listeriosis, síntomas variables y mortalidad elevada. Disponible: (<http://www.adiveter.com/ftp/articles/articulo1571.pdf>).
284. Nörrung, B. y Buncic, S. (2008) Microbial safety of meat in the European Union. Original Research Article. *Meat Science*, 78(1–2): 14–24.
285. Notermans, S. y Heuvelman, C.J. (1983) Combined effect of water activity, pH and suboptimal temperature on growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Science*, 48(6): 1832–1835.
286. Nuorti, J.P, Niskanen, T., Hallanvuo, S., Mikkola, J., Kela, E., Hatakka, M., Fredriksson-Ahomaa, M., Lyytikäinen, O., Siitonen, A., Korkeala, H., y Ruutu, P.A. (2004) Widespread outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* O:3 infection from iceberg lettuce. *Journal of Infection Diseases*, 189(5): 766–774.
287. Nychas, G.J.E., Skandamis, P.N., Tassou, C.C. y Koutsoumanis, K.P. (2008) Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, 78 (1–2): 77–89.
288. Nygard, K., Andersson, Y., Lindkvist, P., Ancker, C., Asteberg, I., Dannelun, E., Eitrem, R., Hellstrom, L., Insulander, M., Skedebant, L., Stenqvist, K. y Giesecke, J.G (2001) Imported rocket salad partly responsible for increased incidence of hepatitis A cases in Sweden, 2000–2001. *Eurosurveillance*, 6, 151–153.
289. Nygard, K., Lassen, J., Vold, L., Aavitsland, P. y Fisher, I. (2007) International outbreak of *Salmonella Thompson* caused by contaminated rucola salad – update. *Eurosurveillance*, 8, E041216.
290. O’Beirne, D. (1995) Influence of raw material and processing on quality of minimally processed vegetable. Progress highlight C/95 “Improvement of the safety and quality of refrigerated ready to eat foods using novel mild preservation techniques “ AIR1-CT 92-0125 project group.
291. Ohlsson, T. (1994) Minimal processing preservation methods of the future: an overview. *Trends in Food Science and Technology*, 5(11): 341–344.
292. Oliveira, M.A., de Souza, V.M., Morato, A.M.B., Pereira, E.C.D.M. (2011) Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. *Food Control*, 22 (8): 1400–1403.

293. Ölmez, H., y Kretzschmar, U. (2009) Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT—Food Science and Technology*, 42 (3): 686–693.
294. Olsen, S.J, Patrick, M., Hunter, S.B., Reddy, V., Kornstein, L., MacKenzie, W.R., Lane, K., Bidol, S., Stoltman, G.A., Frye, D.M., Lee, I., Hurd, S., Jones, T.F., LaPorte, T.N., Dewitt, W., Graves, L., Wiedmann, M., Schoonmaker-Bopp, D.J., Huang, A.J., Vincent, C., Bugenhagen, A., Corby, J., Carloni, E.R., Holcomb, M.E., Woron, R.F., Zansky, S.M., Dowdle, G., Smith, F., Ahrabi-Fard, S., Ong, A.R., Tucker, N., Hynes, N.A., Mead, P. (2005) Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infection linked to delicatessen turkey meat. *Clinical Infectious Diseases*, 40(7): 962-967.
295. Ömer, M.K., Alvseike, O., Holck, A., Axelsson, L., Prieto, M., Skjerve, E., y Heir, E. (2010) Application of high pressure processing to reduce verotoxigenic *E. coli* in two types of dry-fermented sausage. *Meat Science*, 86 (4): 1005–1009.
296. Orden, de 5 de Noviembre de 1981, por la que se aprueba la norma genérica de calidad para productos cárnicos tratados por del calor. (B.O.E. 09.11.1981).
297. Orientaciones para la aplicación del autocontrol en los establecimientos de comidas preparadas. Dirección General De Salud Pública. Gobierno de Aragón (2006).
298. Ouattara, B., Simard, R.E., Piette G., Begin A. y Holley, R.A. (2000). Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 62 (1–2): 139-148.
299. Özkaya, F., Aslim, B. y Özkaya, M. T. (2007) Effect of exopolysaccharides (EPS) produced by *Lactobacillus delbrueckii* susp. bulgaricus strains to bacteriophage and nisin sensitivity of the bacteria. *LWT*, 40: 564–568.
300. Papadopoulou, O.S. Chorianoopoulos, N.G., Gkana, E N., Grounta, A.V., Koutsoumanis, K. P. y Nychas, G.J.E (2012) Transfer of foodborne pathogenic bacteria to non-inoculated beef fillets through meat mincing machine. *Meat Science*, 90 (3): 865–869.
301. Parra–Huertas, R.A. (2010) Review–Lactic Acid Bacteria: Functional role in foods. Facultad de Ciencias Agropecuarias, 8(1). Enero-Junio, 2010.
302. Pascual-Anderson, M.R. (1989) Microbiología alimentaria: Detección de bacterias con significado higiénico sanitario. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo.
303. Patrick, D.R., Findon, G. y Miller, T.E. (1997) Residual moisture determines the level of touch-contact-associated bacterial transfer following hand washing. *Epidemiology and Infection* *Epidemiology and Infection*, 119 (3): 319-325.

304. Paulson, D. S. (1996) To glove or to wash: current controversy. *Food Quality*: 60–64.
305. Pedregal, C.F., García, M.F., Naharro, A.M. y López, H.F. (2002) Estudio microbiológico y condiciones sanitarias de los comedores no permanentes en Albacete. *Centro de Salud*: 408–415.
306. Peleg, M. y Cole, M. B. (1998). Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science*, 38(5): 353.
307. Pennington, H. (1998) Factors involved in recent outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 in Scotland and recommendations for its control. *Journal of Food Safety*, 18 (4): 383–391.
308. Pepe, O., Blaiotta, G., Bucci, F., Anastasio, M., Aponte, M. y Villani, F. (2006) *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxin A in breaded chicken products: detection and behavior during the cooking process. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11): 7057–7062.
309. Pérez-Rodríguez, F., Castro, R., Posada-Izquierdo, G.D., Valero, A., Carrasco, E., García-Gimeno, R.M., Zurera, G. (2010) Evaluation of hygiene practices and microbiological quality of cooked meat products during slicing and handling at retail *Meat Science*, 86(2): 479–485.
310. Pérez-Rodríguez, F., Todd, E. C. D., Valero, A., Carrasco, E., García, R. M. y Zurera, G. (2006) Linking quantitative exposure assessment and risk management using the food safety objective concept: an example with *Listeria monocytogenes* in different cross-contamination scenarios. *Journal of Food Protection*, 69(10): 2384–2394.
311. Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Todd, E. C. D., Carrasco, E., García-Gimeno, R. M., y Zurera, G. (2007). Modeling transfer of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* during slicing of a cooked meat product. *Meat Science*, 76(4), 692–699.
312. Pérez-Silva, M.C.G., Belmonte, S. C. y Martínez, J.C. (1998) Estudio microbiológico de los alimentos elaborados en comedores colectivos de alto riesgo. *Revista Especial de Salud Pública*, 72 (1): 67-75.
313. Pin, C., Baranyi, J. y de Fernando, G. (2000) Predictive model for the growth of *Yersinia enterocolitica* under modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, 88(3):521-530.
314. Ponce, A., Roura, S.I. y Moreira, M.R. (2011) Essential oils as biopreservatives: Different methods for the technological application in lettuce leaves. *Journal of Food Science*, 76(1):M34–M40.

315. Prendergast, D.M., Duggan, S.J., Fanning, S., Cormican, M., Gonzales-Barron, U., Butler, F. y Duffy, G. (2008) Prevalence and numbers of *Salmonella* spp. And *Enterobacteriaceae* on pork cuts in abattoirs in the Republic of Ireland. *Journal of Applied Microbiology*, 105(4): 1209–1219.
316. Prescott, L.M., Harley, J.P. y Klein, D.A. Microbiology 2005. Six Edition.
317. Presser, K.A., Ratkowsky, D.A. y Ross, T. (1997) Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6): 2355–2360
318. Presser, K.A., Ross, T. y Ratkowsky, D.A. (1998) Modeling the growth limits (growth/ no growth interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature, pH, lactic acid concentration, and water activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(5): 1773-1779.
319. Rabbi, F.A., Rabbi, F., Runun, T.A., Zaman, K., Majibur, M.R. y Noor, R. (2011) Microbiological quality assessment of foods collected from different hospitals within Dhaka City. *Stamford Journal of Microbiology*, 1(1).
320. Rajpura, A., Lamden, K., Forster, S., Clarke, S., Cheesbrough, J., Gornall, y S., Waterworth, S. (2003) Large outbreak of infection with *Escherichia coli* O157 PT21/28 in Ecclestone, Lancashire, due to cross contamination at a butcher's counter. *Communicable Disease and Public Health*, 6(4): 279-284.
321. Randazzo, C.L., Pitino, L., Ombretta, G.S., y Caggia, C. (2009) Biopreservation of minimally processed iceberg lettuces using a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* wild strain. *Food Control*, 20 (8): 756-763.
322. Rasch, M (2004) Experimental design and data collection. In: R.C. McKellar and X. Lu (Ed) Modelling microbial responses in food. CRC Series in Contemporary Food Science. CRC Press: 1–4.
323. Rasch, M. (2002) The influence of temperature, salt and pH on the inhibitory effect of reuterin on *Escherichia coli*. *International Journal Food Microbiology*, 72(3):225–231.
324. Ratkowsky, D.A. (2002). Some examples of, and some problems with, the use of nonlinear logistic regression in predictive food microbiology. *Int J Food Microbiol* 73: 119-125.
325. Ratkowsky, D.A. y Ross, T., (1995) Modelling the bacterial growth/ no growth interface. *Letter Applied Microbiology*, 20(1): 29–33.

326. Ratkowsky, D.A., Lowry, R.K., McMeekin, T.A., Stokes, y Chandler, R.E. (1983) Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *Journal of Bacteriology*, 154(3): 1222-1226.
327. Ratkowsky, D.A., Olley, J., McMeekin, T.A. y Ball, A. (1982). Relationship between temperature and growth rates of bacterial cultures. *J Bacteriol* 149: 1-5.
328. Ray, B. (2004) *Fundamental Food Microbiology*. 3rd. Edition. CRC Press. p-608.
329. Raybaudi-Massilia, R.M., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R., y Martin-Belloso, O. (2009) Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *Comprehensive Reviews of Food Science and Food Safety*, 8(3): 157-180.
330. Real Decreto 109/2010, de 5 de febrero, por el que se modifican diversos reales decretos en materia sanitaria para su adaptación a la Ley 17/2009, de 23 de noviembre, sobre el libre acceso a las actividades de servicios y su ejercicio y a la Ley 25/2009, de 22 de diciembre, de modificación de diversas leyes para su adaptación a la Ley sobre el libre acceso a las actividades de servicios y su ejercicio. Boletín Oficial del Estado, Nº 44 de 19 Febrero de 2010, páginas 16160-16164.
331. Real Decreto 135/2010, de 12 de febrero, por el que se derogan disposiciones relativas a los criterios microbiológicos de los productos alimenticios. Boletín Oficial Del Estado Nº 49 de 25 Febrero de 2010 (Sección I), páginas 18297-18299.
332. Real Decreto 202/2000, de 11 de febrero, por el que se establecen las normas relativas a los manipuladores de alimentos. (Derogado).
333. Real Decreto 3484/2000, de 29 de diciembre, por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas. Boletín Oficial del Estado, Nº 11 de 12 de enero de 2001, páginas 1435-1441.
334. Regan, C.M., Syed, Q. y Tunstall, P.J. (1995) A hospital outbreak of *Clostridium perfringens* food poisoning: Implications for food hygiene review in hospitals. *Journal of Hospital Infection*, 29(1): 69-73.
335. Reglamento (CE) 1234/2007 del Consejo, de 22 de octubre de 2007, por el que se crea una organización común de mercados agrícolas y se establecen disposiciones específicas para determinados productos agrícolas (Reglamento único para las OCM). Diario Oficial de la Unión Europea (DOCE), Nº 299 de 16 de noviembre de 2007: 1 -149.
336. Reglamento (CE) 2073/2005, de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE) L 338: 1-26.

337. Reglamento (CE) 288/2009, de 7 de abril de 2009, por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) Nº 1234/2007 del Consejo en lo relativo a la concesión de una ayuda comunitaria para la distribución de frutas y hortalizas, frutas y hortalizas transformadas y productos del plátano a los niños en los centros escolares, en el marco de un plan de consumo de fruta en las escuelas. Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE) L 94: 38–47.
338. Reglamento (CE) 852/2004, de 29 de abril 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios. Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) L 139:1-54.
339. Reglamento (CE) 882/2004, de 29 de abril 2004, sobre controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales. Diario Oficial de Unión Europea (DOUE) L 139: 1-141.
340. Reglamento (CE) Nº 178/2002 Del Parlamento Europeo Y Del Consejo de 28 de enero de 2002 por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) L 31: 1-24.
341. Réglie-Poupet, C., Parain, R., Beauvais, P., Descamps, H., Gillet, H., Le Peron, J.Y., Berche, P., Ferroni, A. (2005) Evaluation of the quality of hospital food from the kitchen to the patient. *Journal of Hospital Infection*, 59(2): 131-137.
342. Renata, J. (2010) Microbial quality of ready-to-eat foods available to populations of different demographics. Thesis submitted to the Faculty of Drexel University for the degree of Master of Science in Biology.
343. Report of the independent investigator into the 2008 Listeriosis outbreak. Canadian Food Inspection Agency (CFIA) (2008). Available: (<http://www.inspection.gc.ca>).
344. Restauración en Servicios Hospitalarios (2008). Sanidad. Colectivo de autores. Vértice (Ed), España.
345. Rippel B. (2002) Consumer knowledge about food safety revealed. Washington, DC: Consumer Alert.
346. Roberts, K.R., Barrett, B.B., Howells, A.D., Shanklin, C.W. Pilling, V.K. y Brannon, L.A. (2008) Food safety training and foodservice employees' knowledge and behavior. *Food Protection Trends*, 28 (4): 252–260.
347. Roberts, T.A, Pitt, J.I., Farkas, J. y Gran, F.H. (1998) Microorganisms in foods 6. Microbial ecology of food commodities. Chapter 1: Meat and meat products. ICMSF, Blackie Academic and Professional, pages 1-74.

348. Robins-Browne, R.M. y Hartland, E.L. (2002) *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 17(4): 467-475.
349. Robinson, T.P., Ocio, M.J., Kaloti, A. y Mackey B.M. (1998) The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 44(1-2): 83-92.
350. Rode, T.M., Langsrud, S., Holck, A. y Moretro, T. (2007) Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. Original Research Article. *International Journal of Food Microbiology*, 116(3):372-383.
351. Rodríguez-Montoya, M.C. (2003) Productos cárnicos tratados por calor. Observatorio de seguridad alimentaria. Universidad Autónoma de Barcelona Disponible: (<http://biblioteca.ucn.edu.co/repositorio/Zootecnia/procesamiento-de-carnes/documentos/productos%20carnicos%20tratados%20por%20calor.pdf>)
352. Rodríguez, E., Arques, J.L., Nuñez, M., Gaya, P., y Medina, M. (2005). Combined effect of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in raw-milk cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7):3399-3404.
353. Rodríguez, R. V.M. y Simón M.E. (2008) Base de la alimentación humana. Capítulo 2: Carnes y productos cárnicos. páginas 87-98. Gesbiblo, S.L (Ed.).
354. Rodríguez-Pérez, M.R, Zurera-Cosano, G., García-Gimeno, R.M., Barco-Alcalá, E. y Castillejo-Rodríguez, A.M. (2003) Sensory and microbiological quality evaluation of vacuum packed sliced cooked chicken breast. Shelf life estimation. *Journal Food Quality*, 26 (2):105-122.
355. Roldán, M.L., Chinen, I., Otero, J.L., Miliwebsky, E. S., Alfaro, N., Burns, P. y Rivas, M. (2007) Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de productos cárnicos y leche. *Revista Argentina de Microbiología*, 39(2): 113-119.
356. Romero, Moreno, D. (2008) Análisis del sector de la restauración en España: Oferta y peso económico actual. Revista Digital Innovación y Experiencias Educativas. No. 13. ISSN: 1988-6047. (www.csic-csif.es).
357. Ross, T., McMeekin, T.A., 1994. Predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, 23(2-3): 241-264.
358. Ross, T., Ratkowsky, D.A., Mellefont, L.A. y McMeekin, T.A. (2003) Modelling the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth rate of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 82 (1): 33- 43.

359. Rosset, P., Cornu, M., Noe, V., Morelli, E., Poumeyrol, G. (2004) Time-temperature profiles of chilled ready-to-eat foods in school catering and probabilistic analysis of *Listeria monocytogenes* growth. *International Journal of Food Microbiology*, 96 (1): 49-59.
360. Rosso, L., Lobry, J.R. y Flandrois J.P. (1993) An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. *Journal of Theoretical Biology*, 162(4): 447-463.
361. Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S. y Flandrois, J.P. (1995). Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Applied Environmental Microbiology*, 61: 610-616.
362. Rowe, B., Gross, R.J., Lindop, R. y Baird, R.B. (1974) A new *E. coli* O group O158 associated with an outbreak of infantile enteritis. *Journal of Clinical Pathology*, 27: 832-833.
363. Ryu, J.H., Ko, J., Park, H., Yang, S. y Kim, H. (2011) Microbial examination of non-heated foods served in feeding programs of elementary schools, Iksan City, Jeonbuk Province, Korea. *Journal of Food Protection*, 74(9): 1564-1568.
364. Salter, A.M., Ratkowsky, D.A., Ross, T. y McMeekin, T.A. (2000) Modelling the combined temperature and salt (NaCl) limits for growth of a pathogenic *Escherichia coli* strain using nonlinear logistic regression. *International Journal of Food Microbiology*, 61(2-3): 159-167.
365. Samelis, J. y Metaxopoulos, J. (1999) Incidence and principal sources of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* contamination in processed meats and a meat processing plant. *Food Microbiology*, 16(5): 465-477.
366. Samelis, J., Kakouri, A. y Rementzi, J. (2000) Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. *Food Microbiology*, 17(3): 329-340.
367. Samelis, J., Kakouri, A., Georgiadou, K.G. y Metaxopoulos, J. (1998) Evaluation of the extent and type of bacterial contamination at different stages of processing of cooked ham. *Journal of Applied Microbiology*, 84(4): 649-660.
368. Santana, N.G., Almeida, R.C.C., Ferreira, J.S. y Almeida, P.F. (2009) Microbiological quality and safety of meals served to children and adoption of good manufacturing practices in public school catering in Brazil. *Food Control*, 20 (3): 255-261.

369. Santos, M.I., Cavacod, A., Gouveia, J., Novais, M.R., Nogueira, P.J., Pedroso, L. y Ferreira, M.A.S.S. (2012) Short communication–Evaluation of minimally processed salads commercialized in Portugal. *Food Control*, 23 (1): 275–281.
370. Scannell, A.G, Hill, C., Ross, R.P., Marx, S., Hartmeier, W., y Elke, A.K. (2000) Development of bioactive food packaging materials using immobilized bacteriocins lacticin 3147 and nisaplin. *International Journal of Food Microbiology*, 60(2–3):241-249.
371. Schelin, J. Wallin-Carlquist, N., Thorup, M.C. Lindqvist, R., Barker, G.C. y Radstrom, P. (2011) The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence*, 2 (6): 580-592.
372. Scherrer, D., Corti, S., Muehlherr, J.E., Zweifel, C. y Stephan, R. (2004) Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goat and sheep. *Veterinary Microbiology*, 101(): 101–107.
373. Schlievert, P.M. y Case, L.C. (2007) Molecular analysis of staphylococcal super antigens. *Methods in Molecular Biology*, 391: 113–126.
374. Schreck, S. (2010) *E. coli* O145 outbreak linked to lettuce. *Food Safety News*. Disponible en: (<http://www.foodsafetynews.com/2010/05/e-coli-o145-outbreak-linked-to-lettuce/>) Acceso: Agosto 2012.
375. Scott, E. (2003) Food safety and foodborne disease in 21st century homes. *Canadian Journal of Infectious Diseases*, 14(5): 277–280.
376. Scott, E., y Bloomfield, S.F. (1990) The survival and transfer of microbial-contamination via cloths, hands and utensils. *Journal of Applied Bacteriology*, 68 (3), 271–278.
377. Sekse, C., O'Sullivan, K., Granum, P.E., Rørvik, L.M., Wasteson, Y. y Jørgensen, H.J. (2009) An outbreak of *Escherichia coli* O103:H25-Bacteriological investigations and genotyping of isolates from food. Original Research Article. *International Journal of Food Microbiology*, 133, (3): 259-264.
378. Senerwa, D., Olsvik, O., Mutanda, L.N., Lindqvist, K.J., Gathuma, J.M., Fossum, K. y Wachsmuth, K. (1989) Enteropathogenic *Escherichia coli* serotype O111: HNT isolated from pre-term neonates in Nairobi, Kenya. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(6): 1307–1311.
379. Seng, S.C. y Badji, A.S. (1993) The effect of cook-chill system on the microbiological status of some Malaysian meals. *Asian Food Journal* 8(3): 94–98.

380. Shaker, R., Osailia, T., Al-Omary, W., Jaradata, Z. y Al-Zuby, M. (2007) Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacter* sp. from food and food production environments. *Food Control*, 18 (10): 1241–1245.
381. Shapton, D.A. y Shapton, N.F. (1991) Principles and practices for the safe processing of foods. Butterworth-Heinemann, Oxford.
382. Sheen, S. y Hwang, Ch-A. (2010) Mathematical modeling the cross-contamination of *Escherichia coli* O157:H7 on the surface of ready-to-eat meat product while slicing. *Food Microbiology*, 27 (1): 37–43.
383. Shelef, L. A., y Potluri, V. (1995). Behavior of food-borne pathogens in cooked liver sausage containing lactates. *Food Microbiology*, 12 (3): 221–227.
384. Shigehisa, T., Ohmori, T., Saito, A., Taji, S., y Hayashi, R. (1991) Effects of high pressure on the characteristics of pork slurries and inactivation of microorganisms associated with meat and meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 12 (2–3): 207 – 216.
385. Silva Jr, E.A. (2007) Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação. Página 623. Sexta Edição. São Paulo: Varela.
386. Simon, S.S. y Sanjeev, S. (2007) Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers. *Food Control*, 18(12): 1565–1568.
387. Skandamis, N.P., Stopforth, D.J., Kendall, A.P., Belk, E.K., Scanga, A.J., Smith, C.G. y Sofos, N.J. (2007) Modelling the effect of inoculum size and acid adaptation on growth/no growth Interface on *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*, 120(3): 237-249.
388. Smith, C.D.W. y Dahl, E. (1996) Dine at your own risk: The failure of local agencies to adopt and enforce national food safety standards for restaurants. Washington, DC: Center for Science in the Public Interest.
389. Smith, R. (1994) Food hygiene training: the chance to create a coherent training policy. *British Food Journal*, 96(7), 41–45.
390. Smyth, C.J., Smyth, D.S., Kennedy, J., Twohig, J. y Bolton, D.J. (2004) *Staphylococcus aureus*: from man or animal—an enterotoxin iceberg? In: Maunsell, B., Sheridan, J., Bolton, D.J. (Eds.), EU-RAIN. Teagasc. The National Food Centre 2004, Padua, Italy.
391. Sneed, J., Strohbahn, C., Shirley, A.G. y Mendonca, J. (2004) Microbiological evaluation of foodservice contact surfaces in Iowa assisted-living facilities. *Journal of the American Dietetic Association*, 104(11): 1722–1724.

392. Snelling, A.M. Saville, T. Stevens, D. y Beggs, C.B. (2011) Comparative evaluation of the hygienic efficacy of an ultra-rapid hand dryer vs conventional warm air hand dryers. *Journal Applied Microbiology*, 110(1):19-26.
393. Snyder, O. P. (1999). A "Safe Hands" hand wash program for retail food operations. St. Paul, MN: Hospitality Institute of Technology and Management.
394. Soares, L.S., Almeida, R.C.C., Cerqueira, E.S., Carvalho, J.S. y Nunes, I.L. (2012) Knowledge, attitudes and practices in food safety and the presence of coagulase-positive staphylococci on hands of food handlers in the schools of Camaçari, Brazil Original Research Article. *Food Control*, 27(1): 206–213.
395. Soares, N.F.F., y Geraldine, R.M. (2007). Aspectos Gerais da Tecnologia de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças: Embalagens. In C. L. Moretti (Ed.), Manual de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças (Paginas 153–172). Brazil, Brasília, DF: Embrapa Hortaliças.
396. Soderström, A., Lindberg, A. y Andersson, Y. (2005) EHEC O157 outbreak in Sweden from locally produced lettuce, August–September 2005. *Eurosurveillance*, 10(38), E050922.1.
397. Solberg, M., Buckalew, J.J., Chen, C.M., Schaffner, D.W., O'Neill, K., McDowell, J., Post, L.S. y Boderk, M. (1990) Microbiological safety assurance system for foodservice facilities. *Food Technology*, 44(12): 68–73.
398. Soler, M.M., y Horcadas, I. (2010) La producción de carne en Andalucía. Capítulo 3: La carne en Andalucía en el contexto de la globalización: Análisis de las macromagnitudes económicas y productivas. Junta de Andalucía. Conserjería de Agricultura y Pesca (Ed.): 43–83.
399. Soliva, R. y Martín, O. (2003) New advances in extending the shelf-life of fresh-cut fruits: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 14(9): 341- 353.
400. Sorensen, B. y Jakobsen, M. (1997) The combined effects of temperature, pH and NaCl on growth of *Debaryomyces hansenii* analyzed by flow cytometry and predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, 34(3): 209-220.
401. Stewart, C.M., Cole, M.B., Legan, J.D., Slade, L., Vandeven, M.H. y Schaffner, D.W. (2001) Modeling the growth boundary of *Staphylococcus aureus* for risk assessment purposes. *Journal of Food Protection*, 64(1): 51-57.
402. Stringer, S.C. George, S.M. y Peck, M.W. (2000) Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7. Symposium Series (Society for Applied Microbiology), Vol.88. 79S-89S.

403. Sun, Y.M., y Ockerman, H.W. (2005) A review of the needs and current applications of hazard analysis and critical control point (HACCP) system in foodservice areas. *Food Control*, 16 (4): 325–332.
404. Sutherland, J.P., Bayliss A.J. y Roberts, T.A. (1994) Predictive modelling of growth of *Staphylococcus aureus*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *International Journal of Food Microbiology*, 21(3): 217–236.
405. Sutherland, J.P., Bayliss, A.J. y Braxton, D.S. (1995) Predictive modelling of growth of *Escherichia coli* O157:H7: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *International Journal of Food Microbiology*, 25(1): 29–49.
406. Takkinen, J., Nakari, U.M., Johansson, T., Niskanen, T., Siitonen, A. y Kuusi, M. (2005) A nationwide outbreak of multi-resistant *Salmonella* Typhimurium var Copenhagen DT104b infection in Finland due to contaminated lettuce from Spain, May 2005. *Eurosurveillance*, 10 (26), E050630.1.
407. Takumi, K. de Jonge, R. & Havelaar, A. (2000). Modelling inactivation of *Escherichia coli* by low pH: application to passage through the stomach of young and elderly people. *Journal of Applied Microbiology*, 89(6): 935-943.
408. Tallent, S.M., Rhodehamel, E.J., Harmon, S.M. y Bennett, R.W (2001) *Bacillus cereus*. Chapter 14. Bacteriological Analytical Manual (<http://www.fda.gov>).
409. Tapia, M.S., Raybaudi-Massilia, R.M. y Martín-Belloso, O. (2005) Patógenos asociados a frutas frescas cortadas. Incidencia, supervivencia y crecimiento, brotes y control. Simposio “Nuevas tecnologías de conservación y envasado de frutas y hortalizas. Vegetales frescos cortados” La Habana, Cuba. Marzo 2005.
410. Tauxe, R. Foodborne disease. (2000) In Mandell Douglas and Benett’s. Principles and Practice of Infectious Diseases.
411. Tessi, M.A., Aringoli, E.E., Pirovani, M.E., Vincenzini, A.Z., Sabbag, N.G., Costa, S.C., Garcia, C.C., Zannier, M.S., Silva, E.R y Moguilevsky, M.A. (2002) Microbiological quality and safety of ready-to-eat cooked foods from a centralized school kitchen in Argentina. *Journal of Food Protection*, 65(4): 636-642.
412. Thomas, D.Y., Jarraud, S., Lemerrier, B., Cozon, G., Echasserieau, K., Etienne, J., Gougeon, M.L., Lina, G. y Vandenesch, F. (2006) Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal super antigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. *Infection and Immunology*, 74(8): 4724–4734.

413. Tian, J.Q., Bae, Y.M., Choi, N.Y., Kang, D.H., Heu, S. y Lee, S.Y. (2012) Survival and Growth of Foodborne Pathogens in Minimally Processed Vegetables at 4 and 15 °C. *Journal of Food Science*, 77(1):M48–M50.
414. Tienungoon, S., Ratkowsky, D.A. y McMeekin, T.A. (2000) Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11): 4979-4987.
415. Todd, E.C. (1997) Epidemiology of foodborne diseases: a worldwide review. *World Health Statistics Quarterly*, 50(1-2):30-50.
416. Todd, E.C.D., Greig, J.D., Bartleson, Ch.A. y Michaels, B.S. (2009) Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 6. Transmission and survival of pathogens in the food processing and preparation environment (Review). *Journal of Food Protection*, 72 (1): 202–219
417. Todd, E.C.D., Michaels, B.S., Smith, D., Greig, J.D., y Bartleson, Ch.A. (2010) Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 9. Washing and drying of hands to reduce microbial contamination. *Journal of Food Protection*, 73 (10): 1937-1955.
418. Valero, A. (2006) Aplicaciones de modelos predictivos en la evaluación de riesgo de *Listeria monocytogenes* en alimentos mínimamente procesados. Tesis Doctoral. Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos Universidad de Córdoba.
419. Valero, A., Pérez-Rodríguez, F., Carrasco, E., Fuentes-Alventosa, J.M., García-Gimeno, R.M. y Zurera, G. (2009) Modeling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. *International Journal of Food Microbiology*, 133 (1–2): 186–194.
420. Van Asselt, E.D. y Zwietering, M.H. (2006). A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 107(1): 73–82.
421. Van Boekel, A.J.S. (2002) On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. Martinus. *International Journal of Food Microbiology*, 74 (1-2): 139–159.
422. Veiros, M.B., Macedo, S.M., Santos, M.C.T., Proença, R.P.C., Rocha, A., y Kent-Smith, L. (2007) Proposta de check-List hígio-sanitária para unidades de restauração. *Alimentação Humana*, 13 (3): 51-61
423. Veiros, M.B., Proença R.P.C., Santos M.C.T., Kent-Smith L., y Rocha, A. (2009) Food safety practices in a Portuguese canteen. *Food Control*, 20(10): 936–941.

424. Vermeiren, V., Devlieghere, F. y Debevere, J. (2006) Co-culture experiments demonstrate the usefulness of *Lactobacillus sakei* 10A to prolong the shelf-life of a model cooked ham. *International Journal of Food Microbiology*, 108(1): 68–77.
425. Vermeulen, A., Devlieghere, F., Bernaerts, K., Van Impe, J.F y Debevere, J. (2007) Growth/no growth models describing the influence of pH, lactic and acetic acid on lactic acid bacteria developed to determine the stability of acidified sauces. *International Journal of Food Microbiology*, 119(3): 258-269.
426. Vives-Rego, J., Lebaron, P. y Nebe-von Caron, G. (2000) Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4): 429-448.
427. Vorst, K.L., Todd, E.C.D., y Ryser, E.T. (2006a) Transfer of *Listeria monocytogenes* during mechanical slicing of turkey breast, bologna, and salami. *Journal of Food Protection*, 69 (3): 619–626.
428. Vorst, K.L., Todd, E.C.D., y Ryser, E.T. (2006b) Transfer of *Listeria monocytogenes* during slicing of turkey breast, bologna, and salami with simulated kitchen knives. *Journal of Food Protection*, 69 (12): 2939–2946.
429. Walberg, M., Gaustad, P. y Steen, H.B. (1997) Rapid assessment of Ceftazidime, Ciprofloxacin, and Gentamicin susceptibility in exponentially-growing *E. coli* cells by means of flow cytometry. *Cytometry*, 27(2): 169–178.
430. Ward, L.R., Maguire, C., Hampton, M.D., de Pinna, E., Smith, H.R., Threlfall, E.J., Little, C.L., Gillespie, I.A., O'Brien, S.J, Mitchell RT, Sharp C., Swann, R.A, Doyle, O., Threlfall, E.J. (2002) Collaborative investigation of an outbreak of *Salmonella* enterica serotype Newport in England and Wales in 2001 associated with ready-to-eat salad vegetables. *Communicable Disease and Public Health/PHLS*, 5(4): 301–304.
431. Warren, B.R., Parish, M.E. y Schneider, K.R. (2006) Shigella as a foodborne pathogen and current methods for detection in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(7): 551–567.
432. Wegener, H.C., Hald, T., Lo Fo Wong, D., Madsen, M., Korsgaard, H., Bager, F., Gerner-Smidt, P. y Mølbak, K. (2003) *Salmonella* control programs in Denmark. *Emerging Infectious Disease*, 9(7): 774–780.
433. Weingold, S.E., Guzewich, J.J. y Fudala, J.K. (1994) Use of foodborne disease data for HACCP risk assessment. *Journal of Food Protection*, 57 (9): 820–830.
434. Werner, S., Boman, K., Einemo, I., Erntell, M., Helisola, R., de Jong, B., Lindqvist, A., Löfdahl, M., Löfdahl, S., Meeuwisse, A., Ohlen, G., Olsson, G., Persson, I., Runehagen, A., Rydevik, G., Stamer, U., Sellström, E., y Andersson, Y. (2007)

- Outbreak of *Salmonella Stanley* in Sweden associated with alfalfa sprouts, July-August 2007. *Eurosurveillance*, 12 (42), E071018.2.
435. Whiting, R.C. (1995) Microbial modelling in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(6):467-494.
436. Whiting, R.C. y Buchanan, R.L.A (1993) Classification of models in predictive microbiology – a reply to K.R. Davey. *Food Microbiology*, 10(2): 175-177.
437. Whiting, R.C. y Buchanan, R.L.A. (1994). Microbial Modeling. *Food Technology*, 48: 113-120.
438. Wiley, R.C. (1994) Preservation methods for minimally processed refrigerated fruits and vegetables. Pages 66-133 (Cap. 3). En: Wiley R. C. (Ed.). Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables. Chapman and Hall. New York, USA.
439. Yamamoto, Y., Ugai, K. y Takahashi, Y. (2005). Efficiency of hand drying for removing bacteria from washed hands: comparison of paper towel drying with warm air drying. *Infection. Control Hospital Epidemiology*, 26 (3):316–320.
440. Zhou, Y.F., Abe, K y Iwata, T. (1992) Effect of shredding modes on deterioration of the quality of partially processed pepper fruits. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 39(2): 161-166.
441. Zurera-Cosano, G., Castillejo-Rodríguez, A.M., García-Gimeno, R.M. y Rincón-León, F. (2004) Performance of response surface and Davey model for prediction of *Staphylococcus aureus* growth parameters under different experimental conditions. *Journal of Food Protection*, 67(6): 1138–1145.
442. Zurera-Cosano, G., García-Gimeno, R.M., Rodríguez-Pérez, R., Hervás-Martínez, C. (2006) Performance of response surface model for prediction of *Leuconostoc mesenteroides* growth parameters under different experimental conditions. *Food Control*, 17(6): 429–438.
443. Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., y Riet, K.V. (1990) Modeling of bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6):1875-188.
444. Zwietering, M.H., Witjtes, T., de Wit, J.C. y Van 't Riet, K. (1992). A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. *Journal of Food Protection*, 55(12): 973–979.